

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**MUDr. Karol SUTORIS**

**Fotodynamická terapie  
xenotransplantovaných lidských tumorů**

*Photodynamic Therapy of  
Xenotransplanted Human Tumours*

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**Praha, 2015**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze*

*a*

*Akademie věd České republiky*

Autor práce: **MUDr. Karol SUTORIS**  
Pracoviště autora: **Klinika transplantační chirurgie IKEM, Praha**

Doktorský studijní program: **Experimentální chirurgie**  
Doktorský studijní obor: **PE**  
Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Jaroslav ŽIVNÝ, DrSc.**

Školitel: **prof. MUDr. Robert GÜRLICH, CSc.**  
Pracoviště školitele: **Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracoval samostatně, řádně uvedl a použil výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým zpřístupněním mé práce v knihovnách a uložení její elektronické verze v databázi Národního registru vysokoškolských kvalifikačních prací a systému na odhalování plagiátů (meziuniverzitního projektu Theses.cz) za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací. Dále prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze dizertační práce a verze elektronická, nahraná do Studijního informačního systému – SIS 3. LF UK a posléze zařazena do Centrálního katalogu UK (CKIS ExLibris Aleph) a Repozitáře závěrečných prací UK (ExLibris DigiTool), jsou totožné.

Zároveň dávám svolení k tomu, aby má dizertační práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 31. května 2015

Karol SUTORIS

# IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

SUTORIS, Karol. *Fotodynamická terapie xenotransplantovaných lidských tumorů.*

[*Photodynamic therapy of xenotransplanted human tumours*]. Praha, **2015**. 168 s. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV. Vedoucí práce GÜRLICH, Robert. Jazyk čeština.

## **Klíčová slova:**

karcinom prsu, karcinom prostaty, kožní metastáza, fotodynamická terapie, nu/nu myš, xenotransplantace, ftalocyanin, lipozomální fotosenzitizér

## **Key Words:**

breast cancer, prostate cancer, cutaneous metastasis, photodynamic therapy, nu/nu mouse, xenotransplantation, phthalocyanine, liposomal photosensitizer

# PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Robertu Gürlichovi, CSc., přednostovi Chirurgické kliniky 3. LF UK v Praze a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Bez jeho vstřícnosti, participativního vedení a vytrvalé podpory na poli experimentální chirurgie by tato práce nikdy nevznikla.

Za hodnotné podněty a motivaci v úvodu experimentu bych na tomto místě také rád poděkoval i mému bývalému školiteli doc. MUDr. Ladislavu Horákovi, DrSc.

Experimentální část byla realizována na Oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky 1. LF UK v Praze vedeném doc. RNDr. Pavlou Poučkovou, CSc., které bych chtěl poděkovat za poskytnutí odborných rad a připomínek, za její laskavost, stálou ochotu, trpělivost a čas, které mi při výzkumu věnovala. Za cennou spolupráci chci poděkovat i všem jejím spolupracovníkům, jmenovitě RNDr. Marii Zadinové, Mgr. Davidu Větvičkovi, Ph.D. a MUDr. Janě Mattové.

Děkuji také RNDr. Petru Ježkovi, DrSc., RNDr. Milošovi Nekvasilovi z Oddělení biofyziky membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze a Ing. Janu Rakušanovi, CSc., Ing. Marii Karáskové, Ph.D. z Výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. v Rybitví za vývoj a přípravu experimentálního léčiva.

Za profesionální zpracování a histopatologické odečtení tkáňových vzorků bych rád poděkoval prim. MUDr. Janě Rosalii Bennett z Oddělení patologie Masarykovy nemocnice v Rakovníku.

Statistická analýza výsledků probíhala s dopomocí MUDr. Jaromíra Šrámka, rukopis této práce laskavě pročetl a podnětnými připomínkami opatřil můj bývalý kolega MUDr. Jan Stránský, za co jim patří můj velký dík. Za vynikající jazykovou korekturu textu děkuji mému kamarádovi MUDr. Tomáši Moravcovi a Mgr. Ivaně Parikrupové.

Za ochotu a čas, který jsem mohl studiu a této práci (občas nejen popří zaměstnání) věnovat bych v neposlední řadě chtěl rovněž poděkovat všem svým bývalým nadřízeným – primáři MUDr. Janu Silberovi (Chirurgické oddělení, Masarykova nemocnice, Rakovník), přednostům doc. MUDr. Vladimíru Visokaiovi, Ph.D., doc. MUDr. Jaromíru Šimšovi, Ph.D. a

primáři MUDr. Pavlu Bergmannovi (Chirurgická klinika 1. LF UK, Thomayerova nemocnice, Praha 4 – Krč), jakožto i mému současnému přednostovi doc. MUDr. Jiřímu Froňkovi, Ph.D. FRCS (Klinika transplantační chirurgie, IKEM, Praha 4 – Krč).

Konečně bych chtěl nejvíc poděkovat mojí snoubence Evě, mým rodičům Karolovi a Boženě a sestře Viktorii za jejich neskonalou trpělivost a morální podporu, kterými mě zahrnovali po celou dobu mého vědeckého bádání a tvorby této práce.

Tato práce vznikla za podpory projektů: MPO Trvalá prosperita 2A-1TP1/026, MŠMT EUREKA OE09026, TAČR ALFA TA01010781 a grantu Ligy proti rakovině Praha.



## SEZNAM ZKRATEK

<b>3D</b>	<i>trojrozměrný, trojdimenzionální (three-dimensional)</i>
<b>aCGH</b>	<i>souborová komparativní genomová hybridizace (array comparative genomic hybridization)</i>
<b>AFIP</b>	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
<b>ALA</b>	<i>kyselina 5-aminolevulová (aminolevulinic acid)</i>
<b>Al(OH)S2-Pc</b>	<i>disulfonovaný ftalocyanin hydroxyhlinitý (disulfonated hydroxy-aluminum phthalocyanine)</i>
<b>AIOH-Pc</b>	<i>ftalocyanin hydroxyhlinitý (hydroxy-aluminum phthalocyanine)</i>
<b>ANOVA</b>	<i>analýza rozptylu (analysis of variance)</i>
<b>APC</b>	<i>antigen prezentující buňka, akcesorní buňka (antigen-presenting cell)</i>
<b>AR</b>	<i>androgenní receptory</i>
<b>ATP</b>	<i>adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2 gen</i>
<b>Ber-EP4</b>	<i>epitelový specifický antigen, EpCAM</i>
<b>BI-RADS</b>	<i>systém klasifikace mamografických screeningových nálezů (breast imaging reporting and data system)</i>
<b>BMI</b>	<i>index tělesné hmotnosti (body mass index)</i>
<b>BRCA</b>	<i>breast cancer gen</i>
<b>CA</b>	<i>karbohydrátový (karcinomový) antigen (carbohydrate/carcinoma antigen)</i>
<b>CAM 5.2</b>	<i>anticytokeratin 5.2</i>
<b>CD</b>	<i>shluk rozpoznávání, diferenciační skupina (cluster designation, cluster of differentiation)</i>
<b>cDNA</b>	<i>komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary DNA)</i>
<b>CEA</b>	<i>karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)</i>
<b>CK7</b>	<i>cytokeratin-7</i>
<b>CMF</b>	<i>kombinace cyklofosamid + metotrexát + 5-fluorouracil</i>
<b>CNB</b>	<i>jaderná biopsie samořezací jehlou (core needle biopsy)</i>
<b>CNS</b>	<i>centrální nervový systém</i>
<b>CRP</b>	<i>C-reaktivní protein</i>
<b>CT</b>	<i>počítačová tomografie (computed tomography)</i>
<b>ČR</b>	<i>Česká republika</i>
<b>DCIS</b>	<i>duktální karcinom in situ (ductal carcinoma in situ)</i>
<b>DHT</b>	<i>dihydrotestosteron</i>



<b>DNA</b>	<i>deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)</i>
<b>DDT</b>	<i>dichlordifenyltrichlorethan</i>
<b>dg.</b>	<i>diagnóza</i>
<b>EBM</b>	<i>medicína založená na důkazech (evidence based medicine)</i>
<b>ECOG</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>EGF</b>	<i>epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)</i>
<b>EMA</b>	<i>epitelový membránový antigen (epithelial membrane antigen)</i>
<b>ER</b>	<i>estrogenové receptory</i>
<b>ET-1</b>	<i>endotelin 1, preproendotelin-1</i>
<b>EU</b>	<i>Evropská unie (European Union)</i>
<b>FGF</b>	<i>fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)</i>
<b>FNAB</b>	<i>aspirační biopsie tenkou jehlou (fine needle aspiration biopsy)</i>
<b>fPSA</b>	<i>volný prostatický specifický antigen (free prostate-specific antigen)</i>
<b>GCDFP-15</b>	<i>prolaktinem-inducibilní protein (gross cystic disease fluid protein-15)</i>
<b>GIT</b>	<i>trávicí systém (gastrointestinal tract)</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)</i>
<b>GST</b>	<i>glutathion-S-transferáza, ligandin</i>
<b>HE</b>	<i>barvení hematoxylinem a eosinem (hematoxylin-eosin)</i>
<b>HER-2/neu</b>	<i>receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (human epidermal growth factor receptor 2), c-erbB-2</i>
<b>h<math>\nu</math></b>	<i>záření světla (dle Planckova vyzařovacího zákona)</i>
<b>HPC-1</b>	<i>hereditary prostate cancer-1 gen, STX1A</i>
<b>HpD</b>	<i>hematoporfyrinové deriváty (hematoporphyrin derivatives)</i>
<b>i. v.</b>	<i>intravenózní</i>
<b>IGF-1</b>	<i>inzulinový růstový faktor 1, somatomedin C (insulin-like growth factor 1)</i>
<b>IL-6</b>	<i>interleukin 6</i>
<b>IMRT</b>	<i>radioterapie s modulovanou intenzitou (intensity modulated radiotherapy)</i>
<b>IR</b>	<i>infračervené světlo (infrared light)</i>
<b>ISC</b>	<i>mezisystémový přechod (intersystem crossing)</i>
<b><math>\lambda</math></b>	<i>vlnová délka</i>
<b>laser</b>	<i>zesílení světla stimulovanou emisí záření (light amplification by stimulated emission of radiation)</i>
<b>LCIS</b>	<i>lobulární karcinom in situ (lobular carcinoma in situ)</i>
<b>LDL</b>	<i>lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein)</i>

<b>LED</b>	<i>elektroluminiscenční dioda (light-emitting diode)</i>
<b>LHRH</b>	<i>hormon uvolňující luteinizační hormon, luliberin, gonadotropin uvolňující hormon, gonadorelin (luteinizing hormone-releasing hormone)</i>
<b>MCA</b>	<i>antigen mucinózních karcinomů (mucin-like carcinoma-associated antigen)</i>
<b>MKN-10</b>	<i>Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů, 10. revize</i>
<b>MMG</b>	<i>mamografie (mammography)</i>
<b>MMR</b>	<i>mismatch repair geny (mismatch repair genes)</i>
<b>MR</b>	<i>magnetická rezonance (magnetic resonance)</i>
<b>MRSA</b>	<i>methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus (methicillin-resistant Staphylococcus aureus)</i>
<b>Nd:YAG</b>	<i>neodymem dopovaný yttrito-hlinitý granát (neodymium-doped yttrium aluminium garnet)</i>
<b>NK</b>	<i>„přirozený zabíječ“ (natural killer)</i>
<b>OR</b>	<i>poměr šancí – podílů pravděpodobností (odds ratio)</i>
<b>p. o.</b>	<i>per os, perorální</i>
<b>p. r.</b>	<i>per rectum</i>
<b>PB</b>	<i>fotovybělování (photobleaching)</i>
<b>Pc</b>	<i>ftalocyaniny (phthalocyanines)</i>
<b>PCNA</b>	<i>proliferační jaderní antigen (proliferating cell nuclear antigen)</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)</i>
<b>PDGF</b>	<i>destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)</i>
<b>PDT</b>	<i>fotodynamická terapie (photodynamic therapy)</i>
<b>PET</b>	<i>pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)</i>
<b>pH</b>	<i>vodíkový exponent, potenciál vodíku (potential of hydrogen)</i>
<b>PIN</b>	<i>prostatická intraepitelová neoplazie</i>
<b>PR</b>	<i>progesteronové receptory</i>
<b>PSA</b>	<i>prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)</i>
<b>PTEN</b>	<i>homolog fosfatázy a tensinu (phosphatase and tensin homologue)</i>
<b>PUVA</b>	<i>terapie psoralenem kombinovaným s ultrafialovým světlem A (psoralen combined with ultraviolet A therapy)</i>
<b>QoL</b>	<i>kvalita života (quality of life)</i>
<b>Rb</b>	<i>retinoblastomový protein</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)</i>
<b>ROS</b>	<i>reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)</i>

<b>RTG</b>	<i>rentgen, skiografie (Röntgen)</i>
<b>s. c.</b>	<i>subkutánní</i>
<b>SLN</b>	<i>sentinelová lymfatická uzlina (sentinel lymph node)</i>
<b>SPECT</b>	<i>jednofotonová emisní výpočetní tomografie (single photon emission computed tomography)</i>
<b>STK11/LKB1</b>	<i>serin/threonin kináza 11, jaterní kináza B1 (serine/threonine kinase 11, liver kinase B1)</i>
<b>TAG-72</b>	<i>s nádorem sdružený glykoprotein 72 (tumour-associated glycoprotein 72)</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transformující růstový faktor <math>\beta</math> (transforming growth factor <math>\beta</math>)</i>
<b>TGI</b>	<i>celkové zpomalení (nádorového) růstu (total (tumour) growth inhibition)</i>
<b>Tis</b>	<i>tumor (karcinom) in situ</i>
<b>TNM</b>	<i>klasifikace zhoubných novotvarů (tumour, nodes, metastasis staging system)</i>
<b>tPA</b>	<i>tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator)</i>
<b>TPA/TPS</b>	<i>tkáňový polypeptidový antigen (specifický)</i>
<b>TPPS4</b>	<i>meso-tetra(4-sulfonatofenyl)porfin (meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine)</i>
<b>tPSA</b>	<i>celkový prostatický specifický antigen (total prostate-specific antigen)</i>
<b>TRUS</b>	<i>transrektální ultrasonografie (transrectal ultrasonography)</i>
<b>TURP</b>	<i>transuretrální resekcce prostaty (transurethral resection of the prostate)</i>
<b>uPA</b>	<i>urokinázový aktivátor plazminogenu, urokináza (urokinase-type plasminogen activator)</i>
<b>USA</b>	<i>Spojené státy americké (United States of America)</i>
<b>USG</b>	<i>ultrasonografie, ultrazvukové vyšetření (ultrasonography)</i>
<b>UV</b>	<i>ultrafialové světlo (ultraviolet light)</i>
<b>VEGF</b>	<i>vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)</i>
<b>WHO</b>	<i>Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)</i>

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>7</b>
3.1	KARCINOM PRSU.....	7
3.1.1	<i>Epidemiologická a demografická analýza karcinomu prsu .....</i>	<i>7</i>
3.1.2	<i>Etiologie, patogeneze a rizikové faktory karcinomu prsu .....</i>	<i>8</i>
3.1.3	<i>Histopatologické typy, biologické chování a grading karcinomu prsu.....</i>	<i>12</i>
3.1.4	<i>Klinické příznaky karcinomu prsu.....</i>	<i>16</i>
3.1.5	<i>Diagnostické postupy a staging karcinomu prsu.....</i>	<i>17</i>
3.1.6	<i>Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prsu .....</i>	<i>22</i>
3.1.7	<i>Terapie karcinomu prsu .....</i>	<i>24</i>
3.1.8	<i>Prevence, screening a dispenzarizace karcinomu prsu.....</i>	<i>32</i>
3.2	KARCINOM PROSTATY .....	34
3.2.1	<i>Epidemiologická a demografická analýza karcinomu prostaty .....</i>	<i>34</i>
3.2.2	<i>Etiologie, patogeneze a rizikové faktory karcinomu prostaty .....</i>	<i>35</i>
3.2.3	<i>Histopatologické typy, biologické chování a grading karcinomu prostaty.....</i>	<i>37</i>
3.2.4	<i>Klinické příznaky karcinomu prostaty.....</i>	<i>40</i>
3.2.5	<i>Diagnostické postupy a staging karcinomu prostaty.....</i>	<i>41</i>
3.2.6	<i>Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prostaty .....</i>	<i>45</i>
3.2.7	<i>Terapie karcinomu prostaty.....</i>	<i>46</i>
3.2.8	<i>Prevence, screening a dispenzarizace karcinomu prostaty.....</i>	<i>52</i>
3.3	KOŽNÍ METASTÁZY .....	53
3.3.1	<i>Výskyt, mechanismus šíření a chování kožních metastáz .....</i>	<i>53</i>
3.3.2	<i>Kožní metastázy karcinomu prsu a karcinomu prostaty.....</i>	<i>55</i>
3.4	FOTODYNAMICKÁ TERAPIE .....	59
3.4.1	<i>Definice PDT.....</i>	<i>59</i>
3.4.2	<i>Historie PDT .....</i>	<i>59</i>
3.4.3	<i>Princip PDT.....</i>	<i>61</i>
3.4.4	<i>Mechanismus účinku PDT.....</i>	<i>62</i>
3.4.5	<i>Fotosenzitizéry.....</i>	<i>68</i>
3.4.6	<i>Terapeutické zdroje světla a světlovodné technologie .....</i>	<i>78</i>
3.4.7	<i>Měření účinnosti PDT – dozimetrie a fluorescence .....</i>	<i>82</i>

3.4.8	<i>Současnost a budoucnost PDT</i> .....	83
3.5	SELEKCE ZVÍŘECÍHO MODELU A XENOTRANSPLANTACE .....	86
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>89</b>
4.1	HYPOTÉZY A ZÁKLADNÍ CÍLE EXPERIMENTU .....	89
4.2	MATERIÁL A METODIKA .....	92
4.2.1	<i>Zvířecí model</i> .....	92
4.2.2	<i>Tkáňové linie – xenotransplantáty lidských tumorů</i> .....	93
4.2.3	<i>Experimentální fotosenzitizéry</i> .....	94
4.2.4	<i>Světelný zdroj použitý v experimentu</i> .....	95
4.2.5	<i>Experimentální skupiny – uspořádání pokusu</i> .....	96
4.2.6	<i>PDT v experimentu</i> .....	97
4.2.7	<i>Histologické zpracování</i> .....	101
4.3	STATISTICKÁ ANALÝZA DAT .....	102
4.4	VÝSLEDKY .....	104
4.5	DISKUZE .....	116
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>SOUHRN</b> .....	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ</b> .....	<b>165</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKAČNÍ ČINNOST</b> .....	<b>167</b>

# 1 ÚVOD

I přes neustálý pokrok v oblasti onkologického výzkumu, vedoucímu k vyvinutí nových generací cílených onkologických léků a režimů terapie, je v současnosti k dispozici jen relativně malý počet nových klinicky schválených léků (Burstein, 2013). Tento fakt tak klade důraz na jiné, doposud nevyužité, terapeutické postupy. Fotodynamická terapie (PDT) je standardně používanou léčebnou metodou k terapii rozličných benigních onemocnění. Již delší dobu je PDT rovněž klinicky přijatým postupem u mnoha typů malignit, ale v rutinní praxi stále ještě modalitou poměrně nedocenenou (Agostinis a spol., 2011; Babjuk a spol., 2000).

Terapie malignit se v současné době opírá o čtyři hlavní metody – o terapii chirurgickou, radioterapii, chemoterapii a imunoterapii (Poučková, 2000). Společným cílem onkologické terapie je dosažení zničení nádorových buněk při současném zachování fyziologických funkcí buněk nenádorových, což je zejména v případě chemoterapie a radioterapie velmi problematické (nedostatečná selektivita často nutí k redukci terapeutických dávek) a v případě onkochirurgie při nutnosti zachování radikality operačního výkonu často nemožné. Vedle těchto konvenčních metod onkologické terapie je PDT jednou z dalších perspektivních možností protinádorové léčby. Je to druh fotochemoterapie, který kromě zdroje světla a aplikované fotodynamicky aktivní látky – fotosenzitizéru, vyžaduje také přítomnost tkáňového kyslíku. Spolupůsobení těchto tří klíčových komponent, jež samy o sobě toxické nejsou a v základním stavu neprojevují žádné biologické efekty, podmiňuje mechanismus účinku PDT.

PDT je dvoustupňový terapeutický proces, který je založen na principu fotosenzibilizace či fotoaktivace, tj. na principu selektivní akumulace fotosenzibilizující látky v tumoru a jeho následném ozáření světelnou energií vhodné vlnové délky (Pervaiz a Olivo, 2006; Zimčík a Miletín, 2004). Výsledkem této reakce je vznik cytotoxických agens (singletový kyslík, volné radikály), které jsou vlastní příčinou destrukce tumoru. Konečným terapeutickým efektem je nekróza a/nebo apoptóza nádorových buněk. Hranice mezi apoptózou a nekrózou pravděpodobně není ani zde tak ostrá, existuje mezi nimi poměrně plynulý přechod a mluvíme tak o „programované nekróze“ (Zong a Thompson, 2006).

Při dostatečné hladině molekulárního kyslíku dochází vlivem absorpce světla ve fotosenzitizéru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosenzitizéru reaguje přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu, nebo dochází k transferu energie z fotosenzitizéru na kyslík a ke vzniku jeho vysoce reaktivní singletové formy. Cytotoxický efekt je tak přímo

zprostředkován singletovým kyslíkem (Dolmans a spol., 2003) a ostatní formy volných radikálů, zvláště pak radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou příčinou dalšího ničení tumoru. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou při PDT probíhat paralelně, avšak jejich výsledný relativní terapeutický podíl závisí na typu a koncentraci fotosenzitizéru, na intratumorózní koncentraci kyslíku a na vazbě fotosenzitizéru na substrát (Kolářová, 2005). Ojedinelé postavení v potlačení růstu tumoru po PDT má pak ještě autofagocytóza (Gozuacik a Kimchi, 2004). Kromě uvedených drah buněčné smrti byly rovněž popsány i další způsoby účinku PDT – přímé poškození krevního zásobení tumoru (Dolmans a spol., 2003; Yoo a Ha, 2012) a možnost indukce imunitní reakce hostitele proti nádorovým buňkám (Kammerer a spol., 2011; Mroz a spol., 2011).

Na poli onkologie je PDT vnímána nadále jako metoda poněkud experimentální s řadou nedořešených problémů. Identifikace optimálního fotosenzitizéru je jedním z nich. Požadavky na takovou látku jsou selektivní vychytávání nádorovými buňkami, spontánní netoxičita na straně jedné a dostatečný toxický efekt po ozáření světlem na straně druhé. K těmto zásadním požadavkům přistupují i další, mezi které v neposlední řadě patří i snadná příprava a finanční dostupnost.

Další ústřední roli hraje typ lékové formy fotosenzitizéru a jeho samotný způsob aplikace. Při celkovém – zpravidla intravenózním (i. v.) – podání je fotosenzitizér postupně absorbován v cílové tkáni. Výhodou tohoto postupu je možnost léčby procesů libovolně uložených, např. hluboko v organismu. Nevýhodou této možnosti je fotosenzibilizace celého organismu s nutností ochrany pacienta před světlem dané vlnové délky. Druhou formou je podání lokotopické, které je ale možné pouze u lézí uložených relativně povrchně a aplikaci dobře přístupných. Ozáření tkáně s její následnou destrukcí je možné až po určité době inkubace, až po průniku léčiva do tumoru. K celkové fotosenzibilizaci nedochází, a tak je tato aplikační cesta jen minimálně zatěžující a umožňuje takřka neomezené opakování celého terapeutického procesu. Na rozdíl od klasické chirurgie není nutností vést destrukci v lemu bezpečně zdravé tkáně. Naopak, postupně je tkáň snášena tak, aby organismu byla umožněna regenerace či reparace ložiska. Jedinou teoretickou hranicí je situace, ve které by růst tumoru byl rychlejší než způsob jeho možné likvidace. Podstatná, a tedy limitující, se v konečném důsledku nestává velikost tumoru, nýbrž dynamika jeho vertikálního růstu.

Výběr světelného zdroje závisí na dvou základních faktorech: absorpčním spektru fotosenzitizéru a hloubce penetrace světla do tkáně. Vlnové délky používaného světla v PDT se nacházejí mezi 600 a 900 nm a mají rozhodující vliv na průnik světla do cílové destinace (Marcus a McIntyre, 2002). Dříve se jako zdroje světla pro PDT používaly širokospektrální,

speciálně upravené lampy s filtry barevnými, popř. tepelnými. Při jejich užití se ale většinou nedosahovalo dostatečných příkonů zářivé energie v tumoru a docházelo též k nežádoucímu ozáření zdravého okolí. Uplatnění laserů, jakožto zdrojů monochromatického, koherentního, lineárně polarizovaného a intenzivního světelného svazku s nastavitelným výkonem, je nyní preferováno (Kruijt a spol., 2006; Kyriazi a spol., 2008). Těmto a dalším úskalím PDT se právě tato práce ve své teoretické části věnuje.

Reakce PDT *in vivo* je poměrně rychlá – po neionizujícím ozáření dochází ke vzniku nekrózy již za 24–48 hodin. V některých případech, nejčastěji v období 1–2 týdnů po PDT, začne tumor i navzdory terapii opět růst, co může být způsobeno rezistencí nádorových buněk na PDT. Podklady této PDT-rezistence můžou být např. hypoxie, nedostatečná akumulace fotosenzitizéru v tumoru, nedostatečná koncentrace světelné energie v ozařované oblasti nebo kombinace výše uvedených důvodů (Moša a spol., 1997; Nowis a spol., 2005; Seitz a spol., 2007). Výzkumem fotodynamické terapie xenotransplantovaných lidských tumorů se zabývá experimentální část této práce. Pokus *in vivo* na laboratorním biomodelu za přesně definovaných a reprodukovatelných podmínek tak činí krok k postupnému zařazení PDT mezi klinicky ověřené metody terapie dalších typů malignit.

Fotodynamická terapie byla po svém objevu považována za velmi nadějnou metodu, od které byla očekávána revoluce v chirurgii. Od počátku se doufalo, že tato metoda vytlačí klasické chirurgické postupy zejména proto, že představuje „na míru šitou“ onkologickou terapii. Je vysoce specifická a selektivní – umožňuje nejen přesně zasáhnout maligní struktury, ale i diagnostikovat hranice mezi zdravou a patologickou tkání pomocí fluorescenční diagnostiky. I přes sedmdesátiletý výzkum účinků PDT ale nejsou všechny mechanismy dodnes zcela objasněny.



## 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Další rozvoj PDT v klinické praxi závisí na průkazu, že účinnost této metody, případně i v kombinaci s klasickými postupy, je vyšší než u dosud standardně používaných metod. Experimentální výzkum PDT v laboratořích přináší velké množství poznatků, jejichž pozitivní dopad se dříve či později uplatní i v přímé terapii nemocných.

Tato práce navazuje na dlouhodobý výzkumný záměr Chirurgické kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Vlastní realizace vědeckého pokusu probíhala preklinicky, laboratorní formou *in vivo* na zvířecím modelu, ve spolupráci s Oddělením experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2007–2013. Původně byla práce zaměřena jen na PDT modelu kožních metastáz karcinomu prsu, ale posléze byla rozšířena i o PDT dalšího typu maligního tumoru – karcinomu prostaty.

Předkládaná dizertační práce ve dvou částech zahrnuje problematiku a výsledky výzkumu PDT xenotransplantovaných lidských tumorů.

První – teoretická – část:

1. Shrnuje obecnou charakteristiku vybraných modelových typů malignit – karcinomu prsu a karcinomu prostaty. Zabývá se jejich aktuální epidemiologicko-demografickou situací, dále stručně etiologií, patogenezí, faktory rizikovými a prognosticko-prediktivními, klinickým obrazem, základní diagnostikou, TNM klasifikací a stagingem, prevencí a screeningem a konečně zmíněním strategie současných *lege artis* terapeutických postupů. Nevynechává ani morfologickou typizaci a grading obou malignit a prezentuje tak ucelený a vysoce aktuální přehled dané problematiky. Podtrhuje tak současnou důležitost a vysoce vhodnou možnost indikace PDT (i vyplnění terapeutických mezer) právě u těchto dvou hormonálně dependentních karcinomů. Byť možná v rozsáhlejší formě, ať toto souhrnné sdělení dále poslouží k dokonalé orientaci v oblasti především studentům a k osvěžení poznatků i klinikům.
2. Vzhledem k možnosti budoucího využití PDT v rámci terapeutického algoritmu obou zmíněných typů karcinomů v klinické praxi – jako přímé aplikace výstupů této experimentální práce – se v samostatné stati blíže věnuje problematice právě kožních metastáz karcinomu prsu i prostaty.

3. Předkládá současný stav poznání problematiky PDT se zaměřením na terapii maligních tumorů dle současného vědeckého poznání, tj. převážně anglicky psané literatury za posledních 15 let (při využití zejména databází Medline PubMed a Medscape, Embase, Elsevier Scopus a Science Direct, Thomson Reuters Web of Science, Google Scholar, Bibliographia Medica Českoslovac a Medvik). Kromě definice, historie, principu, mechanismu účinku PDT a možností měření její účinnosti v samostatných podkapitolách reflektuje specifickou problematiku fotosenzitizérů a terapeutických zdrojů světla. V čem spočívají výhody a nevýhody PDT? Jaké je současné a jaké by mohlo být budoucí využití metody PDT? I o těchto podstatných otázkách práce pojednává. Představuje tak velmi podrobný literární úvod k části experimentální.
4. V závěrečných podkapitolách dále v krátkosti zabývá výběrem pokusného zvířecího modelu a soudobým pohledem na xenotransplantace s důrazem na využití v experimentu.

Druhá – experimentální – část:

1. V úvodní části popisuje materiál a metodiku vlastního laboratorního experimentu.
2. Účelem pokusu na imunodeficientních nu/nu myších s přijatými xenoštěpy (histologicky přesně definované) lidské linie karcinomu prsu a dvou linií karcinomu prostaty bylo ověření možného efektu PDT na právě tyto tumory *in vivo*. Výsledky všech realizovaných pokusů jsou staženy k více různě definovaným kontrolním skupinám.
3. Pro zvýšení účinnosti PDT preklinicky studuje protinádorovou účinnost nově vyvinutého a připraveného fotosenzitizéru II. generace – lipozomálního gelového preparátu s aktivní složkou hydrofobním ftalocyaninem hydroxyhlinitým (AlOH-Pc).
4. Experimentem na subkutánně (s. c.) xenotransplantovaném karcinomu prsu porovnává účinnost aplikačních cest a forem jednotlivých fotosenzitizérů – hodnotí efekt podání celkového (i. v.) oproti podání lokálnímu, topickému.
5. Vzájemně srovnává a hodnotí již komerčně používané fotosenzitizéry I. generace (Metvix, Photofrin) a nové fotosenzitizéry z pomezí II. a III. generace (AlOH-Pc a jeho disulfonovaná forma k systémovému použití).
6. Řeší otázku optimální koncentrace nového PDT preparátu při jeho lokotopické aplikaci u obou typů (lépe – všech tří tkáňových linií) tumorů.

7. Sleduje efektivitu PDT dvou zcela odlišně se chovajících linií karcinomu prostaty (s malým a velkým metastatickým potenciálem).
8. Zabývá se objektivní verifikací výsledků, tj. histologickým zpracováním nekropsií po ukončení pokusu.
9. Po statistické analýze získaných dat předkládá výsledky výzkumu PDT a v diskuzi mj. vypracovává optimální aplikační model nového jedinečného léčivého preparátu.

Karcinom prsu a karcinom prostaty patří pohlavně specificky mezi vůbec nejčastější malignity, a to nejenom v populaci české, nýbrž v měřítku celosvětovém. Uplatnění PDT jako sanačního – kurativního – výkonu při destrukci zejména progredientních a preinvazivních prekanceróz, soliterních neoplazmatických lézí (např. satelitních kožních metastáz při relapsu základního onemocnění), v chirurgii metastáz, anebo paliativně v pozdních stádiích malignity za účelem zlepšení kvality života (QoL) pacientů a prodloužením intervalu jejich přežití, je záležitostí reálnou. Praktickým výstupem dizertační práce je nemocným výhledově nabídnout další možnost terapie karcinomu prsu a karcinomu prostaty, která může být příkladem pro léčbu jiných vhodných maligních tumorů. Cílem práce může také být budoucí motivace k dalšímu bádání v oblasti fotodynamiky ve spojení s experimentem v chirurgii.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

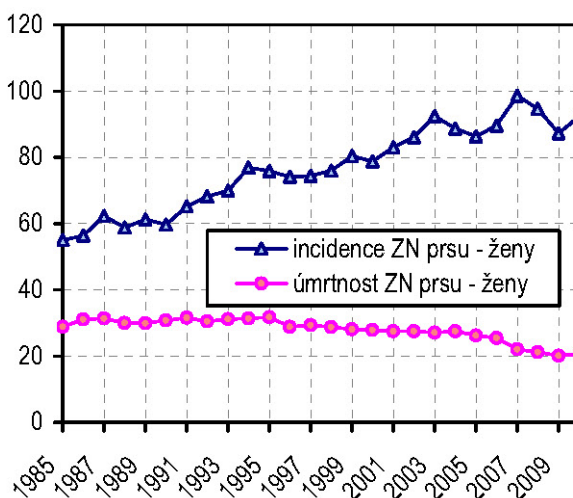
### 3.1 KARCINOM PRSU

#### 3.1.1 Epidemiologická a demografická analýza karcinomu prsu

##### Incidence

Kromě jiných kožních tumorů je karcinom prsu (dg. C50 dle MKN-10 klasifikace) po karcinomu plic druhým nejčastějším typem malignity lidské populace a zdaleka nejčetnějším onkologickým onemocněním žen. V České republice (ČR), podobně jak v ostatních rozvinutých zemích Evropy a Severní Ameriky, dochází v současnosti po předešlém trendu mírné stagnace nadále k setrvalému zvyšování jeho incidence při jen nevýznamných změnách mortality (**Graf 1**).

**Graf 1.** Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na karcinom prsu u žen v ČR (v letech 1985–2010, přepočten na 100 000 osob, evropský standard)



Zdroj: ÚZIS ČR, 2013

V roce 2010 bylo v ČR zjištěných 6 498 nových případů (incidence 121,3/100 000 žen), které představovaly více než 16 % ze všech hlášených malignit u žen (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013). Přepočteno na světový standard, patří ČR ve srovnání se zahraničím 26. místo v incidenci (Ferlay a spol., 2014). Pravděpodobně v souvislosti s bezplatným mamografickým screeningem od roku 2002 vzrůstá také počet zachycených novotvarů *in situ* prsní žlázy (dg. D05) – od zahájení screeningového programu do roku 2010 tak došlo k nárůstu o 117 %. Index časového trendu ve vývoji incidence karcinomu prsu za posledních 37 let u nás dosahuje 130 %. Karcinom prsu je onemocnění vzácné u žen mladších 30 let, incidence ale

prudce stoupá s věkem a kulminuje po 60. roce života (Dušek a spol., 2014). Malignity prsu nejsou problematikou pouze ženské populace, ale vyskytují se také u mužů. Zde však představují spíše raritní skupinu tumorů s incidencí přibližně 38 nových pacientů ročně, odpovídající tak výskytu 0,7/100 000 mužů (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013). Oproti ženám je poměr incidence 1 : 135, co představuje jen 1 % všech malignit prsou (Strnad, 2001).

## **Mortalita**

Karcinom prsu představuje nejen hlavní incidenční nádorovou zátěž ženské populace, ale je také stále nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění. Za příznivý trend je na druhé straně nutné považovat zvyšující se podíl pacientek prvního a druhého klinického stadia a snížení fatality. To je hlavně dáno možnostmi časnějšího diagnostického záchytu a úspěšností terapeutických modalit v raných fázích nemoci. Relativní pětileté přežití se díky tomu u lokalizovaného onemocnění pohybuje nad 90 %. V roce 2010 zemřelo v ČR na diagnózu karcinom prsu 1 655 žen, tj. o 48 žen více než v roce předchozím (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013); celosvětově se jedná o pátou nejčastější onkologickou příčinu úmrtí – ročně je evidováno 522 000 úmrtí (Ferlay a spol., 2014).

## **Prevalence**

Počet žijících žen s tumorem prsu nebo jeho anamnestickou historií – tzn. prevalence – pak v roce 2009 u nás byla celkem 61 407, co představovalo 1 147,9/100 000 žen.

### ***3.1.2 Etiologie, patogeneze a rizikové faktory karcinomu prsu***

#### **Etiologie a patogeneze**

Endogenní a exogenní vlivy jsou poměrně velmi heterogenním souborem. V několikastupňovém procesu kancerogeneze prsu působí jako promotory. Karcinom prsu patří mezi tzv. hormonálně dependentní tumory. Kancerogenní účinky se přisuzují zejména estrogenům (estradiol, estron a estriol), které indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů (EGF, IGF-1, PDGF) a patrně i onkogenů, jejichž produkty významným způsobem ovlivňují proliferační aktivitu buněk. Tyto účinky jsou však za fyziologického stavu v rovnováze s různými působky antiproliferačními (např. TGF- $\beta$ ). Kromě estrogení stimulace může být rovnováha porušena také genetickými abnormalitami. Aktivace některých onkogenů (Myc, Ras, HER-2/neu aj.) nebo alterace recesivních onkogenů (p53, Rb) se projeví postupnou změnou fenotypu epitelových buněk, která dospěje přes dysplastické změny, atypické dysplastické změny, karcinom *in situ* až ke vzniku samotného invazivního

karcinomu. V patogenezi karcinomu prsu se uplatňuje rovněž i aktivita stimulovaných stromálních buněk, které produkují proteázy (katepsin D, tPA) a angiogenní faktory (FGF, VEGF) usnadňující růst a metastazování tumoru (Klener a Abrahámová, 2002). Jak u ostatních malignit, tak i u karcinomu prsu je zřejmé, že se jedná o proces dlouhodobý a vícečetný. Počet nádorových buněk je dán velikostí vlastního tumoru. U tumorů na hranici diagnostických možností o velikosti 1 cm, se předpokládá počet buněk  $10^9$ . Takový tumor již prošel 30 zdvojeními (příčemž tumory s počtem buněk  $10^6$  již mohou vytvářet vzdálené metastázy). S počtem nádorových buněk roste počet rozdílných klonů buněk a tudíž jejich heterogenita (Brychta, 2011). Při zdvojovacím čase, který u karcinomu prsu činí 20–300 dní, tak od první nádorové mitózy může uplynout 2–17 let (Klener a Abrahámová, 2002).

Popsané mechanismy se uplatňují u tzv. sporadické formy karcinomu prsu, představující převážnou většinu (80–85 %) všech tumorů prsu. Výskyt v rodině v těchto případech zpravidla nebývá zaznamenán, i když se připouští výskyt jen u jednoho člena, převážně z okruhu nepřímých příbuzných. Mutace genů typické pro hereditární formu při vývoji sporadického karcinomu prsu však roli nehrají (Anderson, 1992). Pro vývoj kancerogeneze mléčné žlázy bylo v experimentu zapotřebí 4–5 mutací somatických buněk. V nádorových buňkách se vyskytuje řada mutací, avšak není jasné, které z nich jsou odpovědné za iniciaci kancerogeneze a poté za invazivní růst (progresi) – to znamená, které jsou specifické pro vývoj tumorů prsu. Jednou porušená DNA nádorové buňky predisponuje k další řadě chyb při replikaci (replication errors) a tyto mutace jsou předávány dceřiným buňkám mechanismem tzv. klonální expanze. Na jejím konci stojí klon buněk s invazivním a metastatickým potenciálem (Pontén a spol., 1990).

Výskyt karcinomu prsu (nebo vaječníku) v každé linii příbuzných je charakteristický právě pro formu hereditární čili familiárně geneticky podmíněnou. Z praktického hlediska se na tuto možnost pomýšlí při postižení tří a více rodinných příslušníků. Hereditární karcinom prsu je často bilaterální. Největší význam pro detekci genetické podmíněnosti dědičného syndromu tumoru prsu a/nebo vaječníku má molekulární analýza genů BRCA1 a BRCA2 (breast cancer 1 a 2). Tyto geny patří také mezi antionkogeny, nebo tzv. tumor supresorové geny, které vyžadují ke své inaktivaci kompletní recesivní ztrátu obou alel. Na rozdíl od onkogenů, proteiny kódované antionkogeny mají antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu. Klonování genů BRCA1 a 2 potvrdilo Knudsonovu teorii dvou zásahů (různými mitogeny, kancerogeny, ionizujícím zářením), které vyřadí obě alely a tím tumor supresorickou funkci genu (Knudson, 1971). BRCA geny neřídí přímo buněčný cyklus, ale fungují jako „opraváři“, strážci (tzv. caretakers) poškozené DNA (Kinzler a Vogelstein, 1997). Někteří členové z takto postižených rodin mají vrozenou delecii jedné alely takového

tumor supresorového genu. Ke ztrátě heterozygoty a tedy funkce genu stačí v těchto případech jen jeden „zásah“. Mutace byly zaznamenány častěji u aškenázské židovské populace (Greenup a spol., 2013). Karcinom prsu se v rodinách s mutacemi BRCA1 pak vyskytuje podle klasické Mendelovské genetiky autozomálně dominantním vzorcem dědičnosti. V těchto případech jsou probandky ve vysokém absolutním riziku vývoje karcinomu prsu a/nebo vaječníku, který se manifestuje v mladém věku, již ve 3–4 dekádě života. Do 50. roku života má nositelka mutace 50% a do 70. roku života 85% riziko vývoje karcinomu prsu (celoživotní riziko karcinomu vaječníku se pohybuje v rozmezí 15–45 %). U mužských nositelů mutací BRCA1 bylo popsáno zvýšené riziko vývoje karcinomu prostaty a kolorekta (Anderson, 1992; Easton a spol., 1995). Mutace genu BRCA2 je také spojena s vrozenou vnímavostí k vývoji karcinomu prsu. Odhaduje se, že mutace tohoto genu jsou odpovědné přibližně za 35 % všech případů genetických karcinomů prsu, riziko vývoje karcinomu je ale oproti mutacím na BRCA1 mnohem nižší. U postižených mužů bývá poměrně často detekována vrozená mutace genu BRCA2. Karcinom BRCA2 pozitivní je obvykle velmi málo diferencovaný, chová se agresivně. Detailní analýzou rodin s mutací BRCA2 byla též nalezena vyšší incidence jiných neoplazií, jako např. karcinomy vaječníku, endometria, jater, hrtanu, prostaty a pankreatu ve srovnání s jejich normální populační incidencí (Narod, 1997). Incidence hereditárního karcinomu prsu představuje maximálně 10 % z celkové incidence a počet karcinomů prsu spojených s mutacemi BRCA1 a 2 činí přibližně 5 % z celkové incidence malignit (Anderson, 1992). Kromě nejvíce studovaných mutací genů BRCA1 a 2 se karcinom prsu vyskytuje i u mutace genu p53 (Li-Fraumeniho syndrom), ATM (ataxie-telangiektazie – Louis-Barové syndrom), PTEN (Cowdenův syndrom), STK11/LKB1 (Peutz-Jeghersův syndrom) a MMR genů (Lynchův syndrom). Ženy z rodin s výskytem genetického karcinomu prsu/ovaria by měly být doporučeny na specializovaná pracoviště k provedení genetického testování (Foretová, 2005).

### **Rizikové faktory**

Kumulativní riziko incidence karcinomu prsu u žen ve věku do 75 let v naší zemi je docela vysoké, činí 7,1 %. V rozvojových zemích ale dosahuje pouze hodnot třetinových – 2,8 % (Jemal a spol., 2011). Vzhledem k vysoké incidenci a celospolečenskému významu této diagnózy byla věnována velká pozornost identifikaci rizikových faktorů. Ve vysoce rizikových populacích (USA, západní Evropa) byly rizikové faktory po proběhlých rozsáhlých epidemiologických studiích definované v tzv. Gailově modelu (Gail a spol., 1989). Clausův model pak slouží k jednoduchému zhodnocení pravděpodobného celoživotního kumulativního rizika (v %) ženy pro vznik karcinomu prsu podle závažnosti její rodinné

anamnézy. Clausovy tabulky neberou v úvahu další faktory, které mohou riziko malignity ovlivnit, např. již preexistující benigní onemocnění prsu. Nalezenou hodnotu je nutné považovat za orientační a srovnat ji s udávaným rizikem žen v běžné populaci (Claus a spol., 1994). Platnost závěrů těchto studií ve slovanské populaci nebyla nikdy ověřována. Odlišnost české populace tak neumožňovala nekritické přejímání závěrů zahraničních studií a jejich implementaci do českého zdravotnického systému. K identifikaci žen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu byla proto v ČR v letech 2000–2004 provedena vlastní rozsáhlá studie případů a kontrol, které se celorepublikově zúčastnilo 14 556 žen v 54 centrech (Novotný a spol., 2004). K odhadu rizika vzniku karcinomu prsu tak v ČR lépe slouží tzv. Pecnův matematický model. Srovnání nejdůležitějších faktorů modifikujících základní celoživotní riziko onemocnění karcinomem prsu zobrazuje **Tabulka 1**.

**Tabulka 1.** Základní rizikové faktory karcinomu prsu

Gailův model	Pecnův model
	věk
	věk v době menarché
	věk v době prvního porodu
	počet biopsií prsu
	přítomnost atypické duktální hyperplazie v biopsickém vzorku*
	počet příbuzných prvního řádu s karcinomem prsu
etnikum	počet příbuzných prvního řádu s jakýmkoliv karcinomem
	počet otěhotnění
	BMI
	prodělaný zánět prsu (především chronický a recidivující)

\*v české studii sledována jen výjimečně, koeficient převzat z Gailova původního modelu

Podle skandinávského výzkumu dvojčet připadá asi 27 % případů karcinomu prsu na genetické faktory a zbytek na faktory životního stylu a životního prostředí (Lichtenstein a spol., 2000). Co se týče rasy, bělošky jsou postiženy častěji než Afroameričanky, nejmenší riziko mají Hispánky a Asiatky (Chen a spol., 2004). Pomineme-li vliv pohlaví, zásadním rizikovým faktorem je příbuzná s karcinomem prsu v první linii (matka, sestra, dcera), která zvyšuje riziko 2–3×, příbuzná v druhé linii pak 1,5×. Při současném výskytu postižené matky a sestry až 14×. Mezi další závažné rizikové faktory patří věk a dlouhé působení estrogenů na nezralou tkáň mléčné žlázy. Mléčná žláza dozrává teprve během gravidity a laktace, proto



mezi rizikové faktory dále patří pozdní první těhotenství, nuliparita, časná menarché – přesněji časná první ovulace (před 12. rokem života), pozdní menopauza (po 55. roce) a mnohem méně substituční hormonální terapie. Porod po 35. roce života je nebezpečnější než nuliparita (Strnad, 2008). Primárně benigní onemocnění prsu – cystické adenomy, intraduktální papilomy a atypická duktální hyperplazie – kromě svého potenciálně rizikového biologického chování představují i možnost přehlédnutí karcinomu v rámci diferenciální diagnostiky (většinou nemají mamografický obraz typické vysoké denzity). Tyto rizikové léze mají relativní rizika karcinomu prsu mezi 4–6 (Strnad, 2006). Na vývoj karcinomu prsu má zjevný indukční vliv radioterapie, která je vyjádřena vysoce pozitivní asociací poměru šancí – s OR (odds ratio) až 5,52 (tj. s mírou relativního rizika o 452 % vyšší u osob exponovaných); představuje tak významně negativní rizikový faktor především v období puberty, kdy převážnou indikací je terapie Hodgkinovy nemoci (Cooke a spol., 2013). Na druhé straně, účinky běžných diagnostických RTG hrudníku, včetně mamografií, představují jen mírně zvýšené riziko – kumulativně 0–6 % (Berrington de González a Darby, 2004). Alkohol zvyšuje riziko vývoje karcinomu prsu ne zcela jasným mechanismem účinku jen mírně. Snížená aktivita prsního izoenzymu alkoholdehydrogenázy (hlavně skupiny I) v biotických vzorcích karcinomu prsu by mohla ale jeho kancerogenní participaci vysvětlovat (Jelski a spol., 2006). Postmenopauzální obezita, zvýšený příjem tuků a nedostatečná fyzická aktivita jsou rovněž považovány za rizikové faktory (Key a spol., 2003). Souvisí to patrně se zvýšenou steroidogenezí – nadměrnou extraovariální syntézou estradiolu z nadledvinového testosteronu působením aromatáz tukové tkáně (Klener a Abrahámová, 2002). Naproti tomu vliv kouření, chemických látek (např. pesticid DDT, dietylstilbestrol aj.) nebo hormonální antikoncepce je otázkou nadále kontroverzní a ve vztahu k výskytu karcinomu prsu jednoznačně doložen nebyl (Strnad, 2008).

### ***3.1.3 Histopatologické typy, biologické chování a grading karcinomu prsu***

#### **Histopatologické typy (typing)**

V současné době se v praxi nejčastěji využívají tři morfologické klasifikační systémy tumorů prsu – klasifikační systém podle WHO, klasifikační systém podle AFIP a Rosenův klasifikační systém (Skálová a spol., 2012). Obecně karcinom prsu klasifikujeme podle invaze do stromatu (neinvazivní a invazivní forma), podle buňky, z které karcinom vychází (lobulární a duktální typ) a nově i podle genové exprese. Predilekčním místem vzniku karcinomu prsu jsou nejčastěji terminální lalůčky mléčné žlázy a jejich vývody. Vzniku karcinomu zpravidla předchází proliferativní léze – atypická duktální nebo lobulární

hyperplazie, z níž se v první fázi vyvinou neinvazivní formy karcinomu, označované jako karcinom *in situ*.

U duktálního karcinomu *in situ* (DCIS) transformované epitelové buňky proliferují uvnitř dilatovaných vývodů, bazální membrána a zevní myoepiteliální vrstva ovšem zůstávají intaktní a nedochází tak k invazivnímu růstu do periduktálního stromatu. DCIS je méně častá forma karcinomu než forma invazivní, i když jeho procento zastoupení díky mamografickému screeningu stoupá (Skálová a spol., 2012). Mamografie umožňuje detekci nepalpovatelných lézí, které vytvářejí obraz mikrokalcifikací. DCIS není léze homogenní, existuje ve dvou histologických formách – low grade DCIS, jejímž prekurzorem je atypická duktální hyperplazie a high grade DCIS (komedonový karcinom), která prekurzor nemá a s četnými mitózami často progreduje rovnou do high grade invazivního duktálního karcinomu. DCIS je častější postmenopauzálně (Klener a Abrahámová, 2002). Prognóza DCIS je výborná – pouze high grade varianta má tendenci k recidivám, čemuž se dá terapeuticky předejít respektováním pravidla nutnosti totální excize v lemu zdravé tkáně (Skálová a spol., 2012). Diferencované formy mohou být papilární nebo solidní. Zvláštní formou šíření DCIS je Pagetův karcinom bradavky, který je charakteristický invazí nádorových buněk do epidermis areoly.

**Tabulka 2.** Charakteristiky DCIS a LCIS

Charakteristika	DCIS	LCIS
věkové rozmezí	54–58	44–47
vztah k menopauze	70 % v postmenopauze	70–90 % v premenopauze
klinické vyšetření	palpovatelná rezistence, sekrece z bradavky	žádný nález
mamografické vyšetření	kalcifikace	žádný nález
multicentricita	25–30 %	60–90 %
bilateralita	10–20 %	50–90 %
vývoj v invazivní karcinom	30–50 % během 10–18 r	25–30 % během 15–25 r
DNA plojditá	aneuploidní	diploidní
proliferace	vysoká	nízká
přítomnost HR	vysoká	střední až nízká
exprese onkogenů	vysoká	nízká
přítomnost nekróz	ano	ne

Zdroj: Klener a Abrahámová, 2002

Nádorové mikroprostředí lobulárního karcinomu *in situ* (LCIS) je odlišné – LCIS je charakterizován proliferací uniformních malých buněk epitelu mamárních lobulů. Vzniká často multicentricky (v různých prsních kvadrantech) a v 10–20 % je nálezem i kontralaterální postižení. LCIS se od DCIS liší nemožností mamografické detekce a častějším výskytem u žen před menopauzou (Klener a Abrahámová, 2002). Bližší rozdíly mezi DCIS a LCIS přehledně výše shrnuje **Tabulka 2**.

Invazivní (infiltrující) formy karcinomu prsu existují převážně také ve dvou formách – duktální a lobulární. Předstupněm je tzv. mikroinvazivní karcinom, který je definován průnikem bazální membránou nejvýše do vzdálenosti 2 mm.

Invazivní duktální karcinom je nejčastější formou karcinomu prsu vůbec (70–75 %). Vyskytuje se v dospělosti, nejčastěji v 5. a 6. deceniu. Jeho uspořádání je často tubulární, u tzv. skirhotického typu je provázen reaktivní fibrózou, která při palpačním vyšetření budí dojem až kamenné tvrdosti tumoru. U tumorů s hvězdicovitou konfigurací a s centrální nekrózou je prognóza zpravidla špatná (Klener a Abrahámová, 2002). Invazivní duktální karcinom predilekčně metastazuje do kostí, jater a plic. Biopticky je nejčastějším nálezem varianta tzv. blíže neurčená (not otherwise specified), tj. bez bližší histologické specifikace, která je strukturou velmi variabilní (Skálová a spol., 2012). Ostatní varianty (např. tubulární, medulární, mucinózní, papilární, komedonová aj.) jsou časté mnohem méně. Výčet všech histopatologických variant invazivních forem karcinomu prsu znázorňuje **Tabulka 3**. Karcinom inflamatorní (erysipeloidní) zastupuje 1 až 3 % všech karcinomů prsu. Jedná se o špatně diferencovaný duktální karcinom infiltrující celý prs, charakteristický difuzním erytémem, edémem a kožní indurací s typickým vzhledem pomerančové kůry (peau d'orange). Pro rychlý růst a časně metastazování je řazen mezi nejagresivnější formy karcinomu prsu. Metastatické postižení uzlin v době diagnózy se vyskytuje u 50–90 % tumorů (Klener a Abrahámová, 2002).

**Tabulka 3.** Histopatologická variace invazivního karcinomu prsu

Invazivní karcinom prsu	Histopatologické varianty
duktální	blíže neurčený (not otherwise specified), tubulární, mucinózní (koloidní, gelatinozní), kribriformní, invazivní mikropapilární, medulární (atypický, s lymfoidním stromatem), komedonový, apokrinní, adenoide cystický, sekreční (juvenilní), na glykogen bohatý (glycogen-rich, světlobuněčný), secernující lipidy (lipid-rich), metaplastický (dlaždicovitý, chrupavčitý, kostní, osteoklastoidní), adenoskvamózní a skvamózní, s endokrinními rysy, inflamatorní (erysipeloidní)
lobulární	klasický, solidní, alveolární, tubulolobulární, histiocytoidní,

papilární (mamilární)

z prstenčitých buněk, pleomorfní

intraduktální, intracystický, adenom (floridní papilomatóza, syringomatózní), Pagetův karcinom (areolární)

Invazivní lobulární karcinom reprezentuje asi 10 % všech karcinomů prsu. Mnohdy se projevuje jako nehmatná léze, a tudíž je diagnostikován pozdě. Peroperačně je těžké určit makroskopicky zdravé okraje tkáně. Teorie častějšího bilaterálního (cca ve 30 %), multifokálního nebo multicentrického výskytu potvrzena nebyla (Skálová a spol., 2012), záchyt v zevním horním prsním kvadrantu se ale jeví jako čtenější (Klener a Abrahámová, 2002). Vyznačuje se nízkou proliferační aktivitou. Ve srovnání s invazivním duktálním karcinomem je uzlinové metastatické postižení méně frekventní, častěji metastazuje na serózní membrány, meningy, do dělohy a vaječníků, GIT, retroperitonea, kostí, vzácněji do plic.

### **Biologické chování**

Karcinom prsu se může šířit lokálně přímou invazí, cestou lymfatickou i hematogenní. Některé z metastáz (včetně mikrometastáz) jsou synchronní, již v čase stanovení diagnózy, jiné se průběhem metastatických kaskád stávají klinicky manifestními až metachronně, za měsíce až desítky let od iniciální terapie. Je potřeba mít na paměti, že karcinom metastazuje jednak místně, ale i vzdáleně. Místní invaze se může projevovat v parenchymu samotné mléčné žlázy, v bradavce, kůži, fascii, pektorálních svalech, nebo dalších strukturách hrudní stěny. Důležitost přesné patologické evaluace lokálního prorůstání (zejména vzdálenost od resekčních okrajů) je čím dál více vyzdvižována kvůli neustále se zvyšujícímu počtu konzervativních chirurgických výkonů na prsu (Driul a spol., 2013). Lymfatické metastázy nejčastěji postihují regionální lymfatické uzliny, především axilární, nebo vnitřní mamární u tumorů z vnitřních kvadrantů. Postižení supra- a infraklavikulárních uzlin je již hodnoceno jako metastázy vzdálené. Až u 50–70 % nemocných s negativním palpačním nálezem v axile lze histologicky verifikovat uzlinové metastázy. Hematogenní šíření do kostí, plic, pleury, jater, vaječníků, kůže a mozku může nastat dokonce už i u tumoru subklinického. To vše jsou důvody, proč se na karcinom prsu musí pohlížet jako na systémové onemocnění od samého počátku a proč je indikace široké systémové terapie zcela na místě (Klener a Abrahámová, 2002).

Nové molekulárně-genetické studie umožnily v poslední době precizovat klasifikaci invazivního karcinomu prsu na základě genových expresních profilů (Warnat a spol., 2005). Pomocí technologie komplementárních DNA čipů (cDNA microarray) a souborové komparativní genomové hybridizace (aCGH) byly identifikovány 4 základní podskupiny

invazivního karcinomu prsu: epiteliální estrogen/progesteron pozitivní typ s luminální diferenciací A (ER/PR+, HER-2/neu-) tvořící největší skupinu, s luminální diferenciací B (ER/PR+, HER-2/neu+), což je relativně malá podskupina, tumory HER-2/neu pozitivní (ER/PR-, HER-2/neu+) a vzácné, avšak velmi agresivní bazaloidní/myoepiteliální tumory, které jsou tzv. triple negativní (ER/PR-, HER-2/neu-). Stanovení daného genového expresního profilu tumoru předurčuje jeho biologické chování a posléze možnosti terapie (Minář a spol., 2012), má tedy významný prognostický a prediktivní efekt.

V současné době se pozornost obrací k triple negativnímu karcinomu, protože jde o karcinom s velmi agresivním klinickým průběhem, nereagující na hormonální terapii. Fenotyp bazaloidního karcinomu se vyskytuje až u 10–15 % všech karcinomů prsu (Dawood, 2010), ale u celkové mortality na metastatický karcinom prsu představuje procento nepoměrně větší. Častěji se objevuje u pacientek s mutací v genu BRCA1. Histomorfologicky se jedná o high grade karcinom s četnými mitózami, ložisky geografických nekrot a vysokou proliferační aktivitou. Nádorová struktura je převážně solidní, se vzhledem, který se dříve popisoval jako „atypický medulární karcinom prsu“. V některých tumorech je nápadným znakem stroma bohaté na lymfocyty (Skálová a spol., 2012).

## **Grading**

Grading určuje stupeň diferenciaci, tj. míru mikroskopické podobnosti nádorové tkáně s normální prsní tkání. Tumor tak klasifikuje jako dobře diferencovaný (grade 1, low grade), středně diferencovaný (grade 2, intermediate/moderate grade) a špatně diferencovaný (grade 3, high grade). Histologický stupeň použit ve spojení se stadiem nemoci může zlepšit predikci výsledku. Jeho důležitost tedy tkví v prokázané statistické korelaci mezi stupněm (gradem) a prognózou, vlastním přežitím nemocné (Henson a spol., 1997). Grade invazivního karcinomu prsu se určuje podle tzv. nottinghamské (Elston-Ellisovy) klasifikace (Elston a Ellis, 1991), která je modifikací Scarff-Bloom-Richardsonovho gradingového systému (Bloom a Richardson, 1957). Celkový stupeň je součtem bodů tří kritérií: podíl tubulárních/acinárních struktur, jaderná pleomorfie a počet mitóz (Argani a Cimino-Mathews, 2012).

### **3.1.4 Klinické příznaky karcinomu prsu**

Karcinom prsu se v počátečních stádiích růstu chová asymptomaticky. Iniciální formy onemocnění se u převážné většiny žen manifestují jako hmatná rezistence (bulka) v prsu, většinou nebolestivá. Mastodynie může být přítomná u inflamatorního karcinomu, častěji ale provází afekce benigní. Změna konfigurace či velikosti prsu, lymfadenopatie axily, popř.

zvýraznění žilní pleteně prsu mohou na přítomnost tumoru někdy též upozornit. Vzácněji jsou přítomny morfologické změny na bradavce – deskvamace, eroze, retrakce kůže („důlkovatění“). Inverze nebo oploštění bradavky stejně jako sangvinolentní sekrece z bradavky patří většinou mezi znaky pokročilého tumoru. V ostatních případech je diagnóza postavena na základě mamografického vyšetření asymptomatické ženy a jako maligní nález v průběhu dlouhodobé péče o rizikové ženy ve specializovaných mamárních poradnách.

Celkové příznaky se objevují teprve u pokročilého metastazujícího onemocnění. Metastázy se projeví specifickou symptomatologií nejčastěji postižených orgánů: plic, jater, skeletu a mozku. Kromě obecné paraneoplastické symptomatiky – chronická skeletální bolest, kachektizace, anorexie, febrilie, poruchy spánku, deprese – může být karcinom prsu provázen i dalšími, více specifickými projevy (paraneoplastická dermatomyozitida, různé neuromuskulární syndromy – nejčastěji opsoklonus-myoklonus-ataxie a stiff-person syndrom, acanthosis nigricans maligna, paraneoplastický hyperkalcemický syndrom u osteolytického postižení atp.) (Klener a Abrahámová, 2002).

### ***3.1.5 Diagnostické postupy a staging karcinomu prsu***

#### **Diagnostika**

Algoritmus diagnostiky karcinomu prsu se opírá o klinické vyšetření, které je zcela obligátní a jeho součástí je i pečlivě odebraná rodinná, osobní a gynekologická anamnéza. Při fyzikálním vyšetření je nutno klást důraz na popis vlastního nálezu. Asymetrie prsou, nesouhryb s dechovou exkurzí, charakter kožního krytu nad tumorem, změny barvy, palpační bolestivost, stav bradavek s případnou patologickou sekrecí již pohledem mohou na diagnózu navést. Palpačně pak zjišťujeme velikost tumoru, jeho umístění dle kvadrantů prsu, dále posuzujeme vztah, ohraničení rezistence vůči okolí, její palpační konzistenci a pohyblivost. Současně vyšetřujeme a hodnotíme nález v obou axilách, supra- a infraklavikulárních prostorech. Statisticky nejčastějším výskytem tumoru je horní zevní kvadrant – 47 %, dále oblast bradavky – 22 %, horní vnitřní kvadrant – 14 %, dolní zevní kvadrant – 7 % a konečně dolní vnitřní kvadrant – 2 % (Klener a Abrahámová, 2002).

Zobrazovací metody se v senologii staly nepostradatelnou součástí diagnostického postupu. Dominantní postavení má mamografie (MMG), která má celkovou senzitivitu 87–90 % a specificitu kolem 97 % (Banks a spol., 2004). Rozlišujeme mamografii diagnostickou a screeningovou. Pozitivními skiografické nálezy bývají patrné mikrokalcifikace či solidní ložisko s cípatými okraji. Dnes se za vyšetřovací standard považuje celoplošná digitální MMG, v interpretaci nálezů často s použitím automatického systému detekce (computed-

aided detection) (Singh a spol., 2008). Přibližně 10–15 % hmatných tumorů prsu ale nemá při mamografii přesvědčivý korelát. Ultrasonografie (USG) je vyšetření zpravidla doplňkové k mamografii, má vysokou senzitivitu (96 %), ale omezenou specificitu (Lehman a spol., 2012). Má přednost u žen mladších 40 let, u žen gravidních a kojících, u nálezů mamograficky nerozhodných, k vyšetření spádových uzlin a pooperačnímu sledování jizvy. Pro neschopnost detekce mikrokalcifikací není vhodná pro screening. Často se využívá u navigace bioptických vyšetření (FNAB, core biopsie). K dalším stereotakticky navigovaným metodám patří vakuem asistovaná mamotomie a hlavně mamografická stereotaxe, která je vhodná k lokalizaci, biopsii nehmatných a USG neverifikovaných ložisek s možností jejich perkutánního předoperačního nebo neoadjuvantního značení. Duktografie (galaktografie) má své místo při verifikaci intraduktálních lézí (papilom, DCIS) a je indikována u jednostranné masivní serózní či sangvinolentní sekreci z prsu. MR prsu (MR mamografie) je metoda vyhrazena pro upřesnění nejednoznačných nálezů, punkčních nálezů lobulárního karcinomu či karcinomu v denzním prsu k vyloučení multifokality či bilaterality, u pacientek po výkonu k odlišení jizvy a recidivy karcinomu, dále pak k hledání primárního karcinomu při axilárním uzlinovém postižení a jako screeningová metoda u žen s vysokým rizikem (spolu s USG a později i s MMG). Benigní prsní změny mohou ale vést k falešně pozitivním výsledkům (Van Goethem a spol., 2004). Indikace CT má uplatnění zejména v posouzení změn v okolí maligního tumoru. Mezi fakultativní vyšetření patří PET a  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi scintigrafie, které jsou schopné rozlišit útvary nenádorové etiologie a jsou vhodné k diagnostice metastáz ve vnitřních mamárních uzlinách. U metastatického postižení a taktéž v rámci dispenzarizace je nezbytnou samozřejmostí použití základních vyšetřovacích metod radiologie – RTG plic, USG břicha a scintigrafie skeletu (Klener a Abrahámová, 2002).

Základní panel biochemického vyšetření (jaterní testy, urea, kreatinin, elektrolyty) sice nemá diagnostickou vypovídající hodnotu, ale jeho dynamika může vypovídat o aktivitě a průvodních komplikacích základního onemocnění. Vyšetření hladin tumorových markerů je mnohem významnější, i když jejich specificita je poměrně nízká. Účelem jejich stanovení je hlavně monitorace průběhu onemocnění, tzn. sledování remise a šance na časný záchyt relapsu a odhalení recidivy v dispenzární péči. Pro karcinom prsu jsou nejdůležitější zejména humorální tumorové markery, konkrétně s tumorem asociované antigeny diferenční: CA 15-3, CEA a proliferační: TPA/TPS, MCA (Nezbeda, 2012). Stanovení hormonálních receptorů z cytosolu nebo imunohistochemicky z tkáňových řezů se přikládá mimořádný význam. Vyšetření ER/PR má prediktivní význam citlivosti tumoru na zvažovanou hormonoterapii. Značný prediktivní a prognostický význam má i stanovení onkoproteinu

HER-2/neu, jehož elevace dokládá zvýšenou proliferační aktivitu. Z dalších celulárních tumorových markerů se jako vedlejší sleduje katepsin D.

Pro odhad tolerance protinádorové terapie je důležité hematologické vyšetření. Vyšetření kostní dřeně (nejlépe ze sternální punkce či trepanobiopsie) dává přesnější představu o hematopoéze než pouhé vyšetření krevního obrazu. Na odhalení přítomnosti nádorových buněk, tj. minimální reziduální choroby, specifickými monoklonálními protilátkami se používají metody imunohistochemické (biomarkery: cytokeratin, EMA, TAG-72 a mamaglobin A) a PCR (alelově specifická, spojená s reverzní transkripcí) (Klener a Abrahámová, 2002).

Význam molekulárně biologických vyšetření, především určení mutace BRCA1 a 2 a stanovení receptorů pro HER-2/neu, je v textu již zmíněn. Pouze doplňkový význam má pak vyšetření nebo určení jiných biomarkerů – receptorů rodiny EGF, proteinu p53 a angiogenezních faktorů VEGF, FGF.

Pro stanovení diagnózy mají rozhodující význam invazivní vyšetřovací postupy – bioptická vyšetření. Pro cytologické rozlišení cystického a solidního tumoru se používá punkce tenkou jehlou (FNAB). Histologické a receptorové vyšetření je možné pouze z dostatečného odběru samořeznou (Bardovou, Tru-Cut) jehlou při tzv. core biopsii (CNB) v lokální nebo celkové anestezii. Otevřená chirurgická biopsie po předchozím označení tumoru pod USG nebo mamografem je indikována v případě nehmavných lézí. Rozsah operačního výkonu často vychází z výsledků peroperační biopsie – rychlého histologického vyšetření ze zmraženého řezu. Za nejbezpečnější diagnostický postup je ale považována operační biopsie při radikální exstirpaci celého tumoru (Klener a Abrahámová, 2002).

Užitečnost vyšetření suspenze nádorových buněk průtokovou cytometrií spočívá v možnosti stanovení velikosti růstové frakce a ploidie. Tumory s vysokou proliferační aktivitou, tj. agresivnějším chováním, jsou charakteristické aneuploiditou a vysokým podílem buněk ve fázi S. Hodnocení proliferační aktivity by se mělo provádět jako rutinní součást vyšetření každého karcinomu prsu. Imunohistochemická detekce antigenu Ki-67 (příp. PCNA, E-cadherinu) za použití protilátky MIB-1, je považována za metodu spolehlivou a optimální k určení proliferačního indexu (% MIB-1+ buněk), který dobře koreluje s gradem karcinomu a s prognózou vlastního onemocnění (Skálová a spol., 2012).

Komplexní diagnostika karcinomu prsu se soustřeďuje hlavně do akreditovaných screeningových center, která disponují všemi hlavními vyšetřovacími metodami, velkou erudicí odborného personálu, kvalitním technickým vybavením s možností pravidelných kontrol. Primárně je zajišťována radiologem – mamodiagnostikem, ale úzká týmová



spolupráce s gynekologem, chirurgem, onkologem, radioterapeutem, patologem aj. je nezbytně nutná.

## Staging

Staging karcinomu prsu se určuje podle TNM klasifikace založené na popisu anatomického rozsahu onemocnění. Klinická klasifikace (cTNM) primárního tumoru (T), postižení regionálních lymfatických uzlin (N) a přítomnost vzdálených metastáz (M) jsou znázorněny v **Tabulce 4**. Patologická klasifikace (pTNM) vyžaduje resekci a histologické vyšetření alespoň dolních axilárních lymfatických uzlin (I. etáž). Taková resekce má standardně zahrnovat 6 a více lymfatických uzlin. Za klinicky zřejmou se považuje uzlina, u které je suspekce metastatického postižení zjištěna klinickým vyšetřením nebo zobrazovacími vyšetřovacími metodami (Sobin a spol., 2002).

**Tabulka 4.** Klinická TNM klasifikace karcinomu prsu

T – primární tumor	
TX	primární tumor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního tumoru
Tis	karcinom <i>in situ</i> (DCIS nebo LCIS)
T1	tumor ≤ 2 cm v největším rozměru
T1mic	mikroinvaze ≤ 0,1 cm v největším rozměru
T1a	tumor velký 0,1–0,5 cm v největším rozměru
T1b	tumor velký 0,5–1 cm v největším rozměru
T1c	tumor velký 1–2 cm v největším rozměru
T2	tumor velký 2–5 cm v největším rozměru
T3	tumor ≥ 5 cm v největším rozměru
T4	tumor jakékoliv velikosti s přímým šířením do stěny hrudní (žebra, mm. intercostales, m. serratus anterior, ne však mm. pectorales) nebo pouze do kůže
T4a	tumor se šířením na stěnu hrudní
T4b	edém (včetně peau d'orange) nebo ulcerace kůže prsu nebo satelitní kožní uzly omezené na týž prs
T4c	kritéria 4a a 4b dohromady
T4d	inflamatorní karcinom
N – regionální lymfatické uzliny	
NX	regionální uzliny nelze hodnotit (např. dříve odstraněné)
N0	v regionálních uzlinách nejsou metastázy

N1	metastázy v pohyblivé stejnostranné axilární uzlině/uzlinách
N2	metastázy ve fixované stejnostranné axilární uzlině/uzlinách, nebo klinicky zřejmá stejnostranná vnitřní mamární uzlina/uzliny, bez klinicky evidentních metastáz v axilárních uzlinách
N2a	metastázy v axilárních uzlinách/uzlině, fixovaných navzájem nebo k jiným strukturám
N2b	metastázy pouze v klinicky zřejmých vnitřních mamárních uzlinách/uzlině, bez klinicky evidentních metastáz v axilárních uzlinách
N3	metastázy ve stejnostranných uzlinách podél a. mammae interna
N3a	metastázy v infraklavikulární uzlině/uzlinách
N3b	metastázy ve vnitřních mamárních a axilárních uzlinách
N3c	metastázy v supraklavikulární uzlině/uzlinách
<b>M – vzdálené metastázy</b>	
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy přítomny (plicní, kostní dřeň, kostní, pleurální, jaterní, peritoneální, mozkové, nadledvinkové, uzlinové, kožní a jiné)

*Zdroj: Sobin a spol., 2002*

Vedle morfologické diagnózy má určení klinického stadia klíčový význam pro volbu terapeutické modality. Spolu s průměrným pětiletým a desetiletým přežitím jsou jednotlivá klinická stadia rozdělena v **Tabulce 5**.

**Tabulka 5.** *Klinická stadia karcinomu prsu (včetně průměrného přežití)*

Stadium	TNM	5leté přežití [%]	10leté přežití [%]
0	Tis N0 M0	100	98
I	T1 N0 M0	80	65
IIA	T0 N1 M0	60	45
	T1 N1 M0		
IIB	T2 N0 M0	50	48
	T2 N1 M0		
IIIA	T3 N0 M0	35	20
	T0 N2 M0		
	T1 N2 M0		
IIIB	T3 N1 M0	35	20
	T3 N2 M0		
	T4 jakékoliv N M0		
	jakékoliv T N3 M0		

Stadium 0 tak představuje karcinom *in situ*, stadium I a IIA společně reprezentují časné stadium karcinomu prsu, stadia IIB až IIIB spadají již do lokálně pokročilého stadia – bez vzdáleného rozsevu a konečně pokročilé stadium karcinomu prsu – s prokázanými vzdálenými metastázami – u klinického stadia IV.

### 3.1.6 Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prsu

Při rozhodovacím procesu vhodnosti terapie hrají vliv jak prediktivní, tak prognostické faktory. Prognostické faktory jsou odrazem biologických vlastností tumoru a předpovídají průběh onemocnění bez terapeutické intervence; nevypovídají o tom, jak léčit, ale koho léčit na základě stupně rizika progresu onemocnění v čase. Současně tak stanovují pravděpodobné vyhlídky nemocné na dobu a kvalitu přežití (prognostický odhad). Prediktivní faktory, většinou biomarkery, jsou naproti tomu v přímé spojitosti s terapeutickým efektem a napovídají, jaký druh adjuvantní terapie zvolit (prediktivní odhad). Vzhledem k tomu, že se význam prognostických a prediktivních faktorů v praxi většinou vzájemně překrývá, budou zde zmíněny společně. Studované prognostické faktory zahrnují několik desítek molekulárních cílů, z nichž některé jsou perspektivními kandidáty pro budoucí klinické využití. V souvislosti s prognózou karcinomu prsu je v literatuře uváděno více než 750 faktorů (Klener a Abrahámová, 2002). Základní prognostické a prediktivní faktory využívané při terapeutických rozhodnutích jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

**Tabulka 6.** *Základní prognostické a prediktivní faktory u pacientek s karcinomem prsu*

Adjuvantní terapie	Neoadjuvantní a paliativní terapie
	věk
	přítomnost hormonálních receptorů (ER, PR) v tumoru
	exprese/amplifikace HER-2/neu v tumoru
klinické stadium	výkonnostní stav nemocné
postižení axilárních uzlin	rozsah onemocnění
velikost primárního tumoru	
typing	rychlost progresu onemocnění
grading	

U časného klinického stadia karcinomu prsu se před zahájením adjuvantní terapie zvažuje několik základních prognostických faktorů – velikost primárního tumoru, rozsah postižení spádových lymfatických uzlin, grading, histologický typing tumoru a hormonálně-proteinový expresní profil tumoru, tj. stupeň exprese hormonálních receptorů a exprese/amplifikace onkogenu HER-2/neu. HER-2/neu pozitivita ve spojení s horšími výsledky adjuvantní chemoterapie (zvláště režimů bez nebo s nízkými dávkami antracyklinů) je některými autory považována za slabý prognostický faktor (Hayes a Thor, 2002). Doplňujícími faktory jsou proliferační index (exprese Ki-67), stupeň perivaskulární a lymfatické invaze. Nemolekulární predikce, založena pouze na klasických patologicko-anatomických faktorech, má pro volbu chemoterapie svá úskalí. Jedním z nich je riziko overtreatmentu. Cílené rozlišení mezi nemocnými s nízkým (středním) a vysokým rizikem rozvoje vzdálených metastáz a lepší identifikace žen, u kterých lze očekávat benefit adjuvance, přináší vyšetření genomového profilu. Genomické testování tedy zlepšuje stratifikaci pacientek (Petruželka, 2014). V současné době je možné pro stanovení míry rizika rekurence časných stadií využít několika genomových analýz, např. MammaPrint 70, PAM50, EndoPredict, Oncotype DX a další. Doposud největší klinickou evidenci a analytickou validaci má test Oncotype DX Breast Cancer Assay (Schneider a spol., 2014). V posledních letech se ukazuje, že posouzení imunitní reakce na nádorový proces (tzv. Imunoscore – pomocí kvantifikace cytotoxických a paměťových T-lymfocytů v jádře tumoru a jeho okrajích) může mít prognosticky větší výpovědní hodnotu než rutinně zavedená TNM klasifikace (Galon a spol., 2014). K posuzování prognostických faktorů byly navrženy různé systémy. Velmi nápomocným a u DCIS používaným je aktualizovaný Van Nuys (University of Southern California) prognostický index, který je považován za statisticky signifikantní determinant lokální rekurence a slouží jako hodnotné vodítko při určování možného profitu nemocné z adjuvantní radioterapie (Gilleard a spol., 2008).

Klinická predikce přežití pacientek s pokročilým stadiem karcinomu prsu se kromě jejich věku, resp. ovariální funkce, a již zmíněného hormonálně-proteinového expresního profilu tumoru rovněž odvíjí od dalších prognostických faktorů, které bezprostředně vyplývají z aktuálního rozsahu onemocnění. Patří k nim hlavně performance status pacientek a symptomy asociované s paraneoplastickým anorekticko-kachektizačním syndromem. Výpovědní hodnota některých nespecifických symptomů (dušnost, delirantní stavy) a obecných faktorů biologické povahy (leukocytóza, lymfocytopenie a elevace CRP) je nižší (Maltoni a spol., 2005).

Další podrobná interpretace významu a váhy jednotlivých prognostických a prediktivních faktorů je nad rámec této práce.

### **3.1.7 Terapie karcinomu prsu**

Karcinom prsu je klinicky nesmírně heterogenní onemocnění – tumory nemocných ve stejném klinickém stadiu a identickou morfologií mohou mít odlišné biologické chování, přičemž klinická heterogenita je způsobena genetickou variabilitou jak nemocných, tak tumoru. Proto se hledají nástroje, které by umožnily větší individualizaci terapie, tedy identifikaci pacientů, u nichž bude vybraná terapie přinášet benefit a současně minimum nežádoucích účinků. Namísto konceptu stejné terapie pro všechny pacienty se stejnou diagnózou a klinickým stadiem se dnes uplatňuje koncept správné terapie pro správného pacienta, tzn. „na míru šité“ onkoterapie.

V terapii karcinomu prsu se v dnešní době využívá všech dostupných terapeutických modalit. Jejich vhodný výběr, kombinace a naplánování u jednotlivých typů karcinomu prsu s přihlédnutím k prognostickým faktorům a stadiu pokročilosti onemocnění předpokládá hlubokou teoretickou znalost a multidisciplinární týmovou spolupráci (Schlag a spol., 2005). Algoritmy racionální terapie se v klinické praxi odvíjí především od klinického stadia, nicméně, je nutné si uvědomit, že všeobecně platný návod aplikovatelný za všech okolností možné podat není. Adjuvantní terapie (radioterapie, chemoterapie, hormonoterapie) probíhá většinou ambulantně, hospitalizace je nutná pouze v případě komplikací terapie nebo při velké vzdálenosti bydliště pacientky od onkologického centra. V terapii všech malignit je velmi důležitá komplexní léčba a karcinom prsu nejsou výjimkou. Velký pokrok v terapii karcinomu prsu je výsledkem kombinace chirurgické a komplexní onkologické terapie. Multimodální léčbu u karcinomu prsu v současnosti využívá téměř 74 % nemocných (Heroková a Gatěk, 2012).

#### **Chirurgická terapie**

Operační eradikace tumoru prsu patří mezi nejstarší terapeutické přístupy a dlouho znamenala jen jedinou terapeutickou možnost. Milníkem terapie karcinomu prsu je rok 1882, kdy William Stewart Halsted jako první popsal tzv. „kompletní“ operaci – radikální mastektomii. Kromě vlastní resekce mléčné žlázy výkon doplnil o resekci obou mm. pectorales, exentraci všech tří etáží regionálních lymfatických uzlin axily *en bloc*, resekci torakodorzálního nervově-cévního svazku a n. thoracicus longus. Tento typ operace se považoval za standard skoro 100 let (Ghossain a Ghossain, 2009). Halstedtova amputace

vycházela z principu lokální chirurgické radikality, nevnímala diagnózu karcinomu prsu jako onemocnění systémové, čemuž odpovídaly i dlouhodobé výsledky. Funkčně i esteticky značně mutilující Halstedovou radikální mastektomií postupně s významem dalších terapeutických metod (chemoterapie, radioterapie) nahradily postupy chirurgicky méně radikální. Z ablativních výkonů nyní převažuje modifikovaná radikální mastektomie (dle Maddena, dle Pateyho – se zachováním mm. pectorales), z druhé samostatné incize doplněna o axilární disekci, která je její nedílnou součástí. Standardním požadavkem exenterace je 10–12 uzlin, z toho minimálně 6 z I. řádu (nad m. pectoralis minor). Získání informace o stavu axilárního lymfatického systému, resp. predikce eventuálního metastatického postižení uzlin, je výkonem předně stagingovým s prognostickým významem. Někteří autoři nedoporučují exenteraci axily provádět bez biopsie sentinelové lymfatické uzliny (SLN) v prvním kroku (Veronesi a spol., 2010). Metoda detekce SLN je dnes u karcinomu prsu považována za standardní postup. Spolehlivost při kombinaci lymfoscintigrafie a značení metylénovou modří se pohybuje v rozpětí 98–100 %, rizikem je ale možná existence tzv. skipping metastáz ve vyšších oddílech axily (Engelová, 2005). Význam biopsie parasternálních uzlin má zatím pouze experimentální charakter (Strnad, 2010). Modifikovaná radikální mastektomie je indikována pro tumory rozsahu T2, tumory rozsahu T1 v případě kontraindikace konzervativního výkonu, u pacientek si tento výkon výslovně vyžadujících, při recidivě tumoru po prs šetřícím výkonu a u mužů. Díky maximálně možné redukci (až 95 %) parenchymu žlázového tělesa je nespornou výhodou tohoto přístupu snadnost následní lokoregionální kontroly choroby, která s sebou přináší malý výskyt takto zjištěných recidiv (do 3 %) (Engelová, 2005).

Od subkutánní mastektomie bylo pro riziko ponechání reziduí části prsní tkáně a retroareolárních ductů zcela upuštěno. To samé, i když o něco menší riziko, přináší i kůži šetřící mastektomie, kdy se tkáň žlázy odstraňuje *en bloc* s areomamárním komplexem z areolární incize. Areomamární komplex se posléze nahrazuje kožním ostrůvkem na transponovaném muskulárním laloku, což je časově a technicky náročné a vyžaduje úzkou praktickou spolupráci s plastickým chirurgem. Správně provedena kůži šetřící mastektomie se radikalitou a minimálním reziduem mléčné žlázy může vyrovnat radikální mastektomii a provádí se jako profylaktická operace pro LCIS, DCIS a u nositelek mutace BRCA genů bilaterálně. Stejná indikační kritéria má i totální mastektomie (Abrahámová, 2002).

Tzv. záchovné (prs šetřící) výkony jsou vyvrcholením snahy o co nejlepší funkční pooperační výsledky a co nejmenší nárůst psychosociální morbiditý nemocných, samozřejmě při maximálním možném terapeutickém efektu (Luini a spol., 2007; Monteiro-Grillo a spol., 2005). Kvadrantektomie (dle Veronesiho, segmentální mastektomie), kdy se spolu s tumorem

odstraňuje i kůže, okolní prsní parenchym s minimálním lemem 2 cm a doplňuje se výkonem na lymfatickém systému axily, je vhodná u T1–2 tumorů o velikosti do 3 cm. Pro T1 tumory je metodou volby i lumpektomie (tumorektomie), což je pouhá široká excize tumoru s nejméně centimetrovým bezpečnostním lemem. Po parciálních výkonech na prsu je standardně indikována adjuvantní radiace zbylého prsního parenchymu s cílem 50 % snížení (jinak až 30 %) rizika vzniku lokoregionální recidivy (Engelová, 2005).

Rekonstrukční výkony po mastektomii jsou neoddelitelnou součástí komplexní péče o nemocné s karcinomem prsu. Zlepšují QoL nemocných a představují rozsáhlé spektrum operačních výkonů, vlastní provedení je v plné dikci plastického chirurga (Heroková a Gatěk, 2012). Posuny laloků z autologních tkání, implantace laloků na volné stopce nebo ještě častější implantace syntetických materiálů jsou jen některé z možností prsní remodelace. Plastické rekonstrukční výkony jsou po amputacích indikovány většinou až v druhé době, tj. po ukončení adjuvantní terapie (cca 2–5 let) v terénu spolehlivé remise. Načasování dále záleží i na trofickém stavu tkání hrudní stěny, neboť v této lokalizaci předcházeli primární onkochirurgický výkon a většinou i radiace (Abrahámová, 2002). Otázka vhodnosti bezprostřední rekonstrukce prsu po kůži šetřící mastektomii u pokročilých stadií karcinomu zůstávala dlouho kontroverzní. Podle soudobých prospektivních kohortových studií je ale metodou efektivní a onkologicky bezpečnou – lokoregionální rekurence onemocnění a incidence vzdálených metastáz vychází v porovnání s výkony bez rekonstrukce srovnatelně (Foster a spol., 2002; Heneghan a spol., 2011).

U lokálně pokročilého karcinomu – při nedostatečnosti nebo kontraindikaci neoadjuvantní terapie, u rozsáhlých lokálních recidiv po ablacích, v mnohdy ozářeném terénu, se uplatňuje sanační mastektomie. Patří mezi výkony paliativní, vlastní prognózu onemocnění sice neovlivní, ale odstraněním krvácejících, secernujících, páchnoucích a infikovaných tumorozních mas až do okrajů zdravé tkáně s bezpečným uzávěrem vzniklého defektu přispívá k zlepšení QoL nejen pacientky, ale také jejího bezprostředního okolí (Engelová, 2005).

Časování chirurgického výkonu se velmi obecně řídí následujícím standardním protokolem. U časných karcinomů prsu (Tis, T1–2) je primární terapeutickou modalitou chirurgický výkon, po němž zpravidla následuje adjuvantní onkoterapie. U karcinomů pokročilých (T3–4) a u erysipeloidního karcinomu výkonu zpravidla předchází neoadjuvantní onkoterapie a chirurgický výkon je indikován až ve druhé době – rozsah a radikalita tohoto výkonu jsou pak závislé od míry úspěšnosti předchozí neoadjuvance. Tento obecný protokol není fixní, existuje řada výjimek, vyplývajících např. z individuálního posouzení tumoru, stavu celé prsní žlázy a axilárních uzlin a, samozřejmě, z přihlednutí na osobní i rodinné

rizikové faktory pacientky. To je důvod, proč je dnes stanovení optimálního komplexního terapeutického postupu záležitostí do určité míry individuální a je žádoucí, aby plynulo z rozhodnutí kvalifikované multidisciplinární onkokomise (Engelová, 2005).

## **Radioterapie**

Karcinom prsu nepatří k výrazně radiosenzitivním tumorům. Radiorezistence je většinou získaná a představuje tak velkou limitaci radiační terapie (Li a spol., 2012). Další limitací je negativní lokoregionální účinek záření.

S kurativním záměrem je radioterapie indikována pouze u tumorů dobře ohraničených ve formě adjuvantní teleradioterapie. Jako zdroje vysokoenergetického záření se používají lineární urychlovače (záření X) a izotopové ozařovače (záření  $\gamma$ ). V minulosti patřila ke standardnímu postupu, ale bylo dokázáno, že neprodlužovala přežití (Klener a Abrahámová, 2002). Pro její schopnost omezit incidenci lokoregionálních recidiv se dnes používá zejména jako doplňující terapie po konzervativních operačních výkonech ihned po zhojení operační rány; dále u T3 tumorů a/nebo u nemocných v III. klinickém stadiu po ukončené adjuvantní chemoterapii. Indikace adjuvantní chemoterapie po mastektomii se řídí rizikem vzniku lokální recidivy. Axila se ozařuje pouze při neúplném odstranění uzlin I. a II. etáže, po provedené disekci axily se ozařují pouze uzliny III. etáže. Celková dávka představuje 50–65 Gy, klasická frakcionace je navržena na 5 frakcí týdně po 2 Gy po celkovou dobu 5–7 týdnů. Počet frakcí závisí od dávky – je menší při vyšší dávce anebo naopak větší při nižší dávce. Určení objemů záření je závislé na rozsahu tumoru, který je nutno verifikovat pomocí zobrazovacích metod (CT, MR, PET/CT). Vlastní zevní radioterapie využívá 3D konformaci, která umožňuje minimální poškození okolní tkáně (Heroková a Gatěk, 2012). K dosycení nádorového lůžka u rizikových tumorů – k dosažení tzv. boost efektu – lze využít možnosti brachyradioterapie formou intersticiální aplikace iridiových drátků nebo peroperační iradiace rychlými elektrony (Šlampa a spol., 2008). V praxi to znamená navýšení dávky o 10–20 Gy.

Jedním z cílů neoadjuvantního ozáření je downstaging a přesun lokálně pokročilého tumoru z kategorie inoperabilní do kategorie operabilní (Klener a Abrahámová, 2002). Jako postup paliativní je kromě toho radioterapie rezervovaná pro malignity neodpovídající na systémovou onkoterapii a taktéž v terapii lokálních recidiv a metastáz do skeletu, CNS. V modulaci kostního bolestivého syndromu má paliativní radioterapie nadále nepostradatelné uplatnění (Feyer a Steingraeber, 2012; Souchon a spol., 2009).

Nelze opomenout nežádoucí reakce po radioterapii. Akutní postradiační reakce začínají během ozařovací série a mohou přetrvávat i několik týdnů po ukončení radiace. Projevují se erytémem, kožní deskvamací, příp. exfoliací až ulcerací, predilekčně v kožních



záhybech submamární rýhy. Výskyt radiační dermatitidy se udává u 85–95 % pacientů (Salvo a spol., 2010). Akutně je stále hrozbou i postižení vzdálených orgánů, zejména rozvoj akutní pneumonitidy, ischemické choroby srdeční, ezofagitidy, ve větším odstupu pak riziko hypotyreózy, postižení brachiálního plexu a osteoradionekrózy ramenního kloubu. Na druhé straně, chronické postradiační reakce se objevují až po měsících i letech po ukončení radioterapie. Projevují se hyperpigmentací, chronickou atrofickou dermatitidou, podkožní fibrózou, lokálním edémem a lymfedémem horní končetiny. Postradiační morphea circumscripta je jevem vzácným, ale diferenciatně diagnosticky důležitým, protože může být mylně považována za kožní metastázu nebo lokální recidivu onemocnění (Alhathloul a spol., 2012).

## **Chemoterapie**

Význam chemoterapie v terapii karcinomu prsu je dán jejím systémovým účinkem. V současnosti je pro toto onemocnění známo kolem 40 užívaných cytostatik s prokázanou účinností. Účinnost jednotlivých cytostatik použitých v monoterapii se pohybuje mezi 20–65 %, proto se v klinické praxi používá převážně kombinovaná chemoterapie. Cytostatická monoterapie (používají se hlavně taxany) je užitečná zejména u starších žen s omezenou medulární rezervou (Abrahámová, 2002).

Adjuvantní chemoterapie se s kurativním záměrem podává u lokalizovaných forem onemocnění, u Tis však indikována není. Nejčastěji je adjuvance aplikována po předchozí radikální chirurgické terapii, případně radioterapii. Cílem je likvidace tzv. zbytkové nemoci, tj. zničení předpokládaných kryptogenních nádorových mikroložisek, ve výsledku prodloužení beznádorového intervalu a prodloužení celkového přežití. Dá se kombinovat s terapií hormonální. Z farmakodynamického hlediska lze většinu cytostatik rozdělit do dvou skupin: cytostatika účinná v průběhu celého cyklu a cytostatika účinná jen v některé fázi buněčného cyklu. Cytotoxické účinky různých chemoterapeutik mají různý mechanismus účinku – od zasahování do nejrůznějších metabolických procesů až po blokaci enzymatických systémů. Z antimetabolitů se nejčastěji využívají antifolika (např. metotrexát, raltitrexed), dále pak analoga pyrimidinů (např. 5-fluorouracil a jeho „prodrug“ p. o. forma capecitabin – Xeloda, Roche), analoga aminokyselin. Své místo v chemoterapii mají i inhibitory ribonukleotidreduktázy, alkylační cytostatika (z alkylaminů např. cyklofosamid, deriváty nitrosomočoviny), interkalační cytostatika (antracyklinová antibiotika, aktinomycin). Inhibitory topoizomerázy I a II mají v použití u karcinomu prsu jen význam omezený. Přírodní alkaloidy izolované z barvínku menšího (vinkristin, vinblastin, vinorelbin), z tisu červeného (docetaxel) a tisu tichomořského (paklitaxel) patří do skupiny mitotických jedů.

Nejčastější režim adjuvantní chemoterapie je 6 cyklů kombinace CMF: cyklofosamid + metotrexát + 5-fluorouracil nebo kombinace s antracykliny. Cykly se opakují každé 3 týdny, trvání celkové terapie je 4–6 měsíců (Abrahámová, 2002). Vysokodávkovaná chemoterapie s následnou autologní transplantací kostní dřeně nebo progenitorových buněk z periferní krve je vhodná pro pacientky ve vysokém riziku a s chemosenzitivním tumorem. Souhrn standardů v klinické onkologii dle EBM (medicíny založené na důkazech), informace o standardních léčebných postupech jsou u nás periodicky aktualizovány a s platností publikovány v Modré knize České onkologické společnosti. Ačkoliv převažuje pozitivní efekt chemoterapie, její nežádoucí účinky mohou být někdy samotnou limitací. K nejzávažnějším a pro většinu cytostatik společným nežádoucím účinkům patří leukopenie a trombocytopenie. Frekventní je i nauzea, emeze, vypadávání vlasů až alopecie; ostatní – mukozitidy, kardiotoxicita, nefrotoxicita, neurotoxicita, ototoxicita a plicní toxicita – jsou časté méně.

Pro nemocné s pokročilým, ale technicky operabilním primárním tumorem s případným postižením lymfatických uzlin je určena neoadjuvantní chemoterapie, jejímž předoperačním cílem je downstaging. Pro neoadjuvanci je osvědčená zejména kombinace FAC: 5-fluorouracil + doxorubicin + cyklofosamid (Klener a Abrahámová, 2002).

Paliativní chemoterapie je určena pro diseminovanou formu karcinomu prsu. Nemá kurativní efekt, ale může navodit prodloužení přežití bez známek progresu a přežití celkového. Ve snaze o zabránění vzniku rezistence se podávají dvě různá cytostatika v tzv. sekvenčním podání dvou režimů. Další variantou je intenzifikovaná chemoterapie s krátkými intervaly mezi jednotlivými cykly, která se zpravidla neobejde bez podpory hemopoetickými růstovými faktory. Bisfosfonáty (např. klodronát, pamidronát) a monoklonální protilátky typu denosumab, tj. farmaka ovlivňující kostní metabolismus, jsou indikovány při zjištění osteolytických, osteoplastických nebo smíšených metastáz do kostí. Regionální intraarteriální chemoterapie je v současné době vyhrazena pro terapii jaterních metastáz. V terapii kožních metastáz se osvědčila lokální chemoterapie – v p. o. formě se podává fosfolipidový přípravek miltefosin (Miltex, Baxter), který byl původně určen k terapii leishmaniózy (Klener a Abrahámová, 2002).

### **Hormonální terapie**

Hormonální terapie patří mezi nejstarší způsoby terapie karcinomu prsu. Odpovídá na ni přibližně jedna třetina všech pacientek s metastatickým postižením (Abrahámová, 2002). Diagnostikovaná exprese hormonálních receptorů na povrchu nádorových buněk umožňuje ovlivnění progresu tumoru. Cílem hormonální terapie je odstranění růstového faktoru tumoru – estrogenů. Možnost dosažení remise závisí od denzity hormonálních receptorů, v

neselektivních souborech dosahuje hormonoterapie remise u 30 % pacientek a zastavení progresu u 40 % (Heroková a Gatěk, 2012). Vlastní mechanismy účinku jsou dva. Prvním je blokáda estrogenních receptorů – antiestrogenní působení jako blokáda růstu buněk závislých na estrogenní stimulaci; druhým je cytostatické a cytocidní působení přímo na nádorové buňky nebo prostřednictvím růstových faktorů. Po zahájení hormonální terapie může ve 3–9 % dojít k objevení a zvýraznění paraneoplastických symptomů – k syndromu vzplanutí nemoci, tzv. flare-up fenoménu. Objektivní odpověď hormonoterapie se dostavuje minimálně za 6–8 týdnů. Při dobré účinnosti se v terapii doporučuje pokračovat až do relapsu, kdy je nutno nasadit hormonální přípravek druhé, event. třetí řady (Abrahámová, 2002). Hormonální terapie má své místo v neoadjuvanci, adjuvanci i paliaci. Možnosti eliminace účinků estrogenů, tj. způsoby hormonální terapie jsou konkrétně tyto: ablativní, kompetitivní, inhibiční a aditivní.

Synonymem ablativní terapie je ovariectomie, která je vhodným řešením pro nemocné v premenopauzálním věku (spodní hranicí je věk 35 let) s pozitivními ER, kdy u 20–30 % pacientek dosahuje kompletní remise trvající až 1 rok, medián trvání odpovědi je delší než 8 měsíců. Kastrace se dá provést cestou chirurgickou, radiační a medikamentózní. Dříve prováděná adrenalectomie a hypofyzektomie jsou metody dávno obsoletní, k medikamentózní ovariectomii se podávají analoga gonadoliberinů (např. goserelin). Odpověď u metastatického karcinomu prsu se pohybuje v rozmezí 32–50 %. Výhody medikamentózní ovariectomie jsou reverzibilita účinku a jednoduchá aplikace – 1× za 28 dní s. c.

Principem kompetitivní terapie je kompetitivní antagonismus o vazebné místo na ER buňky. Z antiestrogenů má největší uplatnění tamoxifen (Nolvadex, AstraZeneca), který kromě své hlavní indikace má i účinek antihypercholesterolemický a i nezanedbatelný vliv antiosteoporotický. Při vyšších dávkách může způsobovat retinopatii. Celková doba užívání (včetně chemoprevence) se nyní již postupně posunuje nad doporučenou hranici 5 let (Petrelli a spol., 2013). Novějším lékem je fulvestrant, který působí jako čistý antagonist a způsobuje down regulaci ER (Kansra a spol., 2005).

Inhibiční terapie funguje jako blokáda biosyntézy estrogenů v periferních tkáních (tuk, játra, svaly) a nadledvinkách u nemocných s vyřazenou tvorbou ovariální. Inhibitory aromatáz vedou k depleci estrogenů, a to buď cestou selektivní, nebo neselektivní. U neselektivních inhibitorů aromatáz je nutná substituční terapie ostatních steroidů, zejména kortizolu. Z nesteroidních se nejčastěji indikují anastrozol a letrozol, ze steroidních formestan a exemestan. Mezi steroidními a nesteroidními inhibitory neexistuje zkřížená rezistence (Abrahámová, 2002).

Podání farmakologických dávek progestinů zpětně inhibuje hypofyzární sekreci gonadotropinů, a tím snižuje hladinu estrogenů. To je východiskem terapie aditivní. Vhodnou cílovou indikační skupinou jsou pacientky v postmenopauze, kde kurativní odpověď dosahuje 28–45 %. Megestrol acetát (Megace, Bristol-Myers Squibb) má navíc výrazný účinek anabolický, což se mj. uplatňuje i v terapii anorexie a kachexie (Abrahámová, 2002; Heroková a Gatěk, 2012).

### **Biologická terapie**

Na rozdíl od cytostatik je biologická terapie cílená. Biologická farmaka působí jako modifikátory imunitní odpovědi. Podávají se často v kombinaci s chemoterapií. Velmi účinným představitelem biologické terapie je trastuzumab (Herceptin, Genentech/Roche), jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku namířenou proti HER-2/neu receptoru. Trastuzumab je účinný u tumorů s prokázanou overexpresí/amplifikací HER-2/neu receptorů a je považován za největší přínos v adjuvantní terapii karcinomu prsu. Pro synergní účinek s taxany a s platinovými deriváty jsou tyto kombinace vhodné. Z jeho vedlejších účinků nutno zmínit kardiotoxicitu, možnou přítomnost tzv. chřipkových symptomů (cefalea, myalgie, febrilie či třesavka), časté alergické reakce v místě injekční aplikace, po dlouhodobém podávání i zvýšené riziko oportunních infekcí (Abrahámová, 2002).

Prostřednictvím inhibice tyrozinkinázy působí lapatinib (Tyverb, Macmillan), proto je účinný u metastatických tumorů, u kterých selhala terapie trastuzumabem. Podává se p. o. a má dobrý průnik do CNS, je více toxický. Nově je pro terapii karcinomu prsu schválen bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche), který tlumí angiogenezi vazbou a neutralizací VEGF (Heroková a Gatěk, 2012).

### **Imunoterapie**

Imunoterapie je často spojována s biologickou terapií, protože „klasickým“ přístupem k biologické terapii je využití monoklonálních protilátek proti jednotlivým receptorům. Cílem imunoterapie je stimulovat přirozenou protinádorovou imunitu, popř. stimulovat imunitní systém tak, aby byl proti tumoru imunní. Aplikace nadějně se jevící protinádorové vakcíny Theratope (Biomira) v stěžejní III. fázi klinického zkoušení u metastatického postižení při karcinomu prsu nakonec nepřinesla slibné výsledky (Zeichner, 2012). Po II. fázi testování je nyní např. nová vakcína NeuVax (Galena Biopharma) s účinnou látkou nelipepimut-S (dříve známý jako E75) potencovaná přidáním faktorem stimulujícím granulocyto-makrofágové kolonie (GM-CSF). Vakcína by měla být určena k prevenci recidiv u rizikových nemocných v stadiu remise (Schneble a spol., 2014).

## **Následky terapie a rehabilitace**

Poléčebné změny po terapii karcinomu prsu jsou natolik specifické, že si vyžadují stručnou zmínku. Postmastektomický algický syndrom se vyskytuje u 4–10 % žen po chirurgickém výkonu na prsu. Může se objevit bezprostředně, již první pooperační dny, ale i v odstupu několika měsíců. Projevuje se parestéziemi a hypestéziemi, kterých organickým podkladem je poškození interkostobrachiálních nervů. U pacientek tak podvědomě antalgicky často dochází k vývoji syndromu zmrzlého ramene (periarthritis humeroscapularis). Postradiační fibróza v okolí plexus brachialis algický syndrom potencuje (Klener a Abrahámová, 2002). Serom komplikuje hojení operační rány v asi 20 % (Engelová, 2005). Relativně častou komplikací axilární lymfadenektomie je lymfedém horní končetiny. Do 2–5 let od operace se vyskytuje až u 40 % pacientek (Engelová, 2005). Zanedbaný ireverzibilní lymfedém může vést až ke vzniku elefantiázy nebo lymforey.

Terapie lymfedému je velmi svízelná a má jen omezené možnosti. I přesto může důsledná a včasná komplexní rehabilitace tyto iatrogeně způsobené problémy zmírnit (Klener a Abrahámová, 2002). Výsledky kombinace fyzioterapie a farmakoterapie jsou optimální. Komplexní dekongestivní terapie zahrnuje manuální a přístrojovou lymfodrenáž, kompresivní terapii, jednoduché a vícevrstvé bandáže, kompresivní návleky, pohybová a dechová cvičení, hydroterapii (chladná vířivka i cvičení v bazénu), hygienu kůže a adekvátní životní režim. Z farmak je metodou volby systémová proteolytická enzymoterapie, sekundární účinkem působí venofarmaka a zcela okrajový význam mají i diuretika (Wald a Váchová, 2009).

### ***3.1.8 Prevence, screening a dispenzarizace karcinomu prsu***

#### **Prevence**

Časný záchyt a detekce, sledování rizikových skupin žen a zvyšování efektivity terapie jsou prioritní. Minimálně v 18 % případů je terapie pouze paliativní či symptomatická, což pramení z pozdní diagnostiky karcinomu prsu (III. a IV. stadium). V ČR je takto diagnostikováno až 40 % všech nemocných. Doba stanovení diagnózy od první návštěvy lékaře je více než u poloviny případů do tří týdnů (Klener a Abrahámová, 2002). Primární prevence je zde prakticky nemožná – karcinom prsu není preventabilní tak, jak je modelově známo např. u bronchogenního karcinomu (eliminace kouření) nebo karcinomu močového měchýře (vylovení expozice některým specifickým profesionálním kancerogenům). Je tedy třeba se zaměřit na prevenci sekundární. Časný záchyt prsní malignity tak zůstává zatím nejúčinnější preventivní zbraní. Nejjednodušší a mediálně nejvíce propagovanou metodou je

pravidelné měsíční samovyšetřování vlastních prsou. Efektivita samovyšetřování se posuzuje velmi obtížně, a to proto, že závisí hlavně na individuální dovednosti provádět tuto metodu. Rozhodnutí, zda byl karcinom odhalen právě touto metodou, takřka možné není. Samovyšetření však může upozornit na nejružnější abnormality, které pak vedou k dovyšetření. Rozsáhlé studie s tamoxifenem ukázaly, že chemoprevence může přispět k normalizaci prekancerózních změn v prsu (Cuzick, 2008).

## **Screening**

Screening (forma aktivní depistáže) má svou nepostradatelnou roli především v možnosti signifikantního snížení mortality u stadia karcinomu *in situ*. Program organizovaného mamografického screeningu v ČR existuje od roku 2002. Odesílání žen na toto vyšetření se věnuje vyhláška MZ ČR č. 70/2012 Sb., o preventivních prohlídkách. Doporučený standard pro poskytování screeningu karcinomu prsu a provádění diagnostické mamografie upravuje Věstník MZ ČR č. 4/2010. Skríníngová mamografie představuje vyšetřování zdravých žen od určitého věku s cílem odhalit co nejvíce nehmotných malých tumorů s dobrou prognózou – u nás je hrazena pojišťovnou u asymptomatických žen věku nad 45 let jednou za 2 roky a jen v akreditovaných centrech. Při užívání hormonální substituční terapie je toto vyšetření vhodné jednou ročně, při zvýšeném riziku (BRCA, rodinná anamnéza) již v mladším věku a častěji. Mamografické screeningové i diagnostické nálezy se klasifikují tzv. systémem BI-RADS, který souvisí s názorem i zkušeností vyšetřujícího radiodiagnostika a rozhoduje o následném postupu diagnostiky, vyšetření i kontrol (Eberl a spol., 2006). Kategorie spadají do rozsahu BI-RADS 0–6.

## **Dispenzarizace**

Dispenzarizace začíná po ukončení komplexní léčby karcinomu prsu. Její úkolem je časně odhalení lokální recidivy onemocnění, duplicity tumoru či vzniklé vzdálené metastázy. Časové schéma kontrol je následující – první rok: dispenzarizační prohlídky každé 3 měsíce, druhý až třetí rok: prohlídky dvakrát ročně, třetí až pátý rok: jedenkrát ročně, po pěti letech: doporučení dispenzarizační prohlídky jednou ročně doživotně. Součástí tohoto dispenzarizačního vyšetření je vyšetření klinické, laboratorní vyšetření krevních tumorových markerů, RTG plic, mamografie nebo ultrazvukové vyšetření prsu a jizev, scintigrafie skeletu, USG jater a vyšetření gynekologické. Ne všechna vyšetření jsou prováděna při každé kontrole (Heroková a Gatěk, 2012).

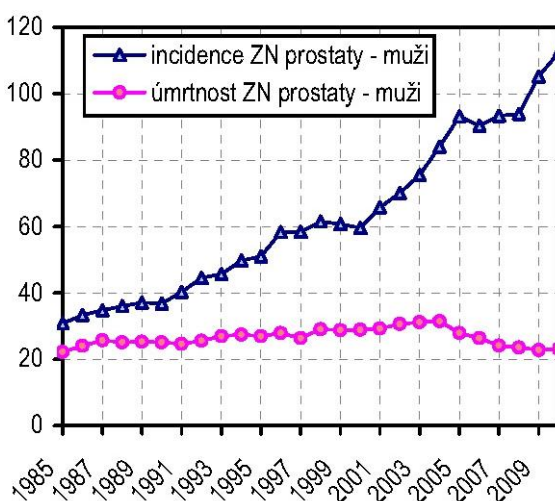
## 3.2 KARCINOM PROSTATY

### 3.2.1 Epidemiologická a demografická analýza karcinomu prostaty

#### Incidence

Karcinom prostaty (dg. C61 dle MKN-10 klasifikace) je s výjimkou jiných kožních tumorů již od roku 2005 nejčastější malignitou mužů – tvoří tak 15 % všech mužských malignit (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013). Bez ohledu na pohlaví je čtvrtým nejčastějším typem malignity vůbec. Tumory prostaty mají významnou rasovou, geografickou a věkovou distribuci. Nejvyšší incidence karcinomu prostaty je ve více rozvinutých regionech světa, tj. v Austrálii, Severní Americe a v západní a severní Evropě, což je vysvětlováno jednak obecným stárnutím populace a z velké části podmíněno i rozšířením samotného screeningu – vyšetřování hodnot prostatického specifického antigenu (PSA) u starších mužů (Ferlay a spol., 2014). Rapidní nárůst incidence karcinomu prostaty v ČR je pozorován již od začátku 90. let, po roce 2000 došlo ještě k jeho akceleraci. Incidence onemocnění se za posledních dvacet let více než ztrojnásobila (**Graf 2**), což z něj činí problém celospolečenský.

**Graf 2.** Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na karcinom prostaty u mužů v ČR (v letech 1985–2010, přepočten na 100 000 osob, evropský standard)



Zdroj: ÚZIS ČR, 2013

Tento strmý trend incidence v ČR kopíroval i rok 2010, kdy oproti roku 2009 došlo až k 10% nárůstu (incidence 131,2/100 000 mužů) – celkem bylo nově hlášeno 6 771 případů karcinomu prostaty (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013). S přihlédnutím na věkový standard se incidence v ČR umístila na 34. celosvětovém místě (Ferlay a spol., 2014). Do 40 let věku se karcinom prostaty vyskytuje raritně. Incidence stoupá po 45. roku života a svého vrcholu

dosahuje ve věkové skupině 80–85 let, průměrný věk při diagnóze karcinomu prostaty je 71 let (Dušek a spol., 2014). Důležité je podotknout, že díky zavedenému screeningu jsou v současnosti častěji odhalena i časná stadia karcinomu, klinicky dosud nemá, která by se za jiných okolností ještě nezjistila. Na straně druhé, v pokročilém stáří se manifestuje mnoho dalších komorbidit, které mohou být potenciální příčinou smrti dříve, než se klinicky karcinom prostaty vůbec manifestuje. Počet klinicky zjištěných případů nevyjadřuje reálnou incidenci – na určitý podíl latence karcinomu prostaty mají jistý vliv náhodná histologická zjištění po operacích pro původně benigní adenomatózní hyperplazii prostaty a nálezy sekční.

### **Mortalita**

Na rozdíl od vesměs pozitivních trendů u jiných malignit mortalita na karcinom prostaty bohužel za posledních 30 let stoupla téměř šestinásobně (Dušek a spol., 2014). Screeningové celoplošné testování PSA ovlivnilo mnohem víc incidenci, mortalitu jen minimálně – ta se celosvětově velmi neliší (Ferlay a spol., 2014). Míra standardizované úmrtnosti od roku 2004 sice v ČR pomalu klesá, přesto v roce 2010 oproti roku 2009 stoupla z 22,8 na 23,1 zemřelých mužů na 100 000 mužů (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013). Tento pozitivní trend nelze z dlouhodobého hlediska pojmenovat jinak než stagnačním a tato fakta (nejen u nás) vedou k analýzám indikací používaných terapeutických modalit. Celosvětově na karcinom prostaty umírá až 307 000 mužů, což z této diagnózy činí pátou nejčastější onkologickou příčinu úmrtí (Ferlay a spol., 2014). Relativní pětileté přežití dosahuje u pacientů průměrné hodnoty 88 %, pozorované přežití jen hodnoty do 70 % (ÚZIS ČR a NOR ČR, 2013); tyto hodnoty tak dokumentují nárůst nově diagnostikovaných případů s benignějším vlastním průběhem onemocnění.

### **Prevalence**

V roce 2011 u nás činila prevalence 772,9/100 000, tj. 39 866 žijících mužů s anamnézou tumoru prostaty.

#### ***3.2.2 Etiologie, patogeneze a rizikové faktory karcinomu prostaty***

##### **Etiologie a patogeneze**

Etiologie není známa. Karcinom prostaty se od ostatních solidních tumorů odlišuje svým biologickým chováním. Roste pomalu – má dlouhou generační dobu a léta se nemusí měnit. Stejně jako karcinom prsu, je adenokarcinom prostaty taktéž primárně hormonálně dependentním tumorem. Normální prostatický epitel je tvořen třemi fenotypicky odlišnými



populacemi buněk (tzv. kompartmenty) – buňky luminální, bazální a neuroendokrinní. Dále je ještě prokazována čtvrtá, nehomogenní populace buněk intermediálních. Všechny tyto linie procházejí z buněk prostatických kmenových (Schalken a van Leenders, 2003). Jednotlivé kompartmenty epitelu se liší vnímavostí vůči androgenům.

Základním hormonálním stimulem replikace prostatické buňky je testosteron, resp. jeho biologicky výrazně účinnější forma – dihydrotestosteron (DHT). Enzymem, jenž katabolizuje tuto redukci testosteronu na DHT, je 5 $\alpha$ -reduktáza. Testosteron je z více než 90 % produkován Leydigovými buňkami varlete, jen malá část androgenů je produkována nadledvinou a testosteron tak může ještě vznikat periferní konverzí ponejvíce v kůži a tukové tkáni. Produkci testosteronu na základě jeho plazmatické koncentrace zpětnovazebně ovlivňuje systém hypotalamo-hypofyzární, regulátory jsou luteotropní hormon a jeho releasing hormon. DHT se na povrchu prostatické buňky váže na androgenní receptory (AR), je transportován intracelulárně a iniciuje kaskádu dějů. Výsledkem této signalizační dráhy je proteosyntéza a replikace buňky. Vliv DHT jako důležitého mitogenního faktoru proliferace epitelu na růst bazálních buněk je nepřímý. Stromální buňky po stimulaci DHT reagují parakrinní sekrecí růstových faktorů. Charakteristickým znakem luminálních buněk prostaty je produkce PSA. Sérové koncentrace PSA korelují s objemem žlázy a do značné míry i s rozsahem tumoru (Babjuk a Matoušková, 2009). Neporušená činnost hypotalamo-hypofyzární osy je základní podmínkou pro potenciální vznik karcinomu prostaty.

Zárodečné mutace jsou odhadem za vznik karcinomu prostaty odpovědné u více než 40 % mužů (Klener a Abrahámová, 2002). Další kancerogeneze v prostatě je procesem postupným, s mnohostupňovou akumulací dalších genetických změn za multifaktoriálního působení okolí (androgeny, zevní prostředí). Znalost kaskády těchto genetických změn usnadňuje porozumění principu některých nově zaváděných terapeutických modalit. Předpokladem kancerogeneze je zárodečná mutace chromozomu 1q v oblasti lokusů 24–25, vyjádřena alterací genu HPC-1 kódující protein syntaxin-1A (Grönberg a spol., 1999). Kumulativní poškození DNA probíhá ve třech etapách. V amfotropní fázi dochází zvýšenou metylací DNA k poklesu exprese GST (glutathion-S-transferázy), která má význam nejen pro detoxikaci kancerogenů, ale též pro opravu replikačních chyb DNA – morfologickým výsledkem je vznik epiteliální prekancerózy, tzv. PIN (prostatická intraepitelová neoplazie). Druhá fáze – klonální – je charakterizovaná sníženou expresí tumorsupresorového genu NKX3-1 (He a spol., 1997) s následnou mutací dalších supresorových genů (PTEN, Rb, p53, p27<sup>Kip1</sup>). Spolu s delecí metastázy supresorových genů pro E-cadherin a pro KAI1 dochází k vzniku pokročilého karcinomu prostaty. Poslední, heterotrofní fáze dává vznik hormonálně nezávislému, metastazujícímu karcinomu, který je výsledkem porušené funkce samotných

androgenních receptorů (na podkladě exprese onkogenů Myc, Ras a exprese telomerázy a genu Bcl-2). Autokrinně do průběhu této složité kaskády zasahují i další látky tvořené a uvolňované z vlastních nádorových buněk – např. EGF, TGF, VEGF, ET-1 a IL-6 (Klener a Abrahámová, 2002).

### **Rizikové faktory**

Nejvýznamnějšími rizikovými faktory vzniku karcinomu prostaty jsou tedy vlivy genetické. Familiární výskyt zvyšuje riziko při jednom postiženém 3×, resp. 5–11× u dvou a více postižených. Hereditární závislost je autozomálně dominantní a karcinom prostaty zde diagnostikujeme v nižších věkových skupinách. Rodinnou zátěž uvádí přibližně 15 % nemocných (Steinberg a spol., 1990), u některých z nich je diagnostikována mutace v genech BRCA2 (Mersch a spol., 2015). Vedle genetických predispozic a vyššího věku se významně uplatňují výživa a dietetické návyky (obezita), jejich vlivu je připisován 30–40% podíl na vzniku karcinomu prostaty (Babjuk a Matoušková, 2009). Vyšší spotřeba ovoce a zeleniny je spojena s nižším rizikem onemocnění. Snížení rizika onemocnět lze také dosáhnout chemopreventivními látkami – retinoidy, selenem a lykopenem (Cohen, 2002). Z dalších rizikových faktorů se uvádí časně zahájená a nadměrná sexuální aktivita spojená s promiskuitou, expozice radioaktivními materiály, rtutí a kadmii, některými pesticidy a umělými hnojivy (Klener a Abrahámová, 2002). Americká prospektivní observační studie u 5366 mužů, která probíhala v letech 1986–2006, prokázala, že kouření v době diagnózy karcinomu prostaty souvisí jak s vyšší celkovou a kardiovaskulární mortalitou, tak také s vyšší mortalitou specifickou pro karcinom prostaty, rovněž také s vyšším rizikem rekurence karcinomu prostaty (Kenfield a spol., 2011). Karcinom prostaty (a stejně ani benigní hyperplazie prostaty) nejsou popisovány u mužů kastrovaných před nástupem puberty a u osob s deficitem 5 $\alpha$ -reduktázy (Isaacs, 1992). Etnikum jako rizikový faktor onemocnění karcinomem prostaty hraje v incidenci také roli. Nejnižší pozorujeme u Japonců, vyšší u bělochů a nejvyšší u černochů – především u populace v USA (Woods a spol., 2004). Příměrně se v tomto pořadí totiž setkáváme se stoupajícími průměrnými koncentracemi DHT v uvedených etnických skupinách (Wu a spol., 1995).

### **3.2.3 Histopatologické typy, biologické chování a grading karcinomu prostaty**

#### **Histopatologické typy (typing)**

Prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN) patří mezi premaligní afekce prostaty. Její low grade forma se vyskytuje spíše v mladších věkových kategoriích, tj. kolem třetí dekády,

kdežto procento high grade PIN vzrůstá společně s věkem. Jde o prekancerózu, která je lokalizována především (až v 70–75 %) v periférii prostaty, zvláště v dorzálním laloku prostaty, často multifokálně (Klener a Abrahámová, 2002). PIN, jinými názvy jako intraduktální dysplazie, velkoacinární atypická hyperplazie, atypická primární hyperplazie, hyperplazie s maligními změnami, dukto-acinární dysplazie, je definována jako intraluminální proliferace sekretorických buněk s cytologickými atypii, místy neodlišitelnými od buněk karcinomu. Přítomnost cytologické atypie bez zvýšené celulizace je možná. Rozeznávají se následující architektonické varianty PIN: „trsovité“ (tufting), mikropapilární, kribriformní a plochá (Hes a spol., 2011).

Histologický vzhled adenokarcinomu prostaty se liší podle gradů. Obecně platí, že adenokarcinom prostaty je tvořen malými nahloučenými žlázkami, které jsou relativně uniformní, ale výrazně se lišící od svého okolí, někdy vytvářející glomeruloidní struktury. Žlásky podezřelé z invaze karcinomem jsou žlásky infiltrující mezi jednoznačně benigní žlásky, dále glandulární struktury tvořící pruhy, splývající ve větší celky či naopak jednotlivé buňky mezi normální prostatickou tkání. Vysoce suspektní je, nepodaří-li se prokázat bazální vrstvu buněk. Cytologicky je pro karcinom prostaty charakteristická jaderná polymorfie, nápadná jádérka a četné mitózy. Dále pro tuto dg. hovoří nález buněk s výrazně odlišnou cytoplasmou než v okolních benigních žlázkách a buněk s amfofilní a vodojasnou cytoplasmou. V lumen postižených žlázek se nachází modravý hlen, jemně vločkovitý růžový materiál, krystaloidy či nekrotická hmota. Zvýšenou pozornost při histopatologickém rozboru je nutno věnovat okolí PIN (Hes a spol., 2011). Dle klasifikace WHO z roku 2004 je epiteliální tumory prostaty možné dělit na dvě základní skupiny: acinární adenokarcinom („klasický“ adenokarcinom) a duktální adenokarcinom prostaty (Eble a spol., 2004). Výčet většiny variací karcinomu prostaty je uveden v **Tabulce 7**.

**Tabulka 7.** *Histopatologická variace karcinomu prostaty*

Karcinom prostaty	Histopatologické varianty
acinární	atrofický, pseudohyperplastický, pěnitý (foamy), koloidní (mucinózní), z prstenčitých buněk, onkocytární, karcinom podobný lymfoepiteliomu (medulární)
duktální	kribriformní, papilární (endometroidní), solidní
ostatní	karcinom z přechodného epitelu (uroteliální), dlaždicobuněčný (adenoskvamózní), bazocelulární (adenoidně-cystický), neuroendokrinní (malobuněčný, nediferencovaný, karcinoid), komedokarcinom, sarkomatoidní (metaplastický, karcinosarkom), fyloidní tumor

Acinární adenokarcinom je zdaleka typem nejčastějším (až v 90–95 %), vzniká ze sekrečních buněk prostatických acinů (Klener a Abrahámová, 2002). Duktální typ tvoří jen 0,2–0,8 % adenokarcinomů prostaty. Kromě jeho pravděpodobně horší prognózy než u klasického typu, jeho odlišení valný význam pro klinickou praxi nemá (Hes a spol., 2011). Dále se v prostatě mohou vyskytnout tumory uroteliálního původu – primární uroteliální karcinom prostaty je také velmi vzácný, převážná většina případů má souvislost s uroteliálním karcinomem močových cest. Ostatní epiteliální tumory, stejně jako tumory odlišné histogeneze, postihují prostatu neporovnatelně vzácněji a přesahují rámec tohoto sdělení.

### **Biologické chování**

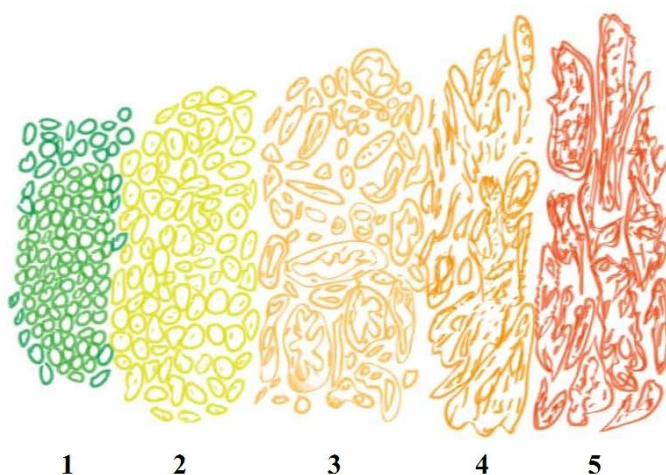
Z typického místa vzniku karcinomu prostaty, tj. z periferní zóny žlázy, se karcinom šíří *per continuitatem* do dalších částí prostaty – po průniku pouzdrem lokálně invaduje do semenných váčků a na spodinu močového měchýře, při progresi onemocnění pak vrůstá do rekta a pánevního dna. Lymfogenní šíření nejprve postihuje uzliny obturatorové jámy, později uzliny perivezikální, hypogastrické a posléze paraaortální. Postižení „nesplavových“ uzlinových oblastí není časté, není však vyloučeno. Krevní cestou karcinom prostaty metastazuje hlavně do osového skeletu (typicky obratlů), proximálních konců dlouhých kostí (femur), pánve a kalvy (Klener a Abrahámová, 2002). Ve více než 80 % se jedná o metastázy osteoplastické. Metastázy do měkkých tkání jsou relativně vzácné (Babjuk a Matoušková, 2009), vyskytují se zhruba u 20–40 % pacientů. Viscerální metastázy jsou ještě vzácnější, postihují 5–10 % nemocných. Týkají se hlavně metastatického postižení plic a jater. Sekundární postižení ledvin, nadledvin, pankreatu, mozku či omenta jsou přímo raritní (Procházková-Študentová a Študent, 2012).

### **Grading**

Pro gradování prostatického adenokarcinomu existuje řada klasifikačních systémů. TNM systém rozlišuje 4 stupně: G1–4. Nejčastěji používaným je ale gradingový systém podle Gleasona (Gleason, 1966), který od svého uvedení do praxe prošel již několika revizemi (Delahunt a spol., 2012). Tento systém využívá morfologických vlastností žlázek při malém zvětšení a na podkladě celkové architektiky nádorové tkáně určuje stupeň její diferenciacce, a tím i agresivitu tumoru. Na pětistupňové škále (**Obrázek 1**) se posuzuje primární (nejvíce zastoupený) a sekundární (druhý nejčastější) Gleasonův grade; jejich součtem je vytvořeno Gleasonovo skóre. Vedou se diskuse o tom, zda má smysl stanovovat tzv. terciální grade (třetí nejvíce zastoupený), v současné době se tento příliš často nevyužívá – výjimkou je hodnocení špatně diferencované části tumoru při radikálních prostatektomiích, kde má pro pacienta

nepříznivý prediktivní význam (Trock a spol., 2009). Při hodnocení vzorků z biopsie prostaty se pak uvádí součet nejzastoupenějšího a nejhůře diferencovaného Gleasonova gradu. V případě, že je diferenciací tkáně uniformní, zjištěný stupeň se násobí dvěma. Naopak, dobře diferencované části tumoru je možné při hodnocení Gleasonova skóre ignorovat, pokud zaujmají méně než 5 % tumoru ve vzorku (Epstein a spol., 2005). Biopsické Gleasonovo skóre koreluje poměrně dobře se skóre z radikální prostatektomie (Acimovic a spol., 2013). Gleasonovo skóre  $\leq 6$  a skóre  $\geq 7$  se v 80 % shoduje mezi jehlovou biopsií a radikální prostatektomií, přičemž skóre nad 7 se považuje už za vysoce rizikové (Klener a Abrahámová, 2002). Spojitost mezi Gleasonovým skóre a prognózou tumoru je významná a v sumaci s klinickým stadiem jeho signifikance jako dlouhodobého prognostického faktoru ještě narůstá. Relativně příznivé skóre je v rozpětí 2–4, rizikové 5–7, nepříznivé 8–10 (Sogani a spol., 1985).

**Obrázek 1.** Gleasonův grade – 5 stupňů diferenciací karcinomu prostaty



Zdroj: [www.prostaat.be](http://www.prostaat.be), 2013

#### 3.2.4 Klinické příznaky karcinomu prostaty

Vzhledem k faktu, že karcinom prostaty se vyvíjí převážně na periférii žlázy, jeho klinické příznaky zpočátku nejsou nikterak specifické a jsou klinicky němé. Klinicky se projevuje většinou až pokročilé onemocnění (Klener a Abrahámová, 2002). Projevy jsou různé, a pokud se příznaky vyskytují, ve své podstatě odpovídají příznakům benigní prostatické hyperplazie (Hes a spol., 2011). Lokální progresi vyvolává nejčastěji dva typy symptomů – obstrukční (retardace startu mikce, pocit postmikčního rezidua, oslabený proud moči, akutní močová retence, event. supravazikální obstrukce s rozvojem urémie) a iritační

(strangurie). Udávány jsou i možné epizody hematurie, hemospermie při invazi karcinomu do semenných váčků, erektilní dysfunkce, nespecifické pelvalgie či rektální obstrukce.

Záludnost průběhu vývoje onemocnění karcinomem prostaty spočívá v metastatických bolestech ve skeletu, jakožto známce úplně prvního projevu této malignity – takto bývá často diagnostikován při vyšetřování pacientů s metastázou neznámého tumoru. Jiné příznaky se vyskytují jen vzácně (syndrom diseminované intravaskulární koagulopatie, paraneoplastické syndromy u malobuněčné formy) (Hes a spol., 2011).

### **3.2.5 Diagnostické postupy a staging karcinomu prostaty**

#### **Diagnostika**

Subjektivní symptomatologie nemocného vede kromě odebrání anamnézy a popisu nynějšího onemocnění k dalšímu dovyšetření pacienta. Obligátní diagnostickou metodou je digitální vyšetření per rectum (p. r.). Indagačně je přístupná pouze třetina povrchu prostaty. I když se považuje za nepostradatelnou součást vyšetření, počáteční stadia onemocnění neodhalí. Jako samostatná diagnostická metoda je vyšetření p. r. v rukou zkušeného urologa senzitivní přibližně v 55,8 % (Schröder a spol., 1998).

Transrektální USG (TRUS) je nadále v diagnostice karcinomu prostaty metodou nepostradatelnou. Umožňuje posouzení objemu tumoru, jeho vztahu k okolním strukturám (kapsula prostaty, semenné váčky, rektum) a v neposlední řadě i cílenou systematickou jehlovou biopsii. TRUS slouží dále jako endoskopická navigace při některých výkonech terapeutických, zejména při brachyterapii, kryoterapii. Nevýhodou stereotaktické TRUS je její nižší senzitivita a specificita, což často způsobuje poddiagnostikování nálezu – v porovnání s konvenční, chirurgickou biopsií, více než 50 % TRUS-navigovaných biopsií v diagnostice malignity selhává (Zhang a spol., 2015). V dnešní době se kromě klasické TRUS používá kontrastní USG a dynamická ultrazvuková elastografie. Interpretace ultrasonografického nálezu je často obtížná. To bylo důvodem vývoje nových systémů rozlišení maligních struktur od benigních na podkladě počítačové analýzy (např. AUDEX, 3D mapování, HistoScanning apod.) (Beerlage a spol., 2001; Macek a spol., 2014).

Přínos CT břicha a malé pánve je patrný v ozřejmění lokoregionálního postižení, k bližší charakteristice vlastního tumoru prostaty však nepřispěje (Klener a Abrahámová, 2002). Naproti tomu vyšetření MR dokáže upřesnit velikost ložiska a jeho vztah k okolí až v konkordanci 74,2 % v následném porovnání vyšetřeného resekátu (Min a spol., 2014). Novinkou je fúze MR/USG, která v sobě spojuje výhody preintervenční magnetické rezonance a periintervenční ultrasonografie – nabízí obraz s vysokým rozlišením s možností

snadné punkční biopsie (Zhang a spol., 2015). Z dalších zobrazovacích metod jsou k přesnější lokalizaci tumoru a případných metastáz nápomocné PET a SPECT vyšetření. Uroflowmetrie a vylučovací urografie mají význam u obrazu supravazikální obstrukce a při diferenciálně-diagnostickém dovyšetřování hematurie. K detekci kostních metastáz je důležitým vyšetřením scintigrafie skeletu – oproti RTG vyšetření tak činí s podstatným předstihem. RTG plic a USG jater slouží k odhalení metastáz plic a jater (Klener a Abrahámová, 2002).

Stanovení PSA – prostatického specifického antigenu má z laboratorních vyšetření význam největší. Fyziologické hodnoty koncentrace PSA kolísají v závislosti na věku (v 5. dekádě 4,1 ng/ml, v 6. dekádě 5,6 ng/ml a v 7. dekádě 7,6 ng/ml) a korelují s velikostí (objemem) prostaty (na každý g (ml) prostaty se koncentrace sérového PSA zvyšuje o 4 %). Každá traumatizace prostaty (palpace, biopsie prostaty, rektoskopie, jízda na kole/koni apod.), tj. porušení bazální membrány prostatického epitelu, arteficiálně až na dobu několik týdnů zvyšuje hodnoty PSA. PSA je také zvýšený při adenomatózní hyperplazii prostaty. K odlišení od karcinomu se používají některé odvozené parametry. PSA velocita je definována jako vzestup PSA mezi dvěma odběry, nejčastěji v rozmezí 1 roku. U karcinomu se hladina PSA zvyšuje rychleji (až o  $> 0,4$  ng/ml/r). Pojem PSA denzita je chápán jako poměr koncentrace celkového PSA a celkového objemu prostatické žlázy. Koncentrace PSA se při stejné velikosti žlázy zvyšuje u karcinomu rychleji než u benigní hyperplazie. Dalším parametrem je poměr volného PSA (fPSA) k celkovému PSA (tPSA) – fPSA/tPSA, který je nižší u mužů s karcinomem než u mužů s hyperplazií prostaty; vyjadřuje se jako index v procentech. K orientačnímu určení progresu karcinomu slouží tzv. doubling time PSA (generační doba), což je vypočítaná doba zdvojnásobení koncentrace PSA – v počátcích růstu tumoru se pohybuje mezi 2–4 roky (Klener a Abrahámová, 2002).

Další laboratorní vyšetření v diagnostice karcinomu prostaty mají jen omezenou specificitu. Stanovování prostatické frakce kyselé fosfatázy a hlavně sledování její změny nemají význam primárně diagnostický, ale zato dobře korelují s progresí nemoci u metastatického postižení, kdy může dosahovat hodnot až 200 nkat/l (norma: 0–108 nkat/l) (Long a Prout, 1992). Hladina kostního izoenzymu alkalické fosfatázy se také zvyšuje u kostních metastáz, slouží tak jako užitečný stagingový marker k časnému odhalení osteoplastického procesu. Patologické koncentrace kolem 50  $\mu$ kat/l (norma: 0–1,1  $\mu$ kat/l) zdaleka nejsou výjimečné (Wirtz a spol., 1998).

Monoklonální protilátky proti membránovému PSA zažívají v současnosti v diagnostice nádorových ložisek opět svou renesanci, jejich použití v běžné klinické praxi je ale nadále otázkou dalšího výzkumu (Tykvart a spol., 2014). Radionuklidem  $^{111}\text{In}$  značená protilátka kapromab pendetidu (CYT-356, Prostascint) se v nukleární medicíně používá ke

zpřesnění stagingu a lokalizaci rekurentního karcinomu extraprostaticky (Levesque a spol., 1998). K relapsu malignity se někdy doporučuje i stanovení urokinázy (uPA), k jejímuž vzestupu dochází dříve než k vzestupu PSA (Klener a Abrahámová, 2002). Význam stanovení exprese chromograninu A v bioptickém vzorku někteří autoři spatřují v možnosti časně predikce hormonální rezistence (Khan a Ather, 2011). Za zmínku stojí ještě průkaz zvýšené koncentrace secerninu-1 a vinkulinu v moči. Tyto nové biomarkery jsou potencionálně vhodné ke stanovení diagnózy karcinomu prostaty, resp. určení její prognózy (Geisler a spol., 2015).

Nejvýznamnějším vyšetřením k definitivnímu potvrzení diagnózy je systematická biopsie prostaty. Odběr se provádí v lokální anestezii transrektálně nebo transperineálně buď speciální aspirační Franzenovou jehlou, nebo za pomoci bioptické pistole (biopsy-gun) zakončenou dvojitou punkční jehlou. Pod USG kontrolou se odebírá 10, 12 nebo 16 reprezentativních vzorků. Protokol s 10-core biopsií je u prvního vyšetření z hlediska výtěžnosti histologického vyšetření plně dostačující (Chambó a spol., 2014).

## Staging

Staging karcinomu prostaty je umožněn na základě provedených klinických a paraklinických vyšetření. K určení stupně pokročilosti onemocnění se používá třídění podle TNM klasifikace, které je zobrazeno v **Tabulce 8** (Edge a Compton, 2010; Cheng a spol., 2012; Sobin a spol., 2002; Tobisu, 2005). V ideálním případě by klinický staging (cTNM) měl spolehlivě předpovídat následný staging patologický (pTNM), tj. po provedené prostatektomii. Tumory prostaty jsou soudobě ve více než v 50 % případů klinicky „podstageované“ (Hoedemaeker a spol., 2000), až 35–40 % tumorů primárně klasifikovaných jako lokálně ohraničené (T2) bývá co do rozsahu podhodnocena (Babjuk a Matoušková, 2009).

**Tabulka 8.** *Klinická TNM klasifikace karcinomu prostaty*

T – primární tumor	
TX	primární tumor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního tumoru
T1	tumor nezjistitelný klinicky, palpačně, ani zobrazovacími vyšetřovacími metodami
T1a	tumor zjištěn náhodně histologicky v $\leq 5$ % resekce
T1b	tumor zjištěn náhodně histologicky v $\geq 5$ % resekce
T1c	tumor zjištěn cíleně při punkční biopsii (např. při zvýšeném PSA)



T2	tumor omezen na prostatu (včetně apexu a kapsuly)
T2a	tumor infiltrující jeden lalok
T2b	tumor infiltrující oba laloky
T3	tumor s extrakapsulárním šířením
T3a	tumor s extrakapsulárním šířením jedno-/oboustranným
T3b	tumor infiltrující semenné vázky
T4	tumor fixován nebo se šířící do okolních struktur (mimo semenné vázky): hrdla močového měchýře, m. sfincter urethrae externus, rekta, mm. levatores ani a/nebo stěny pánevní
<b>N – regionální lymfatické uzliny</b>	
NX	regionální uzliny nelze hodnotit
N0	v regionálních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy přítomné v regionálních uzlinách
<b>M – vzdálené metastázy</b>	
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy přítomny
M1a	vzdálené metastázy přítomny v neregionálních uzlinách
M1b	vzdálené metastázy přítomny v skeletu
M1c	vzdálené (orgánové) metastázy v jiných lokalizacích

*Zdroj: Cheng a spol., 2012*

Pro určení terapeutického postupu je kromě zhodnocení rozsahu onemocnění nezbytné i stanovení stadia karcinomu prostaty. Klinické stadia mají pro pacienty i význam prognostický, ovlivňují jejich relativní přežití – viz další **Tabulka 9**. Klinické stadia I a II hodnotíme jako lokální formu onemocnění, která je zastoupená v cca 81 %. Stadium III a nemetastazující stadium IV představují regionální formu onemocnění, diagnostikovaná je přibližně u 12 % nemocných. Zbývající, metastazující, stadium IV patří již do tzv. distální formy onemocnění, vyskytující se ve 4 % (Howlander a spol., 2014). Alternativou k TNM je staging dle Whitmorea-Jewetta (Jewett, 1975; Whitmore, 1984), kde se stadia analogicky označují písmeny A–D, proto se vžil i synonymní označení „ABCD rating“. Nyní je tato klasifikace záležitostí spíše historickou (Schröder a spol., 1992).

**Tabulka 9.** *Klinická stadia karcinomu prostaty (včetně průměrného přežití)*

Stadium	TNM	5leté přežití [%]	10leté přežití [%]
I	T1 N0 M0 G1		
	T1a N0 M0 G2–4	85	
II	T1b N0 M0 jakékoliv G		
	T1c N0 M0 jakékoliv G		99
III	T2 N0 M0 jakékoliv G		
	T3 N0 M0 jakékoliv G	60	
IV	T4 N0 M0 jakékoliv G	42	
	jakékoliv T N1 M0		
	jakékoliv T jakékoliv N M1	28	

*Zdroje: Klener a Abrahámová, 2002, Howlader a spol., 2014*

### 3.2.6 Prognostické a prediktivní faktory karcinomu prostaty

Kromě prognostické významnosti Gleasonova skóre, vstupních hodnot PSA a stadia onemocnění se v úvahu berou ještě další faktory, jako je grading, zóna růstu, věk nemocného, jeho performance status, stav tělesné zdatnosti a závažnost, příp. aktuální kompenzace komorbidit (Klener a Abrahámová, 2002). Mnoho autorů nadále považuje za nejpřesnější a smysluplný marker prognózy právě předléčebnou hladinu PSA, a to bez ohledu na danou klinickou situaci (Oesterling, 1991). Tento pohled podporuje i skutečnost, že riziko onemocnění karcinomem prostaty při nízkém PSA – do 4 ng/ml – se u zdravé populace odhaduje do 27 % (Heidenreich a spol., 2011). Nutno ale zvýraznit fakt, že prognóza karcinomu prostaty je determinovaná především přítomností či absencí jeho metastáz (Bubendorf a spol., 2000). Za doplňující prognosticky významné ukazatele se např. považují i stanovení ploidity DNA (aneuploidie má horší prognózu), stanovení proliferativní aktivity, stupeň genetických abnormalit, stanovení E-cadherinu, Bcl-2 proteinu nebo průkaz 12-lipoxygenázy (Klener a Abrahámová, 2002).

Převážně v americké praxi se k určení pravděpodobnosti lokalizace tumoru pouze na prostatu (klinická stadia I–III), tj. pravděpodobnosti radikální kurability chirurgickou cestou, používají predikční tabulky – Partinův nomogram, který se před operací vypočítává z Gleasonova skóre, sérového PSA a klinického stadia (Eifler a spol., 2013). Na podobném principu jsou založeny i D'Amicovy kategorie rizika, které místo klinického stadia používají klasifikaci primárního tumoru (cT). Pacienti jsou poté zařazeni do kategorie s rizikem nízkým, středním a vysokým (D'Amico, 2001). V poslední době začíná být také zmiňována skupina pacientů s velmi vysokým rizikem (Čapoun, 2013) – tímto modifikovaná definice rizikových skupin pacientů je uvedena v **Tabulce 10**.

**Tabulka 10. Rizikové skupiny pacientů s karcinomem prostaty**

Riziková skupina	Charakteristika skupiny
nízké riziko	T1–2a a Gleason skóre $\leq 6$ a PSA $< 10$ ng/ml
střední riziko	T2b–2c nebo Gleason skóre 7 nebo PSA 10–20 ng/ml
vysoké riziko	T3a–3b nebo Gleason skóre 8–10 nebo PSA $> 20$ ng/ml
velmi vysoké riziko	T3c–4 nebo N1–3 nebo M1

Problémem použití rizikových skupin v porovnání s predikčními tabulkami je neefektivní využití dat a snížení přesnosti predikce, protože kontinuální proměnné (např. PSA) se zde kategorizují v různém rozmezí. Možná i proto se v současné medicíně stále více uplatňuje zhodnocení očekávané doby přežití pacientů (life expectancy) a jejich celkový zdravotní stav, nejčastější skórovací systémy jsou Charlson comorbidity index (Charlson a spol., 1987), Karnofsky index a ECOG skóre (Čapoun, 2013).

### 3.2.7 Terapie karcinomu prostaty

Návrh terapeutické strategie je výsledkem zhodnocení všech dat – stagingu, gradingu, věku a celkového stavu nemocného. Určující je souhlas poučeného pacienta, který ovšem z lékaře odpovědnost za další průběh nemoci nesnímá. U vysoce rizikového karcinomu prostaty je kromě terapeutické preference informovaného pacienta nutné vždy zvážení multimodálního přístupu. V případě chirurgické terapie je vhodná centralizace těchto nemocných do high volume center (Babjuk a Matoušková, 2009). U nemocných vyššího věku s dobře diferencovaným tumorem (Gleason skóre do 4 a objem do 1 cm<sup>3</sup>) je možná vyčkávací taktika (watch and wait, watchful waiting), která se realizuje formou aktivního dozoru (surveillance). Předpokladem jsou zde pravidelné 2–3měsíční kontroly (Klener a Abrahámová, 2002). Vlastní terapie se zahajuje při známkách aktivity onemocnění nebo dle přání pacienta. Jinak se využívá všech terapeutických modalit.

#### Chirurgická terapie

Radikální prostatektomie je hlavní léčebnou modalitou lokalizovaných forem karcinomu prostaty (T1–2) u nemocných s předpokládanou delší dobou dalšího života (nad 10 let). Spočívá v chirurgickém odstranění celé žlázy včetně kapsuly. Operační přístupy jsou různé – otevřený, laparoskopický, robotický; z hlediska onkologické bezpečnosti jsou tyto techniky srovnatelné (Busch a spol., 2015; Shi a spol., 2014). Obligatorně se rozšířená pánevní lymfadenektomie provádí u středně rizikových pacientů, v indikovaných případech

s preferencí nervy šetřících operačních postupů – ke snaze o zachování potence. Většinou se dává přednost radikální retropubické prostatektomii, která umožňuje lepší přehled operačního pole. Perineální přístup je preferován u starších nemocných, neboť znamená menší operační zátěž (Klener a Abrahámová, 2002). Radikální prostatektomie s rozšířenou pánevní exenterací se je indikována i u pacientů s vysokým rizikem dle D'Amica (cT3a), podmínkou je delší life expectancy. Pacienti zde musí počítat s vysokou pravděpodobností následné multimodální léčby v závislosti na patologickém nálezů a dalším průběhu onemocnění (Babjuk a Matoušková, 2009).

Tzv. záchranní (salvage) radikální prostatektomie představuje zatím jediný kurativní postup u nemocných s lokální recidivou po radiační terapii, kdy je hrozba zvýšeného rizika metastatické progresy malignity a specifické mortality vysoká (Stephenson a Eastham, 2005).

Symptomaticky lze lokálně pokročilé tumory paliativně ošetřit kryochirurgicky, tj. transuretrální instalací sondy naplněné tekutým dusíkem, anebo provedením transuretrální resekce prostaty (TURP). Mimo bilaterální subkapsulární orchiektomie (subkapsulární z kosmetických důvodů), kdy je kastrace formou ablativní hormonální terapie, se další chirurgie u pokročilých stadií neuplatňuje (Klener a Abrahámová, 2002).

## **Radioterapie**

Schopnost karcinomu prostaty reagovat na ozáření je jen relativní (Wollin a spol., 1989) a je známo, že u cca 30 % pacientů léčených potenciálně kurativními dávkami, dochází k relapsu v místě ozáření (Lövey a spol., 2013). Zevní megavoltážní radioterapie je považována za velmi užitečnou kurativní terapeutickou metodu. Ve svém konvenčním podání je však provázena značnou morbiditou (tenezmy, průjmy, dysurie) danou časnými i pozdními postradiačními změnami. Nežádoucí účinky se minimalizovaly použitím teleradioterapie. U 3D konformní radioterapie se toho docílilo díky trojrozměrnému plánování, a to za zvýšené účinnosti (De Bari a spol., 2014). Celková optimální dávka v průběhu 7–8 týdnů je kolem 70 Gy. Účinnější než používané fotonové záření je záření neutronové nebo protonové (Klener a Abrahámová, 2002). V současné době ale nejsou k dispozici data na podkladě EBM, která by použití protonové terapie u karcinomu prostaty zdůvodnili (Babjuk a Matoušková, 2009). Radioterapie s modulovanou intenzitou (IMRT) je další metodou, která efektivitu radioterapie karcinomu prostaty posiluje; do prostaty je schopná frakcionalizovaně dodat až dávku 80 Gy (Nishimura, 2014). V případě kontraindikace chirurgického výkonu, lze u lokalizovaných forem dosáhnout stejně dobrých výsledků radioterapeuticky jako operačně (Welz a spol., 2008).

Brachyterapie se používá při léčbě malých, přesně lokalizovaných tumorů, nebo jako sekundární radiační terapie k teleradioterapii u skupin se středním a vysokým rizikem (Koukorakis a spol., 2009). U lokalizovaného karcinomu prostaty se většinou aplikuje v nízkodávkových schématech, tj. s nízkým dávkovým příkonem (0,2–2 Gy/h). Při této formě brachyterapie jsou malé duté katetry dočasně zavedené přímo do nádorové tkáně. Ozařování trvá řádově desítky hodin, většinou den či dva. Další možností je jejich permanentní aplikace s vysokodávkovým režimem (s vysokým dávkovým příkonem: 12 Gy/h a více), kdy jejich aktivita postupně klesá, až se stává neměřitelnou. Recentní analýzy výhody tohoto režimu s odvoláváním se na časté poškození rektu zpochybňují (Delouya a spol., 2015). S využitím moderních technologií tato terapie umožňuje dodat prozatím nejvyšší dávku záření do prostaty s nejvyšší přesností (Morton, 2012). Radionuklidová zrna se pod USG/RTG kontrolou implantují intersticiálně do tkáně žlázy transrektálně či transperineálně. I tak problémem zůstává zaručení homogenního ozařování, proto se kurativně brachyterapie ve formě monoterapie využívá jen zřídka a není standardně uznávaná – výjimkou je salvage terapie. Jako zdroje ionizujícího záření se používají radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu:  $^{125}\text{I}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$  nebo  $^{103}\text{Pa}$  (Klener a Abrahámová, 2002).

Radioterapie s neoadjuvantní, konkomitantní či adjuvantní hormonální supresí u nemocných s nízkým rizikem nutná není. U mužů se středním rizikem se používá v krátkodobých režimech (Babjuk a Matoušková, 2009). Po operaci se adjuvantní radioterapie doporučuje u lokálně pokročilého onemocnění za účelem prevence lokální recidivy a eradikace lymfogenních mikrometastáz, kromě lůžka po prostatektomii se tak ozařují i spádové lymfatické uzliny. Paliativní radioterapie má nezastupitelné místo v komplexním managementu metastatického onemocnění. Zevní radiace kostních metastáz působí analgeticky. Ke zlepšení kvality života nemocných se takto mohou i v. použít i osteofilní radiofarmaka ( $^{89}\text{Sr}$  – Metastron, GE Healthcare,  $^{153}\text{Sm}$  – Quadramet, Lantheus Medical Imaging,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ) (Liepe a spol., 2003). Jako doplňková metoda může radioterapie sloužit i profylakticky proti ireparabilní gynekomastii, časté po estrogenní terapii. Prsa se před hormonální terapií ozařují malou dávkou (5–6 Gy) (Klener a Abrahámová, 2002).

### **Hormonální terapie**

Karcinom prostaty patří mezi hormonálně dependentní nádorové onemocnění. Je závislý na androgenech. Na rozdíl od výše popsanych, lokoregionálních metod není hormonální terapie metodou kurativní, ale má vliv na oddálení progresu. Svůj význam zastává i v terapii generalizovaného onemocnění. Řádné použití hormonální terapie snižuje morbiditu i mortalitu spojenou s karcinomem prostaty (Hellerstedt a Pienta, 2002).

Neoadjuvantní podání hormonální terapie je indikováno u lokálně pokročilého tumoru, kdy deprivací terapií můžeme docílit downstagingu – zmenšení objemu prostaty až o 36 % a tím usnadnit resekabilitu. U T2 karcinomů dochází k 20–25% poklesu pozitivivity resekcčních okrajů ve vzorcích po radikální prostatektomii (Montironi a Schulman, 1998). Na straně druhé, vzhledem k možnosti vzniku periprostatické fibrózy, která by naopak operabilitu znesnadňovala, tento postup není stále široce akceptován, ale je přípustný (Naiki a spol., 2012). Optimální trvání neoadjuvance by mělo být v rozmezí 6–8 měsíců (Babjuk a Matoušková, 2009). Adjuvantní hormonální terapie po operaci a/nebo radioterapii je indikována v případě setrvale zvýšené koncentrace PSA. Optimální doba pro její zahájení (časná vs. odložená androgenní deprivace) u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty zůstává nadále rozporupným tématem (Procházková-Študentová a Študent, 2012). U lokalizovaného onemocnění se hormonální terapie nedoporučuje, zatímco v terapii generalizovaného onemocnění je ablace hormonální manipulací naopak metodou volby (Klener a Abrahámová, 2002). V zásadě existují dva hlavní druhy hormonální terapie – použití antiandrogenů a androgenní deprivace.

Antiandrogeny mechanismem kompetitivní inhibice, kdy se váží na vazebné místo AR, působí stejně jako endogenní androgeny – způsobují intranukleární translokaci receptoru, kde v jádře navozují konformační změny, jež zabraňují jeho transkripční aktivitě. Výsledkem deplece androgenů je apoptotická regrese tumoru (Klener a Abrahámová, 2002). Bicalutamid, flutamid, nilutamid a abirateron patří mezi běžně používané antiandrogeny. Vzhledem k hepatotoxické a mutagenní limitaci cyproteron acetátu, tento nespadá mezi léky první volby (Kasper, 2001; Kim a spol., 2014). I základní antiandrogeny mohou mít řadu nežádoucích účinků. Jejich hepatotoxicita (vzestup jaterních transamináz) je závažná pouze vzácně. Dalšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální toxicita (průjmy u flutamidu) a plicní toxicita (dokonce plicní fibróza při terapii nilutamidem). Účinnou novinkou v antiandrogenní terapii je enzalutamid (preparát MDV3100) (Quintela a spol., 2015). Hormony se nejčastěji podávají kontinuálně, až do známek relapsu. Jejich samostatná aplikace je nevhodná, v návaznosti na kastraci zvyšují efektivitu terapie o 14 % (Klener a Abrahámová, 2002).

Androgenní deprivace se navozuje dvěma základními přístupy, jednak tzv. „chemickou kastrací“ pomocí agonistů hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH agonisté) nebo již výše zmíněnou kastrací chirurgickou. Základním představitelem je leuprolid, který inhibuje syntézu testikulárních androgenů, avšak bez vlivu na syntézu androgenů z jiných zdrojů (nadledviny, autokrinní sekrece nádorových buněk). Dalšími LHRH agonisty jsou goserelin, triptorelin, degarelix a buserelin. Jistým paradigmatem je zavedení LHRH antagonistů (např. abarelix, cetorexin) do praxe v úvodu terapie. Po

okamžitým potlačením účinků testosteronu abarelixem se potom standardně pokračuje v terapii LHRH agonisty (Tombal, 2012). Mechanismus účinku LHRH analog tkví v down regulaci sekrece luteinizačního hormonu s následným poklesem testosteronu na úroveň kastročních hodnot. Po navázání LHRH analogu na LHRH receptor dochází v první týden terapie k tzv. fenoménu vzplanutí (flare-up fenomén) – jeho aktivací dochází k počátečnímu vzestupu hladin testosteronu. Preventivně se nejpozději se zahájením androgenní deprivace doporučuje konkomitantně medikovat po dobu nejméně jednoho měsíce antiandrogeny, kupř. bicalutamidem (Vis a spol., 2015). Androgenní deprivace má množství nežádoucích vedlejších účinků, které se klinicky projevují jako tzv. kastroční syndrom: návaly, únava, ztráta libida, erektilní dysfunkce a zmenšení velikosti penisu, přírůstek na hmotnosti, úbytek svalové hmoty, přírůstek tukové hmoty, osteopenie a osteoporóza, gynekomastie, úbytek vousů a ochlupení, hyperlipidémie a hyperglykémie v důsledku inzulínové rezistence. Vyšší výskyt kardiovaskulárních příhod se v souvislosti s touto terapií nepotvrdil (Smith a spol., 2011). Účinnost chirurgické a chemické kastroce je stejná, výhoda podávání LHRH agonistů je reverzibilní účinek a u některých pacientů lepší psychická tolerance. Nevýhodou je cena, proto se v ČR upřednostňuje nadále orchiektomie chirurgická (Klener a Abrahámová, 2002; Procházková-Študentová a Študent, 2012). Neoadjuvantní a konkomitantní androgenní deprivace je lepší než čistě adjuvantní podání. Za optimální dobu aplikace se považuje 18 měsíců, u vysokorizikových tumorů možno terapii prodloužit (Babjuk a Matoušková, 2009).

Sekundární hormonální léčba zahrnuje použití glukokortikoidů, které působí přímou inhibicí steroidní syntézy. Jejich kýženým efektem je především paliace – navozují úlevu od kostních bolestí a mohou mít i v malé míře vliv na pokles PSA. Nejčastěji se využívá prednison v dávkování 10–20 mg/d; standardně je součástí algoritmu v terapii kastročně rezistentní formy karcinomu prostaty. Užitečné mohou být i estrogény (estramustin – Estracyt, Pfizer), kvůli obavě z tromboembolických a kardiovaskulárních komplikací se ale v současné době příliš často nepoužívají (Procházková-Študentová a Študent, 2012).

## **Chemoterapie**

Chemoterapie má místo u hormonálně rezistentních a hormonálně refrakterních tumorů, i když chemosenzitivita karcinomu prostaty je relativně omezená. Obecně není odpověď na chemoterapii větší než 30 %. Indikační kritéria zužuje často vysoký věk a špatný celkový stav pacientů. Efektivitě adjuvantně podaná chemoterapie zabraňuje vazivovým změnám po předchozí operaci nebo radioterapii, které ztěžují vlastní průnik cytostatika do místa působení. Význam cytostatické adjuvance je proto stále diskutován (Klener a Abrahámová, 2002). Jako první cytostatikum, které prokázalo klinický benefit u pacientů s

metastatickým kastročně rezistentním karcinomem prostaty a bylo jako první schváleno standardním režimem v jeho terapii, bylo interkalační cytostatikum mitoxantron (Procházková-Študentová a Študent, 2012). Z mnoha zkoušených chemoterapeutik mají v kombinovaném režimu 2. linie terapie své uplatnění alkylační látky (cyklofosfamid, cisplatina, mitomycin C), další interkalační látky (doxorubicin, epirubicin), inhibitory topoizomerázy II (etopozid) a konečně inhibitory mikrotubulů (taxany – kabazitaxel, docetaxel v intermitentním režimu, vinorelbin a v monoterapii – už zmiňovaný estramustin) (Klener a Abrahámová, 2002; Kume a spol., 2015).

Bisfosfonáty se běžně používají v klinické praxi u pacientů s metastatickým postižením skeletu (Procházková-Študentová a Študent, 2012). U karcinomu prostaty byl prokázán vliv na přežití u klodronátu, na oddálení kostních komplikací u zoledronátu a denosumabu (Babjuk a Matoušková, 2009).

### **Biologická terapie**

Biologická terapie v pravém slova smyslu, tedy použití vhodné účinné monoklonální protilátky proti nádorovým buňkám prostatického karcinomu, je stále ve fázi klinického výzkumu. Zkouší se protilátky proti membránovému epitopu PSA (anti-PSMA) (Santana a spol., 2012), proti receptoru pro EGF nebo protilátka proti VEGF (Klener a Abrahámová, 2002). V rámci komplexní podpůrné terapie se u nemocných s kostním postižením podávají antagonisté receptorů pro endotelin A – nejznámějším je atrasentan (Xinlay, Abbott), jehož cílem je omezit vznik dalších osteoplastických metastáz (Carducci a spol., 2002).

### **Imunoterapie**

Na poli imunoterapie u hormonálně rezistentních pokročilých forem karcinomu prostaty má význam léčebná imunizace vakcínou sipuleucel-T (Provenge, Dendreon Corporation). Od pacienta odebrané dendritické buňky neboli APC (antigen prezentující buňky) jsou *ex vivo* rekombinantně obohaceny o bílkovinu (PA2024), která k odebraným dendritickým buňkám připojí antigen kyselé prostatické fosfatázy s GM-CSF. Toto obohacení o antigen pomáhá v identifikaci nádorových buněk prostaty, protože zmiňovanou kyselou fosfatázu tyto nádorové buňky obsahují až z 95 %. GM-CSF hraje signalizační roli pro aktivaci výkonných (bojových) buněk – granulocytů a makrofágů – proti příslušným nádorovým buňkám, jinak řečeno: stimuluje vyžívání imunokompetentních buněk určených pro boj s nádorovou tkání (So-Rosillo a Small, 2006). V současnosti probíhá III. fáze klinického zkoušení dalšího nadějněho kandidáta na imunoterapii, konkrétně transgeneticky



připravené vakcíny PROSTVAC (Bavarian Nordic), která je cestou antigenové kaskády kromě PSA cílená i na další nádorové antigeny (Shore, 2014).

### **Následky terapie a rehabilitace**

Ačkoli přežívání bez známek nemoci (disease-free survival) zůstává hlavním cílem terapie, erektilní dysfunkce zejména po radikální prostatektomii je stále častou komplikací ovlivňující kvalitu života pacienta. Frustrace z této komplikace může také negativně ovlivnit pacientovu adherenci k další nutné terapii. I když je k dispozici hned několik možností terapie – inhibitory fosfodiesterázy 5 (sildenafil – Viagra, Pfizer; tadalafil, vardenafil), „vakuové pumpy“, intrakavernózní/intrauretrální aplikace prostaglandinu, penilní protézy, konkrétní doporučení optimální rehabilitační terapie nebo strategie zatím neexistují (Kim a Lee, 2015). Akutní i chronická postradiační proktitida postihuje až 50–75 % pacientů léčených brachyterapií. Kromě subjektivního dyskomfortu je jejím nejčastějším projevem rektoragie. Doporučen je co nejvíc konzervativní postup a terapie pouze symptomatická (Phan a spol., 2009).

### **3.2.8 *Prevence, screening a dispenzarizace karcinomu prostaty***

#### **Prevence**

Jelikož kromě věku se u nás další rizikové faktory karcinomu prostaty dají sledovat jen těžce, není primární prevence v současné době možná. Otázka chemoprevence v iniciační fázi kancerogenní kaskády, která je ještě reverzibilní, je vzhledem k nedostatku kvalitních studií diskutabilní. Chemoprotektivní vliv mají např. liorazol, retinoidy, deltanoidy a flavonoidy a některé typy inhibitorů 5 $\alpha$ -reduktázy – finasterid (Proscar, Merck) (Klener a Abrahámová, 2002). V současné době představuje screening hlavní mechanismus sekundární prevence.

#### **Screening**

Metodami první volby včasné detekce jsou palpační vyšetření prostaty p. r. a vyšetření hladin PSA v krvi v jednoročním intervalu. Screening na časně fáze tumoru prostaty je vhodné provádět od 50 let věku. Jako celoplošný vyhledávací program zatím nefunguje, zvažován je pro rizikové skupiny populace (Dušek a spol., 2014). U mužů s pozitivní rodinnou anamnézou se doporučuje o 10 let dříve. Na druhé straně, u mužů s počáteční hodnotou PSA < 1 ng/ml může být dostačující interval 8 let. U mužů starších 75 let s počáteční hodnotou PSA < 3 ng/ml není další testování PSA vzhledem k velmi nízkému

riziku úmrtí na karcinom prostaty nutné (Procházková-Študentová a Študent, 2012). P. r. vyšetření a elevované PSA při samostatném použití dokážou odhalit malignitu u 0,3 % asymptomatické populace, při použití v následné kombinaci s TRUS se jejich výpovědní hodnota zdvojnásobuje (Perrin a spol., 1991). U symptomatických jedinců znamená pozitivní p. r. nález se zvýšeným PSA 20–25% šanci na dg. karcinomu prostaty (Mistry a Cable, 2003).

## **Dispenzarizace**

Dispenzarizace nemocných je nezbytná na urologické ambulanci, u pokročilých stavů je vhodná konzultace uroonkologa, nebo klinického onkologa. Dispenzarizace je celoživotní. U lokalizovaného onemocnění zahrnuje klinické vyšetření včetně p. r. vyšetření, laboratorní vyšetření (PSA, moč), USG ledvin a postmikčního rezidua v 3měsíčních intervalech během prvního roku. V dalším sledování lze intervaly prodloužit podle charakteru a průběhu onemocnění na 6 měsíců. Další paraklinická vyšetření, jako je TRUS, uroflowmetrie, scintigrafie skeletu nebo PET/CT, používáme jenom v indikovaných případech. Stejná dispenzarizace probíhá i u generalizovaného onemocnění, avšak vzhledem k celkovému stavu pacientů s důrazem na mnohem větší individualizaci. Kromě výše zmíněných vyšetření posuzujeme vždy výtěžnost indikace dalších vyšetření – CT, RTG plic, cílených RTG snímků, PET/CT nebo doplňujících laboratorních vyšetření (testosteron, prolaktin atd.) (Babjuk a Matoušková, 2009).

## **3.3 KOŽNÍ METASTÁZY**

### **3.3.1 *Výskyt, mechanismus šíření a chování kožních metastáz***

Metastázy do kůže jsou nálezem relativně vzácným, jejich incidence se u metastazujících tumorů udává mezi 0,6–10,4 % a představují 2 % všech kožních malignit (Alcaraz a spol., 2012). Kožní metastázy může ale prakticky založit kterýkoliv tumor (Klener, 2002). Jako první známka metastatického rozsevu se vyskytují u 7,6 % nemocných. Frekvence výskytu za poslední roky nepatrně stoupá (Wong a spol., 2014). V jedné větší americké studii (Lookingbill a spol., 1993) se zjistilo, že kůže je v pořadí 12. orgánem, ve kterém metastázy ze všech malignit vznikají. Příležitostně se mohou objevit kožní metastázy i za desítky let po kurativní excizi primárního ložiska (Lookingbill a spol., 1993).

I když prognóza pacientů s kožními metastázami závisí na typu a biologické povaze primárního tumoru a jeho odpovědi na paliativní terapii, jejich přítomnost se považuje za velmi nepříznivou známku (Helm a spol., 2014). V době diseminace do kůže jsou zpravidla

přítomny už i metastázy v jiných orgánech (Luna a spol., 2013), které jsou za celkovou mortalitu v konečném důsledku zodpovědné víc než primární tumor (Chambers a spol., 2002). Medián přežití po verifikaci dg. kožní metastázy je obecně jen cca 6,5 měsíce (u karcinomu prsu do 14 měsíců) (Schoenlaub a spol., 2001).

Kožní metastázy jsou definovány jako neoplazie postihující dermis a subcutis bez přímého spojení s primárním tumorem. Jsou to metastázy vzdálené. I přes definici, ve vyšších stádiích onemocnění je obtížné až prakticky nemožné exaktně rozlišit, zda se jedná o obraz procesu přímého šíření tumoru *per continuitatem* (např. do stěny/kůže hrudníku u T4 karcinomu prsu), nebo právě o metastazující rozsev v pravém slova smyslu – a to nezřídka i po absolvované adjuvantní terapii. Připouští se i často nevídaná možnost iatrogenní implantace nádorových buněk do kůže během chirurgického výkonu (Helm a spol., 2014). Mnohem častější je šíření lymfogenní (typické pro karcinomy, nejčastější) nebo hematogenní (víc charakteristické pro sarkomy). Lymfatická propagace do kůže je obvykle provázena její zánětlivou reakcí a vazivovými změnami, dochází k fibrotizaci koria. Krevní cesta rozsevu může dát synchronně za vznik více metastáz na více vzdálených místech. Postižení samotné epidermis (tzv. epidermotropní metastázy) diferenciatně diagnosticky napodobují primární kožní malignity – tento typ metastáz je častý u melanomu, ale i u karcinomu prsu nebo prostaty (Pizinger, 2010). Některé metastázy – zejména do oblasti kožního pupku (tzv. Sister Mary Joseph's nodule) – mohou vznikat všemi třemi způsoby (Dar s spol., 2009).

Kožní metastázy vznikají v kterémkoli věku, ale nejčastěji po 6. deceniu, kdy jejich relativní četnost koreluje s četností výskytu primárního tumoru v tomto věku a s ohledem na pohlaví. Nejčastěji, tj. v 30–75 %, jsou kožní metastázy zjišťovány u karcinomu prsu. Bez ohledu na pohlaví, z dalších malignit pak u maligního melanomu (5–45 %), karcinomu vedlejších dutin nosních (20 %), dutiny ústní a laryngu (12–16 %), méně u bronchogenního, kolorektálního karcinomu a karcinomu ledviny (Helm a spol., 2014, Klener, 2002). Lokalizace kožních metastáz je vzhledem k regionálnímu splavu ovlivněná lokalizací primárního tumoru (Pizinger, 2010) a do jisté míry i imunologicky – vyšší afinitou nádorových buněk k určitým typům cílových tkání (Hu a spol., 2009). Počet nemocných, kteří přicházejí primárně s kožními metastázami a dosud u nich původ malignity zjištěn nebyl, je velmi malý (Pizinger, 2010). Protože metastázy mají klinicky velmi různorodý vzhled – jako příklad viz následující podkapitola, usuzovat na jejich původ pouze z makroskopie možné není. Diagnostiku někdy kupředu neposune ani prosté histologické vyšetření, oporou při

identifikaci primárního tumoru je imunohistochemický rozbor bioptického vzorku (Klener, 2002).

### 3.3.2 *Kožní metastázy karcinomu prsu a karcinomu prostaty*

#### **Kožní metastázy karcinomu prsu**

Na tomto místě nutno zmínit, že karcinom prsu je historicky jedním z prvních popsáných lidských tumorů. První popis se dochoval z roku 1600 př. n. l. v starém Egyptu. V starověkém Řecku Hippokrates (460–370 př. n. l.) k širšímu označení maligního bujení použil termín „karkinoma“, označujícího kraba obecného (pobřežního) – druh *Carcinides maenas*, kterého klepeta připomínaly právě metastázy karcinomu prsu do kůže (Retief a Cilliers, 2011).

Vzdálené metastázy doprovázejí až klinické stadium IV karcinomu prsu, jsou projevem systémového onemocnění. Lokální kožní recidiva po mastektomii se vyskytuje v 5–10 % (Hirsch a spol., 2015), po prs šetřícím výkonu je incidence o něco vyšší – v 10–15 % (Hirsch a spol., 2013). Většina (95 %) těchto recidiv nastane do 5 do 10 let od výkonu (Moore, 2002). Kromě lokoregionální recidivy v oblasti kůže přední části hrudníku ipsilaterálně jsou dalšími častými lokalizacemi metastatických lézí kůže skalpu a periaurikulární oblasti, břicha včetně pupku, axily, zcela vzácně horních končetin a zad (Helm a spol., 2014; Pizinger, 2010).

Diseminovaný karcinom prsu se na kůži projevuje několika odlišnými klinickopatologickými nálezy, včetně přímého šíření do kůže projevujícího se jako Pagetova nemoc nebo jako nehojící se uzlovité ulcerace (**Obrázek 2**).

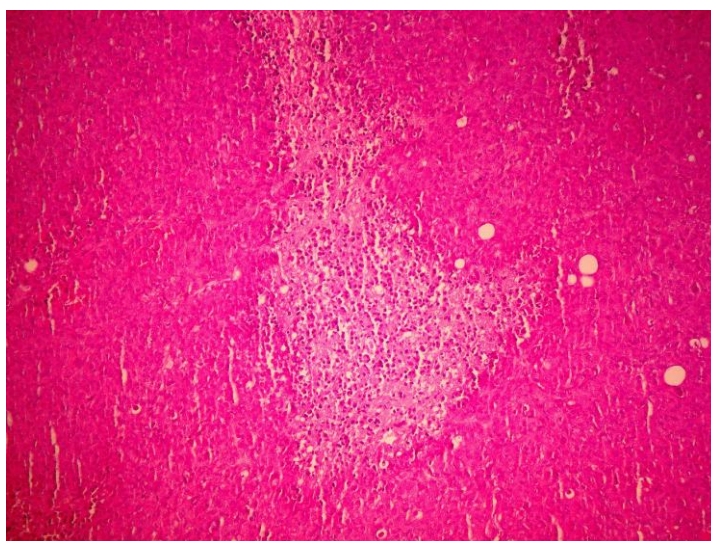
**Obrázek 2.** *Exulcerovaný uzlovitý metastatický karcinom prsu*



Podle definice metastáz může pak být Pagetova nemoc považovaná za přímé šíření do kůže a podkoží, nebo může být považovaná i za lokální metastatický rozsev (Pizinger, 2010). Úplně typickým projevem kožních metastáz karcinomu prsu jsou ovšem drobné povrchní uzlíky – preferenčně v okolí chirurgické jizvy nebo parasternálně, makroskopicky vzhledu neulcerovaných papul. Barevně spadají do přechodu od růžové až po červenou, na řezu často i bílé (Mordenti a spol., 2000). Suspekce na malignitu by měla být vždy dokumentována biopsií, protože také např. granulom z cizího tělesa a některé infekční procesy mohou podobné obrazy simulovat. Z dalších diferenciálně diagnostických rozvah stojí za zmínku primární kožní tumor, zmetastazovaný maligní melanom a karcinom plic, které jsou histologicky lehce od metastáz karcinomu prsu odlišitelné (Rosai, 1989).

Některé formy kožních metastáz jsou typické jen pro karcinomu prsu (Moore, 2002). Tento se vzácně může projevit jako inflamatorní metastatický karcinom, který je charakterizován pomalu se zvětšujícím pruhovitým erytémovým ložiskem nebo figurovanou plochou v oblasti okolní kůže prsu. Vyjma celkových příznaků má klinický obraz celulitidy, připomíná erysipel; během týdnů trvání dostává kůže nažloutlý odstín a fibrotizuje (Klener, 2002). Další formou je telangiektatický karcinom. Makroskopicky se jedná o do plochy uspořádané peckovité načervenalé papuly s erytémem, jejichž povrch může mít někdy papilomatózní charakter a může i ulcerovat. Metastázy kyrysovitého typu („en cuirasse“) jsou osobité difuzním tuhým zduřením kůže a podkoží, kdy nález připomíná až sklerodermii. Neoplastická alopecie a rozsev do zosteriformních formací jsou nálezy ještě neobvyklejšími (Rosai, 1989).

**Obrázek 3.** *Infiltrativně rostoucí kožní metastáza karcinomu prsu (HE 100×)*



Mikroskopicky dominuje obraz malých až velkých agregátů buněk tumoru, obklopených fibrózní tkání. Buňky jsou typicky aranžované do „žlázám podobných“ (gland-like) struktur, viz **Obrázek 3**.

Kožní metastázy karcinomu prsu se pozitivně značí protilátkami proti cytokeratinům (CK7, CAM 5.2, Ber-EP4), membráně epitelu (anti-EMA) a CEA (anti-CEA). Dalšími pomocnými markery jsou méně specifické ER, PR a nově i AR (Helm a spol., 2014; Mordenti a spol., 2000). Konkrétnějším odlišením metastázy od primárního tumoru je pozitivní reakce na exprimovaný apokrinní marker GCDFP-15, tzv. prolaktinem-inducibilní protein (Lacroix, 2006).

Současným zlatým standardem v jejich terapii je systémová paliativní chemoterapie, vždy podle specifického protokolu, který se odvíjí od originální histopatologie a stadiu pacienta. Lokální postupy jako chirurgická excize, krátkovlnná radioterapie, imunoterapie, intralezionální chemoterapie (lokální aplikace miltefosinu – Miltex, Baxter), aplikace antiangiogenních léků a právě i metoda PDT se mohou uplatnit pouze v eradikaci solitárních lézí a v pozdních stádiích nemoci ve smyslu zlepšení kvality života (Hirsch a spol., 2015; Leonard a spol., 2001; Moore, 2002).

### **Kožní metastázy karcinomu prostaty**

Kožní metastázy karcinomu prostaty jsou jevem raritním, jejich incidence se odhaduje na 0,10–0,36 % (Brown a spol., 2014; Mueller a spol., 2004). Ve světové literatuře jsou k nalezení spíše jen desítky jednotlivých kazuistik (Ogunmola a spol., 2013). Doprovázejí poslední stadium onemocnění karcinomem prostaty, s čím souvisí i jejich ubohá prognóza (Abrol a spol., 2011).

Karcinom prostaty relativně běžně zakládá metastázy do kůže obličeje a krku, horních partií hrudníku, pupku, spodních částí břicha, třísel, penisu, perinea a hýždí nebo dolních končetin (Helm a spol., 2014).

Jak je patrné na **Obrázku 4**, svojí makroskopií obvykle imitují kožní pyodermie (Pizinger, 2010), a to především v obličejové lokalizaci, kde tvoří neulcerující papulonoduly (Sharma a Chandra, 2005). Ostatní formace (zosteriformní u perineurální propagace) se považují za úplnou vzácnost (Bluefarb a spol., 1957). Diagnosticky je na prostatickou etiologii kožních metastáz nutno pomýšlet hlavně u nemocných s „vyléčeným“ karcinomem prostaty v předchozí anamnéze; kožní biopsie je nepostradatelná (He a spol., 2012).

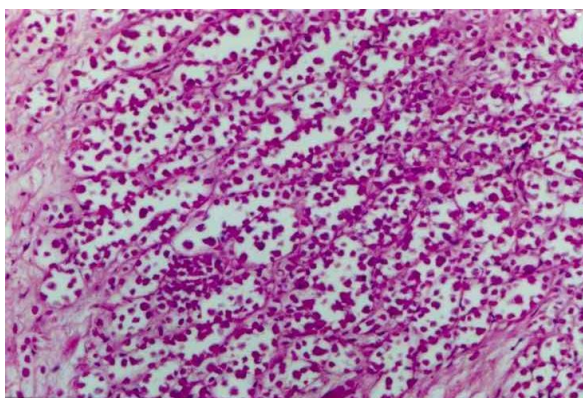
**Obrázek 4.** *Papulonodulární metastázy karcinomu prostaty*



*Zdroj: Sharma a Chandra, 2005*

Histologické vyšetření popisuje žláзовou tkáň s acinárním uspořádáním (**Obrázek 5**, Sharma a Chandra, 2005). Imunohistochemické barvení bývá s pozitivním výsledkem pro PSA (Abrol a spol., 2011) a cytokeratiny CAM 5.2, Ber-EP4, CK7 (Helm a spol., 2014). Při neprůkaznosti protilátek proti PSA je vhodné doplnit stanovení exprese prostatické kyselé fosfatázy (Rattanasirivilai a spol., 2011).

**Obrázek 5.** *Kožní metastáza adenokarcinomu prostaty ze žláзовých lalůček (HE 140×)*



*Zdroj: Sharma a Chandra, 2005*

Strategie podpůrné terapie se od jiných kožních metastáz neliší – chirurgická excize, radioterapie, event. v kombinaci (Mak a spol., 2014; Mueller a spol., 2004), nebo PDT při selhání efektu předchozí teleradioterapie (Barrett a spol., 2014).

### 3.4 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

#### 3.4.1 Definice PDT

Fototerapie využívá světlo k léčbě nemocí. Její podskupinou je fotochemoterapie, která je podmíněna i paralelní aplikací léku. Fotodynamická terapie (PDT) je druh fotochemoterapie, který kromě terapeutické aplikace světla a léku – fotosenzitizéru – vyžaduje také přítomnost kyslíku v cílové tkáni. PDT, jakožto příbuzná laseroterapie, byla zpočátku některými autory označovaná jako terapie fotoradiační (Dougherty a spol., 1978). Vedle terapie chirurgické, chemo-, radio- a imunoterapie je PDT jednou z dalších metod onkologické terapie (**Obrázek 6**).

**Obrázek 6.** Postavení PDT v rámci metod onkologické terapie



#### 3.4.2 Historie PDT

Snad všechny přírodní národy uctívaly Slunce jako božský zdroj života, a tak se prakticky většina starověkých tradičních medicínských škol propracovala k vědomí důležitosti světla pro lidský organismus. Sice zpočátku převážně pouze empiricky, staré české úsloví „Kam nechodí Slunce, tam chodí lékař...“ dodnes velmi přesně vystihuje a racionálně podtrhuje terapeutický význam světla (Javůrek, 1995).

Dějiny PDT sahají do starověku. Terapeutické účinky světla na psoriázu, vitiligo, kožní malignity, ba i křivici či psychózy jsou dokladované v Egyptě, Indii a Číně, a to dokonce včetně lokální aplikace prvních „fotosenzitizérů“ rostlinného původu – furokumarinů, psoralenů. Celotělové působení slunečního světla položilo v starověkém Řecku základ tzv. helioterapie, za jejíž otce byl označován Herodotus (484–425 př. n. l.).

Závislost fototerapie na meteorologických podmínkách vedla k rozvoji umělých zdrojů světla. Po dlouhém období „temna“ byl dalším milníkem fototerapie rok 1834, kdy se Karlbrunnerovi podařilo z bergamotového oleje izolovat 5-metoxypsoralen (bergapten), který



našel své stálé uplatnění až v 70. letech 20. století v kombinaci s ultrafialovým světlem A (UV) při tzv. PUVA terapii psoriázy (Ackroyd a spol., 2001).

V roce 1900 německý student Raab při experimentech s malárií zjišťuje, že světlo má za přidání akridinové oranže letální účinek na nálevníky – trepku velkou (*Paramecium caudatum*) (Raab, 1900). Historicky je to pravděpodobně pionýrská zmínka o využití fotoreakcí v biologických systémech. Za terapeutické využití koncentrovaných paprsků světla byl v roce 1903 Nobelovou cenou za medicínu a fyziologii oceněn dánský lékař Finsen, který je tak považován za zakladatele moderní fototerapie (Møller a spol., 2005). V tomtéž roce byl fotosenzitizér (konkrétně eosin) von Tappeinerem a Jesionekem poprvé použit k terapii kožních tumorů (spinaliom, bazaliom) a kožních projevů tuberkulózy a syfilidy (lupus vulgaris, condylomata lata ženských genitálií) (Von Tappeiner a Jesionek, 1903). Von Tappeiner spolu s Jodlbauerem následně v roce 1904 prokázali, že úspěšnost této terapie je podmíněná přítomností kyslíku, definovali pojem „fotodynamický efekt“ (Jodlbauer a von Tappeiner, 1904). Ve 40. letech pak Blum navrhl, že definice PDT by měla být aplikována jen na fotochemické reakce, ve kterých byl kyslík spotřebován a podle povahy prvních kroků, tj. mechanismu účinku, je nazval fotosenzitizovanými procesy typu I a typu II (Blum, 1941).

I když byl hematoporfyrin poprvé izolován Schererem v roce 1841, jeho biologickým účinkům byla poprvé věnována pozornost až v roce 1911, kdy Rakušan Hausmann na myších dokazuje i jeho fototoxicitu (Ackroyd a spol., 2001). Charakteristickou červenou fluorescencí endogenních porfyrinů v sarkomech laboratorních zvířat a v lidských tumorech po UV ozáření Woodovou lampou později popisuje i Policard (Policard, 1924). Klinický experiment s PDT kožních metastáz karcinomu prsu u mastektomovaných pacientek publikuje v Chorvatsku v roce 1931 Körbler (Körbler, 1931). Jedenáct let nato, Auler s Banzerem díky fluorescenci exogenně podaného porfyrinu dokázali jeho akumulaci v transplantovaných tumorech u potkanů (Auler a Banzer, 1942). Výsledky tohoto experimentu podpořil v roce 1948 Figgeho kolektiv na myších – zjistil, že různé porfyriny (hematoporfyrin, koproporfyrin, protoporfyrin a chelát Zn hematoporfyrinu) se kromě akumulace v nádorové tkáni, metastázách a částečně lymfatických uzlinách hromadí také v omentu, fetální, placentární tkáni a tkáni hojících se ran (Figge a spol., 1948).

Další období historie PDT se začalo psát v letech 1960–1961 na americké Mayo Clinic, kde Lipson se spolupracovníky pokusně využíval zviditelnění neoplastických lézí předchozím podáním hematoporfyrinu (Lipson a Baldes, 1960; Lipson a spol., 1961). Cohen a Schwartz v roce 1966 upravili „hrubý“ hematoporfyrin kyselinou octovou a sírovou – takto vzniklé porfyrinové směsi označili za hematoporfyrinové deriváty (HpD). Výhodou nově připravených HpD v porovnání s prostým hematoporfyrinem byla jejich lepší akumulace v

nádorové tkáni, což dokazovali v pokusech na xenotransplantovaném rhabdomyosarkomu u myši (Cohen a Schwartz, 1966). Výrazným mezníkem vývoje PDT byla druhá polovina 70. let minulého století. V roce 1975 Dougherty a spol. podal zprávu o prvním úspěšném – kompletním vyléčení malignity (lidský karcinom prsu) metodou PDT u myši; ve stejném roce dosáhnul stejného úspěchu i Kelly s transplantovaným lidským tumorem močového měchýře. Rané klinické experimenty na lidech probíhaly už o rok později, kdy Kelly a Snell využili HpD k cystoskopickému značení tumoru (Kelly a Snell, 1976). V roce 1978 už Dougherty publikuje úspěch PDT na souboru 25 pacientů s celkovým počtem 113 ozářených kožních a podkožních lézí (spinaliom, bazaliom, maligní melanom, kožní metastázy karcinomu prsu, kolorekta, prostaty a endometria, chondro- a angiosarkom), kdy došlo ke kompletní nebo partiální odpovědi u 111 z nich (Dougherty a spol., 1978).

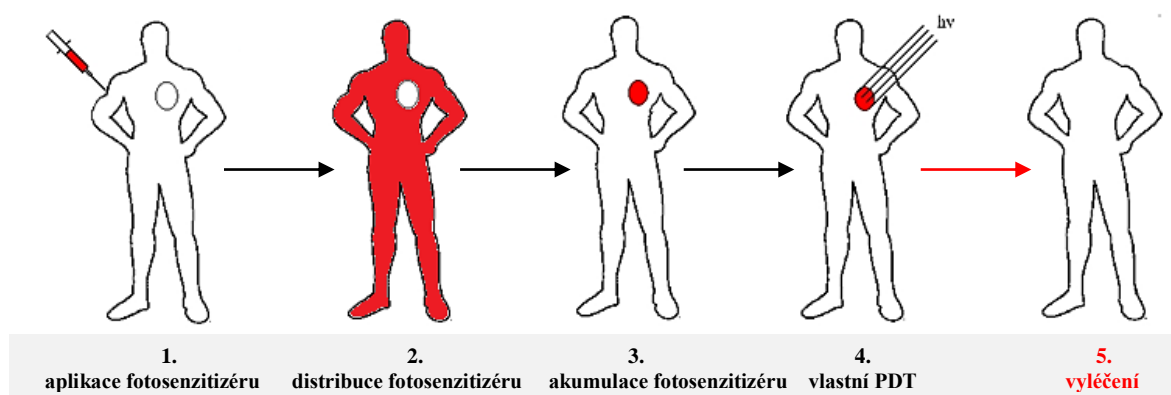
Následující vývoj PDT se potom odvíjel z velké části od technologického pokroku v medicíně. Díky miniinvazivitě chirurgických přístupů se klinické indikace PDT posledních 30 let rozšiřovaly. PDT se začala, i když zprvu většinou jako paliace, typicky využívat i u dalších malignit – tumorů žlučníku, jícnu, hlasivek a některých bronchogenních tumorů, u rekurentních gynekologických malignit, intraokulárních lézí a dokonce i u gliomů CNS. Zdokonalení biochemických technologických postupů umožnilo další testování nových typů fotosenzitizérů s vlastnostmi vhodnějšími pro PDT (Ackroyd a spol., 2001).

### **3.4.3 Princip PDT**

PDT se skládá z tří klíčových složek: fotosenzitizéru, zdroje světla a přítomnosti kyslíku v cílových tkáních (Moriwaki a spol., 2001). Terapeutický proces PDT je však dvoustupňový. Jeho rozhodujícím principem je fotosenzibilizace či fotoaktivace – selektivní akumulace fotosenzibilizující látky v tumoru s jeho následným ozářením světelnou energií vhodné vlnové délky ( $\lambda$ ) (Pervaiz a Olivo, 2006; Zimčík a Miletín, 2004). Vlivem absorpce světla o specifické  $\lambda$  dochází ve fotosenzitizéru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosenzitizéru reaguje přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu (mechanismus účinku I. typu), nebo dochází k transferu energie z fotosenzitizéru na kyslík za vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku (mechanismus účinku II. typu, tj. vlastní fotodynamický efekt) (Poučková, 2000). Cytotoxické působení singletového kyslíku a volných radikálů, zvláště pak radikálů lipidických složek buněčných membrán, je příčinou destrukce tumoru (Dolmans a spol., 2003; Moriwaki a spol., 2001). Oba tyto mechanismy mohou při PDT probíhat paralelně, avšak jejich výsledný relativní terapeutický podíl je závislý od typu a koncentrace fotosenzitizéru,

na intratumorální koncentraci kyslíku a na afinitě fotosenzitizéru k substrátu (Kolářová, 2005). Schematicky je princip PDT zobrazen na **Obrázku 7**.

**Obrázek 7.** Zjednodušené schéma fungování PDT



Zdroj: Brown a spol., 1999 (modif.)

Na druhé straně, destrukční účinek PDT na většinu populace nádorových buněk není závislý na typu tumoru (Stern a spol., 1993). Protinádorový efekt PDT je výsledkem tří vzájemně působících procesů: přímé smrti nádorové buňky, poškození cévního zásobení tumoru (Dolmans a spol., 2003; Yoo a Ha, 2012) a aktivace nespecifických protinádorových imunitních procesů (Kammerer a spol., 2011; Mroz a spol., 2011). Role jednotlivých komponent ve výsledné ablacii tumoru jsou proměnlivé – dají se modifikovat podanou dávkou fotosenzitizéru,  $\lambda$  a energií použitého světelného zdroje.

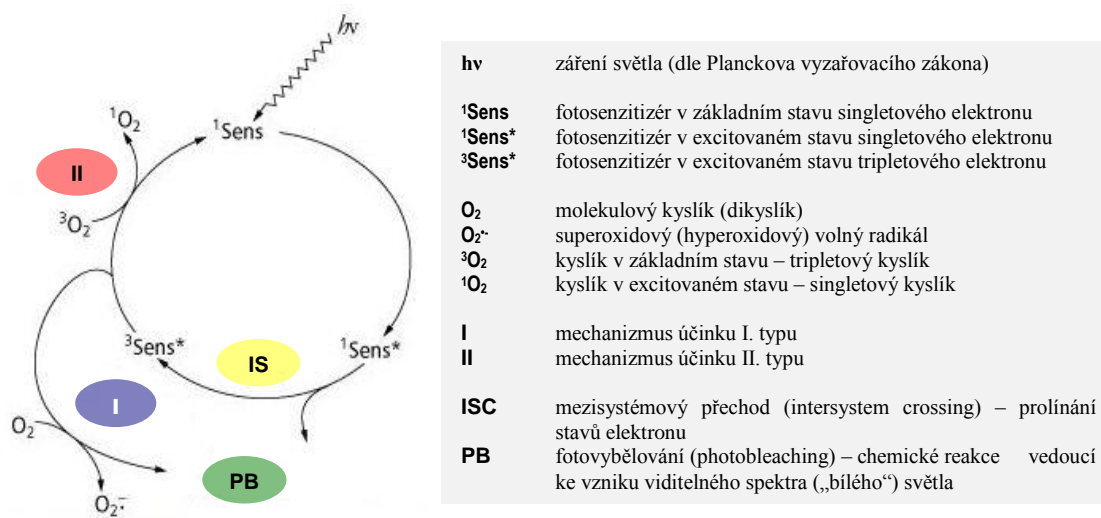
### 3.4.4 Mechanismus účinku PDT

#### Účinky na atomové a molekulární úrovni

Pokroky ve výzkumu na poli fotochemie a fotofyziky vedly ke zjištění, že pro vlastní fotodynamickou reakci je rozhodující schopnost fotosenzitizérů přejít do excitovaného – tripletového stadia. V základním stavu fotosenzitizéry volné elektrony nemají. Působením vhodného světelného zdroje, tj. absorpcí fotonu fotosenzitizérem, dochází k přechodu elektronu na vyšší orbit. Světlo tak fotosenzitizér excituje do singletového stavu, který pak prochází mezisystémovým přechodem (intersystem crossing) do tripletového excitovaného stavu. Interakce s molekulárním kyslíkem (jeho základní formou je také triplet, a tak se zde může uplatnit Wignerovo spinové pravidlo) vrací fotosenzitizér do jeho základní elektronové hladiny a generuje vznik pravého fotodynamického činitele – singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ). Toto je tzv. mechanismus účinku II. typu (fotosenzitizovaný proces typu II, II. typ reakce) – vlastní fotodynamický efekt (Milgrom a MacRobert, 1998; Poučková, 2000). Právě tento

mechanismus je mj. i opravdovou příčinou hlavního nežádoucího účinku PDT – fototoxicity fotosenzitizérů. Fotofyzikální mechanismy navozené PDT jsou znázorněny na **Obrázku 8**.

**Obrázek 8.** Fotofyzikální mechanismy navozené PDT



Zdroj: Milgrom a MacRobert, 1998 (modif.)

Jelikož molekuly fotosenzitizérů obsahují dvojitě vazby, proteiny a nenasycené lipidy – hlavní složky buněčných membrán – jsou singletovým kyslíkem velmi snadno atakovatelné přes pericyklické (enové) reakce, které vedou k jejich degradaci. Např. aminokyseliny, které obsahují imidazol a indol (histidin, tryptofan), reagují se singletovým kyslíkem za vzniku endoperoxidů. Ty zas uvolňují hydroxylové radikály, které působí na buněčnou DNA. Aminokyseliny obsahující síru (metionin) jsou singletovým kyslíkem oxidované na sulfoxidy, které DNA baze (guanin) přímo degradují. Výsledkem II. typu reakce je pak buněčná smrt. Důležitou vlastností II. typu reakce je návrat ozářeného fotosenzitizéru do základního elektronového stavu po přenesení své energie na molekulární kyslík. Teoreticky to znamená, že cytotoxický činitel singletového kyslíku je generován bez chemické přeměny fotosenzitizéru, který může znovu absorbovat další foton a celý cyklus tak opakovat. Při dostatečné hladině kyslíku je jediná molekula fotosenzitizéru schopna efektivního vícenásobného doplňování vlastní koncentrace. Časem ale i ona sama reaguje se singletovým kyslíkem, který ji konečně degraduje – to je podstatou tzv. fotovybělování (photobleaching) (Alexiades-Armenakas, 2006; Milgrom a MacRobert, 1998; Nowis a spol., 2005). Uvolněná energie se při přechodu excitovaného fotosenzitizéru zpět do jeho základního stadia projevuje fluorescencí, která je dobře patrná v UV světle. V praxi má tento jev využití ve fotodiagnostice k určení přesné hranice maligních a benigních lézí (Juzeniene a spol., 2007).

Méně častým je mechanismus účinku I. typu (fotosenzitizovaný proces typu I, I. typ reakce). Uplatňuje se při přenesení elektronu z/na některý z excitovaných stavů

fotosenzitizéru za vzniku radikálových meziproductů (hlavně peroxidový anion a jeho konjugované kyseliny a hydroxylové radikály). Tripletová excitovaná forma fotosenzitizéru působí přímo na struktury buňky a vede přímo k jejich destrukci (Alexiades-Armenakas, 2006; Nowis a spol., 2005). Je nutné zdůraznit, že v obou mechanismech fotosenzitizace dochází ke tvorbě elektrofilních částic, což činí elektronově bohaté biomolekuly přednostním centrem ataku. Reakce primárních reaktivních forem kyslíku (ROS), tj.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HOO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ , s biomolekulami vedou ke vzniku velkého počtu typů sekundárních radikálů způsobujících další cytotoxické poškození. Sekundární radikály představují pro buňku mnohem větší nebezpečí, neboť jsou iniciátory řetězových reakcí (Jori a Coppellotti, 2007). Velikost reaktivity volných radikálů, která stoupá s nestabilní elektronovou konfigurací, je odhadnutelná z extrémně krátkého času života jednotlivých radikálů (Hippeli a Elstner, 1997) – k ilustraci poslouží **Tabulka 11**.

**Tabulka 11.** *Poločasy života volných radikálů – ROS*

Druh	Symbol	Poločas života při 37 °C [s]
molekulový kyslík (dikyslík)	$O_2$	$> 10^2$
superoxidový (hyperoxidový) radikál	$O_2^{\cdot-}$	$1 \times 10^{-6}$
singletový kyslík	$^1O_2$	$1 \times 10^{-6}$
hydroxylový radikál	$OH^{\cdot}$	$1 \times 10^{-9}$

*Zdroj: Hippeli a Elstner, 1997*

Pro pochopení procesu PDT je důležité znát základní fotofyzikální a fotochemické parametry použitého fotosenzitizéru v daném prostředí – klíčová je doba životnosti tripletových stavů, rychlostní konstanta jejich zhášení kyslíkem a kvantový výtěžek singletového kyslíku (Grossweiner, 2001). Singletový kyslík má tedy v reálu velmi krátkou dobu životnosti ( $< 40$  ns) a minimální akční rádius ( $< 0,02$   $\mu$ m), proto ve skutečnosti o destrukci buněčných organel rozhoduje lokalizace fotosenzitizéru. Některé fotosenzitizéry je možné prokázat pouze v určitých organelách – např. porfyrin selektivně poškozuje mitochondrie, ale jinde dostatečných hladin nedosahuje, ostatní organely poškodit schopný není. Fotosenzitizéry, které pronikají do mitochondrií, obvykle vedou k apoptóze, zatímco ty, které se vyskytují v buněčných membránách, obvykle způsobují nekrózu. Tyto organelově specifické rozdíly je možné sledovat při pokusech *in vitro*. *In vivo* je situace komplexnější a izolovaná apoptóza či nekróza buňky pozorovatelná není (Alexiades-Armenakas, 2006; Nowis a spol., 2005). Ze všech výše uvedených molekulárních účinků plyne, že hladina tkáňového kyslíku v tumoru je pro efekt fotodynamické reakce jeden z rozhodujících činitelů.

## Účinky na buněčné úrovni

Smrt nádorových buněk probíhá třemi způsoby – nekrózou, apoptózou a autofagocytózou (Agostinis a spol., 2011). Za optimální terapeutický efekt PDT se považuje nekróza, která postihne většinu nádorových buněk. Po PDT dochází k poškození buněčných membrán, zvláště pak plazmatické membrány, již za několik hodin. Buněčná replikace ustává a dochází k postupné cytolýze. Kromě plazmatické membrány jsou zasaženy i membrány jádra, mitochondrií, lysozomů, Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula. Poškození dvojité membrány mitochondrií s následným zduřením organely vede k inhibici dýchacího řetězce (elektron-transportních enzymů), inhibici oxidativní fosforylace a snížení hladiny ATP – výsledkem je energetický kolaps buňky. Proto je poškození mitochondrií pro účinek PDT rozhodující (Maftoum-Costa spol., 2007). Po disrupci membrán lysozomů dochází k uvolnění hydroláz a influxu  $\text{Ca}^{2+}$ , který aktivuje další enzymy a přispívá tak k autolýze nádorové buňky. Po PDT se také zvyšuje transkripce a translace některých genů souvisejících s produkcí látek při oxidačním stresu (chaperony – stresové proteiny, heat shock proteiny). PDT dále zasahuje do systému kontroly buněčného cyklu prostřednictvím recesivních onkogenů Rb a p53. V konečném stadiu se ale jádro srašťuje a tmavne (pyknóza), chromatin se hromadí na vnitřní straně jaderné membrány (nástěnná hyperchromatóza), pak se jádro rozpadá na malé fragmenty (karyorexe) nebo se úplně ztrácí jeho barvitelnost (karyolýza). Reakce okolní tkáň nekrotické buňky se od jiných nekrotických neliší – z cév v okolí buňky na chemotaktický popud vystoupí polymorfonukleáry a makrocyty, jejichž degranulace způsobí heterolýzu nekrotických buněk. V rámci reparativních pochodů jsou nekrotické buňky tumoru odstraněny fagocytózou a nahrazeny tkání normální (Mroz a spol., 2011; Pervaiz a Olivo, 2006; Proskuryakov a spol., 2003). Tato vyprovokovaná vysoce intenzivní fagocytóza se jeví jako klíčový faktor rozvoje přizpůsobené tumor-specifické antigenní imunitní odpovědi, která přispívá k eradikaci tumorů léčených metodou PDT (Korbelik, 2006).

Dalším způsobem buněčné smrti je apoptóza – dochází k ní při nedostatečně účinné PDT (např. při velkém objemu tumoru, nedostatečné koncentraci fotosenzitizéru nebo hladiny tkáňového kyslíku). Apoptotická kaskáda je u PDT aktivována oběma hlavními cestami – vnitřní dráhou přes mitochondrie, uvolněním cytochromu c a zevní dráhou přes transmembránové „receptory smrti“, navázáním Fas ligandu NK-buněk nebo aktivovaných T-lymfocytů; katalyzovaná je kaspázami. Iniciační kaspázy (kaspáza-2, -8, -9, -10) stojí na začátku kaskády, efektorové kaspázy (kaspáza-3, -6, -7) jsou částí koncovou (Melet a spol., 2008; Oleinick a spol., 2002). Tento sled biochemických procesů vede k typickým změnám vzhledu buňky – degradace cytoskeletu se změnou tvaru plazmatické membrány a smrštěním buňky, fragmentace jádra i chromozomů v důsledku účinku nukleázy vedoucí k fragmentaci

DNA. Od nekrózy se apoptóza liší především formou následného odstranění zbytků nádorové buňky. Buněčné membrány se nerozpadají, takže k aktivaci imunitního systému nedojde a zánětlivá reakce okolí také neproběhne. Zmíněné mechanismy buněčné smrti, tj. nekróza i apoptóza, mohou probíhat při PDT současně (Mason, 1999; Proskuryakov a spol., 2003) – hranice mezi nimi pravděpodobně ostrá není, a tak díky poměrně plynulému přechodu a jejich kombinaci mluvíme spíše o tzv. programované nekróze (Zong a Thompson, 2006). Jejich relativní podíl na destrukci tumoru závisí na povaze a koncentraci fotosenzitizéru a na tkáňové koncentraci kyslíku.

Konečně, třetím způsobem buněčné smrti při PDT je autofagocytóza. Její ojedinělé postavení v odpovědi tumoru na terapii spočívá v její duální funkci, působí homeostaticky. Dochází v ní ke katabolické degradaci buněčných proteinů (i celých organel), které se ve spolupráci s lysozomy odehrává pohlcením do tzv. autofagozomů. Tato recyklace slouží k udržení buněčného metabolismu. Je nezávislá od kaspáz. Autofagocytóza působí jednak tumor-supresivně tím, že brání hromadění poškozených proteinů a organel, a jednak zcela opačně jako mechanismus sloužící k přežití nádorových buněk, které mohou růst tumoru podpořit a ve výsledku celkový efekt PDT snížit. Nádorové buňky aktivují proces autofagie jako reakci na buněčný stres a/nebo na zvýšené metabolické nároky spojené s rychlou buněčnou proliferací (Gozuacik a Kimchi, 2004; Hönscheid a spol., 2014). Důležitým poznáním je fakt, že inhibice autofagie obnovuje chemosenzitivitu nádorových buněk, čímž sama potencuje jejich další zánik (Yang a spol., 2011).

Poměrné zastoupení nekrotické a apoptotické buněčné smrti závisí na typu a biologickém chování tumoru, ale především na koncentraci fotosenzitizéru, dávce i typu ozáření. Nízké koncentrace fotosenzitizéru a nízké dávky ozáření vyvolávají po PDT u 90 % buněčné populace tumoru apoptózu, naopak vyšší koncentrace fotosenzitizéru s použitím vyšších dávek ozáření vyvolávají nekrózu. Z toho lze soudit, že spíše v hlubších vrstvách nádorového tkáně, kde je dávka ozáření již nižší než na povrchu, dochází ve větší míře k zániku právě apoptózou (Luo a Kessel, 1997). Pulzní ozáření laserem indukuje většinou apoptózu, kdežto kontinuální typ víc nekrózu (Klimenko a spol., 2014).

### **Účinky na tkáňové úrovni**

Tkáň tumoru reaguje na PDT *in vivo* poměrně rychle. Vznik nekrózy je prokazatelný již za 24–48 h od ozáření světelným zdrojem. Při rezistenci nádorových buněk na PDT může v některých případech tumor opět růst, většinou k tomu dochází po období 1–2 týdnů. Důvodů rezistence je několik – lokální hypoxie, nedostatečná akumulace fotosenzitizéru v tumoru, nedostatečná koncentrace světelné energie v ozařované oblasti nebo kombinace všech

uvedených (Moša a spol., 1997; Nowis a spol., 2005; Seitz a spol., 2007). Oslabení účinku dopadající světelné energie plyne z interakce světla s cílovou tkání. Příčiny jsou především fyzikální – lom, odraz, absorpce a rozptyl paprsku. Lom a odraz se dá korigovat kolmou aplikací světla, zatímco absorpce se minimalizuje volbou fotosenzitizéru, který je absorbován v daleké červené oblasti elektromagnetického spektra (Plaetzer a spol., 2009). Širokopásmová difuzní spektroskopie v *in vivo* pokusech prokázala poměrně velkou variabilitu závislosti optických vlastností od zasahovaných cílových tkání, která je dána přítomností chromoforů (zejména melanin, hemoglobin) v nich (Sandell a Zhu, 2011). Akumulace fotosenzitizéru je podmíněna jeho vychytáváním izolovaně do nádorové tkáně. Tento uptake je ovlivněn několika faktory. Patří mezi ně: vyšší proliferační aktivita nádorových buněk, změněná lymfatická drenáž, vysoká exprese LDL receptorů na buněčných membránách, abnormální struktura tkáňového stromatu (širší interceluláry), vyšší produkce kolagenu a vyšší výskyt makrofágů, které zachycují hydrofobní fotosenzitizéry. Na selektivním vychytávání protilátek se dále podílí vazba fotosenzitizérů na transportní mechanismy buňky a monoklonální protilátky. Některé fotosenzitizéry se selektivně vychytávají přímo v endoteliálních buňkách – to podporuje obecnou shodu, že PDT působí na cévní zásobení tumoru. K poškození endotelu kapilár a následnému uvolnění koagulačních faktorů, vedoucím ke vzniku trombů v dané splavové oblasti s anoxií tumoru, dochází do 72 h po ozáření (Mason, 1999). Dá se mluvit o tzv. fotodynamické devitalizaci tumoru. Dopplerovským USG měřením průtoku v cévách tumoru se prokázalo, že k poklesu průtoku krve tumorem dochází již mnohem dříve – hned v první minutě po začátku ozařování; tento pokles přetrvává pak ještě cca 5 min po ukončení expozice (Busch, 2006).

Poškození nádorových, endotelových buněk mikrocirkulace a vystavení zdravých buněk okolních tkání PDT – to jsou všechno spouštěče imunitní reakce, do které je zapojena jak imunita buněčná, tak látková (Kammerer a spol., 2011; Mroz a spol., 2011). Na rozdíl od chirurgie, radio- a chemoterapie, které působí většinou imunosupresivně, PDT může účinkovat i imunostimulačně vyvoláním akutního zánětu v tkáni tumoru. Tato nespecifická imunitní reakce hostitele proti nádorovým buňkám je v principu obdoba reakce příjemce proti štěpu (host-versus-graft reaction) po orgánových transplantacích. Terapeuticky lze tento efekt dále potencovat např. intratumorózní aplikací cytokinů či imunostimulačních vakcín (Busch, 2006; Castano a spol., 2006). Jsou důkazy, že PDT je schopná indukovat i tzv. bystander efekt („efekt přihlížejícího“), kdy za pomoci toxických metabolitů dochází k usmrcení nádorových buněk i ve vzdálených oblastech, tj. mimo zacílení PDT (Poyer a spol., 2012).

Je nutné si přiznat a hlavně uvědomit, že i vyše sedmdesátiletý výzkum účinků PDT prozatím všechny mechanismy zcela neozřejmil.



### 3.4.5 Fotosenzitizéry

Fotosenzitizér by měl být chemicky přesně definovanou látkou, jejíž molekula ve fotochemické reakci mění chemicky molekulu jinou. Místo termínu fotosenzitizér jsou některými autory užívány i termíny fotosenzitizátor, fotosenzibilizátor či fotosenzibilizér. Fotosenzitizér obsahuje chromofory, které jsou zodpovědné za silnou absorpci fotonů ve viditelné, příp. UV a IR oblastech světelného spektra a následný přenos absorbované energie na kyslík nebo jiné substráty (Rychtáriková a Kuncová, 2009). Dosud bylo studovaných několik tříd fotosenzitizérů. V současné době lze známé fotosenzitizéry rozdělit zhruba do tří generací. Obecně se jedná o aromatické či heterocyklické sloučeniny, obvykle o organická barviva porfyrinové, fenazinové či ftalocyaninové struktury.

#### Optimální fotosenzitizér

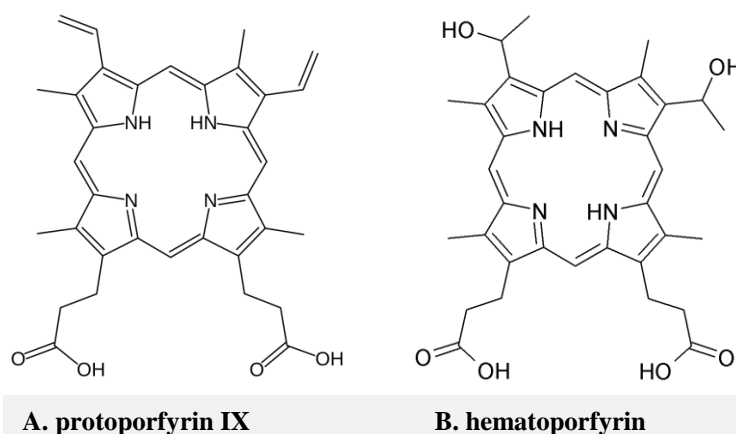
Optimální fotosenzitizér by měl splňovat následující předpoklady:

- a) fyzikální – maximální absorpce s vysokými extinkčními koeficienty při delších  $\lambda$  (700–850 nm) pro maximální penetraci do nádorové tkáně,
- b) fotochemické – produkce dostatečného množství singletového kyslíku, dostatečná fluorescence pro spektroskopii, dostatečná fotostabilita – aby výsledek terapie neovlivňovalo fotovybělování (tím ztráta fotodynamické účinnosti fotosenzitizéru) a zároveň specifická fotolabilita pro aktivaci světlem přesně odpovídající  $\lambda$ ,
- c) chemické – chemická čistota, známé složení, vysoká stabilita, rozpustnost ve vodě pro parenterální podání nebo v tucích pro podání lokotopické (gelová nebo masťová léková forma),
- d) biologické – minimální fototoxicita k solárnímu záření (nulová ve tmě), lokální toxicita pouze po ozáření světlem dané aktivační  $\lambda$ , dobrý farmakokinetický profil – selektivní kumulace v nádorové tkáni (výrazně vyšší oproti kumulaci v jiných tkáních) a z toho plynoucí rychlá eliminace nevstřebaného fotosenzitizéru z krevního řečiště,
- e) klinické – bez interference s ostatní protinádorovou terapií, příp. s její potenciací, vhodnost pro ambulantní použití s možností opakované aplikace,
- f) ekonomické – dobrá cena, snadná dostupnost, jednoduchý proces syntézy, výroby a možnost běžné distribuce (Brown a spol., 1999; Dougherty a spol., 1998; Pushpan a spol., 2002).

## Fotosenzitizéry první generace

Zastupitelem I. generace fotosenzitizérů je hematoporfyrin. Hematoporfyrin se přirozeně v lidském těle nevyskytuje, je ale velmi úzce spjatý s přirozeně se vyskytujícím protoporfyrinem IX – prekurzorem hemu (ale i cytochromu c, chlorofylů) – **Obrázek 9**. Hem sám o sobě fotosenzitizérem není a nejeví ani fluorescenci, na rozdíl od silně účinného hematoporfyrinu (Brown a spol., 1999). Jeho fotosenzitizující účinky u člověka potvrdil v roce 1913 Němec Meyer-Betz, který je vyzkoušel sám na sobě po injekčním podání 200 mg (Ackroyd a spol., 2001). Další práce časem prokázaly, že hematoporfyrin se hromadí přednostně v rychle proliferujících tkáních – viz podkapitola **Historie PDT**. Ze začátku se používal také jako fotosenzitizér, avšak později bylo zjištěno, že ne samotný hematoporfyrin je odpovědný za vlastní PDT efekt, nýbrž že to jsou oligomerní frakce, vznikající při izolaci z krve (Kessel, 1986). Také vychytávání v tumorech není příliš selektivní – jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, slezině, ledvinách a zejména kůži. V nádorové tkáni se lépe než prostý hematoporfyrin akumulují jeho deriváty – HpD (Sharman a spol., 1999).

**Obrázek 9.** Protoporfyrin IX a hematoporfyrin



HpD se vyrábějí v různém stupni purifikace. Nejvyšších efektů je dosaženo po i. v. podání v dávce 1–2 mg/kg, kdy po ozáření dochází ke kompletní inhibici epidermální DNA, RNA a proteosyntézy (Dougherty a spol., 1998). Nevýhodou fotosenzitizérů I. generace je jejich nevyhovující chemická čistota, nízký absorpční vrchol při krátkých  $\lambda$  (630 nm) – tím potřeba vysokých dávek jak fotosenzitizéru, tak světla, nízký koeficient extinkce a z toho plynoucí nežádoucí účinky. Po i. v. aplikaci a po interakci se solárním zářením vyvolávají značnou a hlavně dlouhodobou kožní fotosenzitivitu (trvajících až 6 týdnů), projevující se zejména úporným svěděním až bolestivostí (Muehlmann a spol., 2013). Ve snaze odstranit případné nežádoucí systémové projevy fototoxicity někteří autoři aplikují látku intralezionálně. I přes všechny uvedené vedlejší účinky se jsou HpD používány dodnes.

Prvním registrovaným preparátem byl v roce 1983 kanadský Photofrin (QLT PhotoTherapeutics/Axcan Pharma), který byl pro použití v klinické praxi schválen v roce 1993. Vlastní fotosenzitizér – porfimer sodný – je směs monomerů, dimerů a oligomerů HpD. V Kanadě, USA a Japonsku je schválen k terapii Barrettova jícnu, cervikálních dysplazií, paliativní terapii obstrukčních tumorů jícnu, žaludku, nemalobuněčného karcinomu plic a tumorů močového měchýře (floridní papilomatóza). V současnosti probíhají poslední fáze klinických studií jeho využití v terapii gliálních tumorů a karcinomu žlučových cest. V jiných zemích se používají generika pod firemními názvy: Photocarcinorin (Jinan Haohua Industry, Čína), Photosan (Seehof Laboratories, Německo), Photogem (Photogem LLC, Rusko), Hematodrex (VetProm, Bulharsko) a PhotoBarr (Pinnacle Biologics, USA) (Poučková, 2000). V ČR se používá Photofrin a PhotoBarr. HpD jsou kontraindikovány u nemocných s porfyrií.

### Fotosenzitizéry druhé generace

Preparáty II. generace vykazují již lepší vlastnosti – jsou chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné, při nízkých  $\lambda$  mají vyšší absorpční vrchol, a tudíž lze tyto fotosenzitizéry aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Dále se vyznačují podstatně nižší kožní fotosenzitivitou po PDT. Na druhé straně některé z nich nadále vykazují nevyhovující farmakokinetické vlastnosti a ztrátu fotodynamické aktivity ve vodném prostředí (Muehlmann a spol., 2013). Používané látky patří jak do skupiny porfyrinů, tak do skupiny chlorofylových derivátů a jiných barviv (ftalocyaniny, naftalocyaniny), pro lepší orientaci viz následující

### Tabulka 12.

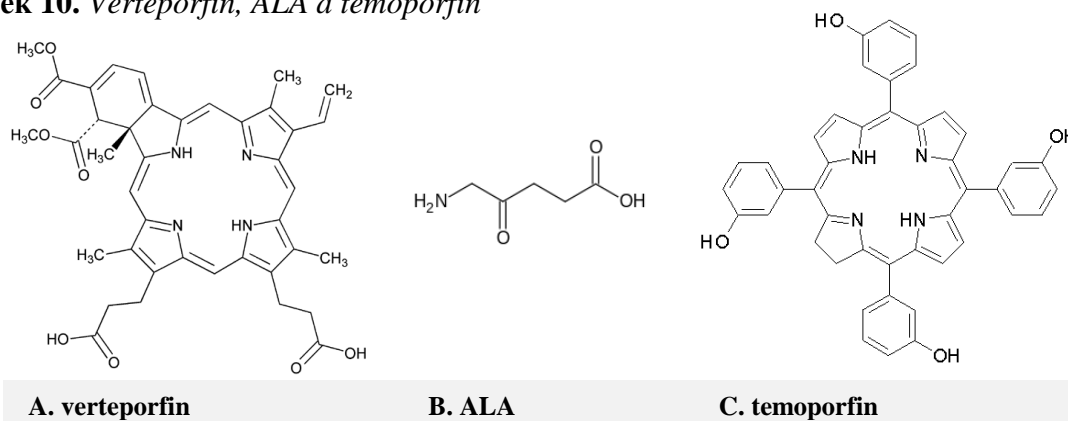
Tabulka 12. Dělení fotosenzitizérů

Generace	Skupina	Zástupce	Lék	Výrobce
I. generace	hematoporfyriny	hematoporfyrin	Photofrin	Axcan Pharma, Kanada
II. generace	hematoporfyriny	TPPS4		
	benzoporfyriny	verteporfin	Visudyne	Bausch & Lomb, USA
	texafyriny	motexafin Lu	Antrin	Pharmacyclics, USA
	kyseliny	ALA	Metvix	Galderma, Švýcarsko
	chloriny	temoporfin	Foscan	Biotech Pharma, Rakousko
		rostaporfin	Purlytin	Pharmacia & Upjohn Company, USA
	talaporfin	Laserphyrin	Meiji Seika Kaisha, Japonsko	
	purpuriny (tin etiopurpurin), bakteriochloriny			

	feoforbidy	feoforbidy, pyrofeoforbidy (fotochlor)
	cyaniny	ftalocyaniny, naftalocyaniny
	další barviva	safyryny, metylénová modř, rhodaminy, porfyceny, hypericin
III. generace	porfyrin-calixarenové a -cyklodextrinové komplexy, klastrové komplexy	

V roce 1962 byl Winkelmanem při jeho pokusech s Walkerovým karcinosarkomem u potkanů syntetizován HpD, který byl po chemické stránce přesně definovaný, ve vodních roztocích stabilní a dobře rozpustný. Tímto derivátem byl meso-tetra(4-sulfonatofenyl)porfin (TPPS4), který kumuloval v nejvyšší koncentraci právě v tumorech, nikoliv v ostatních orgánech (Winkelman, 1962). V porovnání s jinými HpD byla koncentrace TPPS4 v nádorové tkáni také vyšší. Další zkoumání tohoto slibného preparátu však poukázalo na jeho renální toxicitu a bohužel i na neurotoxicitu po intraperitoneálním podání (Winkelman a Collins, 1987). Morfologické studie potvrdily degenerativní změny periferních motoneuronů, což bylo důvodem výrazného omezení použití TPPS4 v klinické praxi, TPPS4 byl rezervován výhradně k lokální aplikaci u kožních malignit a experimentálně u kožních metastáz (Lapeš a spol., 1996).

**Obrázek 10.** *Verteoporfin, ALA a temoporfin*



Verteoporfin (**Obrázek 10**) je hlavním zástupcem benzoporphyrinových derivátů. Jeho absorpční maximum je posunuto až k  $\lambda$  690 nm, v tumoru se rychle kumuluje a díky rychlé clearance je minimálně fototoxický – kožní fotosenzitivita tudíž přetrvává pouze pár dní. Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen cca po 15 min (Richter a spol., 1990). Vzhledem k jeho dominantnímu působení na cévní zásobení se výborně hodí k terapii tumorů s bohatou neovaskularizací. Tento mechanismus účinku je v klinické medicíně hojně využíván v oftalmologii, kde se s vysokou účinností (80–90 %) používá k PDT stařecké makulární degenerace a chorioretinopatie, experimentálně i maligního melanomu sítnice (Bressler a Bressler, 2000; Tatar a spol., 2006).

Texafyriny jsou plně syntetické makrocyclické sloučeniny s centrálně chelovaným atomem lutecia nebo gadolinia. Motexafin Lu vykazuje silnou absorpci při dlouhé  $\lambda$  (732 nm), což zajišťuje hluboký průnik světla do tkáně a současně nedochází k pohlcování světla v cévním řečišti hemoglobinem. Má dobrou selektivitu pro nádorové tkáně s rychlou eliminací z krevní plazmy a po ozáření světlem vyvíjí jen nepatrnou fotosenzitivitu (Stewart a spol., 1998). Tyto výhodné vlastnosti předurčují jeho dobré využití i u silně pigmentovaných lézí (maligní melanom) s dobrou odezvou na opakované PDT aplikace (Woodburn a spol., 1998). Ve sloučeninách s Gd jsou základem kontrastních látek pro MR, což umožňuje jejich jednoduchou vizualizaci v tumoru. Jako léčiva, často v kombinaci s různými cytostatiky, se testují na nejrůznější adenokarcinomy, nemalobuněčný karcinom plic, tumory mozku i non-Hodgkinův lymfom – v těchto případech využití se již nedá mluvit o klasickém fotosenzitizéru, ale o radiosenzitizéru (Richards a Mehta, 2007).

Kyselina 5-aminolevulová (ALA, **Obrázek 10**) je látka endogenní. ALA je součástí biosyntetické cesty hemu, která je kontrolována negativní zpětnou vazbou – vyšší koncentrace hemu v mitochondriích inhibuje konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Exogenním dodáním ALA lze tento kontrolní mechanismus obejít a dochází k syntéze protoporfyrinu IX, který poté funguje jako účinný fotosenzitizér. Buňky s vysokým metabolickým obrátem produkují protoporfyrin IX ve zvýšené míře. Selektivita k nádorové tkáni a účinnost ALA je multifaktoriální, jsou podmíněné např. zvýšenou permeabilitou abnormálního keratinu, zvýšenou hladinou porfobilonogendeaminázy, sníženou koncentrací železa a sníženou aktivitou ferrochelátázy (to zaručuje, že se protoporfyrin nemění dále na fotodynamicky neaktivní hem). Všechny tyto faktory vedou ke kumulaci protoporfyrinu IX v postižené tkáni. Protože indikace k systémové aplikaci jsou velmi omezené, je ALA hlavním zástupcem preparátů používaných lokálně. ALA byla na konci roku 2000 v USA schválena k použití k léčbě solární akantózy (aktinoidní keratózy), registrovaným byl kanadský přípravek Levulan Kerastick (DUSA Pharmaceuticals) (Jeffes, 2002). ALA je aktivována světlem o  $\lambda$  635 nm (modré spektrum), kvůli její nízké aktivitě je však třeba použít vysokoenergetických zdrojů nebo delšího času ozáření. Optimální interval mezi aplikací a ozářením je 4 h. Vzhledem k nízké lipofilitě ALA se v terapii momentálně používají spíše její estery – např. norskó-švýcarský metylester Metvix (Photocure/Galderma). Krém Metvix lépe proniká do tkáně (zejména při kožní aplikaci) a po hydrolýze uvolňuje volnou ALA (Klein a spol., 2008). Výborný kosmetický efekt předurčil ALA k pravděpodobně nejčastější indikaci PDT v klinické praxi. K dalším dermatologickým indikacím přibýly terapie bazaliomu a spinaliomu, u kterých jedna aplikace PDT dostačuje na tumory do 1 cm v průměru. U větších tumorů je nutno PDT opakovat nebo použít ozáření v kombinaci s intralezionálním

zavedením světlovodného vlákna v lokální anestezii (Calzavara-Pinton a spol., 2007; Gupta a Ryder, 2003). Metvix se dále využívá v terapii kontaktní dermatitidy, akné, vrásek, leukoplakie dutiny ústní a hojení chronických ran. Benzylester ALA je schválen k paliaci tumorů GIT. Hexylester ALA (Hexvix, Photocure) vykazuje při cystoskopické instilaci dobrý efekt jednak v diagnostice i v terapii papilárního karcinomu močového měchýře (Ferré a spol., 2013).

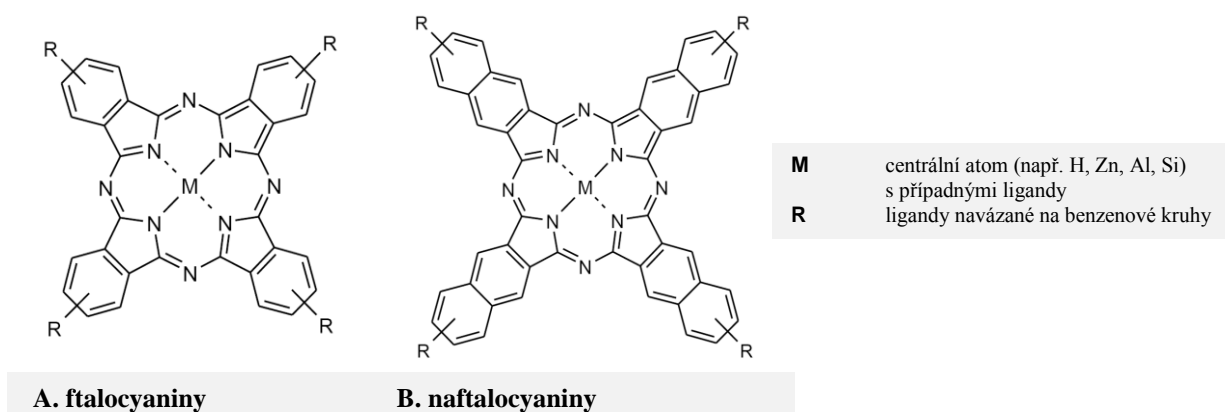
Chloriny představují další velkou skupinou fotosenzitizérů II. generace. Jedná se o degradační produkty chlorofylu, které absorbují světlo o vlnových délkách 640–700 nm. V roce 1989 byl syntetizován nejúčinnější z nich – temoporfin (Foscan, Biolitec Pharma) – poslední na **Obrázku 10** (Berenbaum a spol., 1993). Jeho absorpční maximum sice není příliš posunuto k červené oblasti (652 nm), avšak extinkční koeficient je při tomto maximu asi 10× vyšší než u HpD. Spolu s dobrou produkcí singletového kyslíku jsou pro dostatečný účinek potřebné velice malé dávky jak fotosenzitizéru (cca 0,1 mg/kg), tak i použitého světla (pouze 20 J/cm<sup>2</sup>), což ho činí přibližně 100× účinnějším než HpD (Sharman a spol., 1999). I když doba ozáření je mezi fotosenzitizéry jedna z nejkratších, optimální interval mezi ozářeními a i. v. aplikací zůstává 4 dny. Jeho nevýhodou je relativně dlouhá kožní fotosenzitivita (cca 15 dní), proto je potřebné v průběhu ozařování zakrýt části těla pacienta, které nemají být ozářeny. Selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání je poměrně malá (poměr nádorová/zdravá tkáň asi 1,3–2,9) (Ronn a spol., 1996). I přes nepříznivé farmakokinetické parametry je Foscan zaveden v terapii kožních premalignit, tumorů oblastí hlavy a krku, jícnu a tumorů endobronchiálních; experimentálními indikacemi jsou vulvální intraepiteliální neoplazie, karcinom pankreatu, bazoluminální karcinom a maligní pleurální mezoteliom. Další zástupce této skupiny je látka patřící do skupiny metalochlorinů – rostaporfin. Uprostřed jádra má chelatovaný kation cínu. Nevýhodou rostaporfinu je potřeba vysokých dávek světla a delší kožní fotosenzitivita – obě negativa jsou srovnatelné s HpD. Původně se tento fotosenzitizér zkoušel pro terapii Kaposiho sarkomu u imunosuprimovaných pacientů. Talaporfin je syntetický aspartyl-derivát chlorinu e6 (NPe6). Prokazuje silnou absorpci při vyšších  $\lambda$  (664 nm), je hydrofilní a má podobnou farmakokinetiku jako verteporfin. Interval mezi aplikací a ozářeními je 4 h. Experimentální studie ukazují, že talaporfin primárně působí na cévní zásobení tumoru – v nízkých dávkách došlo k regresi tumoru pouze krátkodobě, při vyšších dávkách byla regrese dlouhodobá, ovšem za cenu ztráty selektivity. Kožní fotosenzitivita byla označena pouze jako „dočasná“. Klinické uplatnění našel v terapii kožních onemocnění, časných stadií karcinomu plic, hepatocelulárního karcinomu (i přes svou hepatotoxicitu), kolorektálního karcinomu, mozkových gliomů a nejlepších výsledků dosahuje v terapii makulární degenerace (Taber a spol., 1998). Purpuriny jsou degradační

produkty chlorofylu. Interval mezi aplikací fotosenzitizéru a vlastní PDT je až 24 h, pracovní  $\lambda$  je 660 nm. Jejich nevýhodou je nestabilita ve vodním prostředí a časté alergické reakce.

Feoforbidy a pyrofeoforbidy lze také řadit mezi chloriny. Kožní fotosenzitivitu prakticky nevyvolávají a jejich absorpčním maximem je 665 nm. Hlavním zástupcem je fotochlor. Tento lipofilní fotosenzitizér se vyznačuje vysokou selektivitou k nádorové tkáni a uplatňuje v terapii endobronchiálních tumorů a Barrettova jícnu, dále se zkouší i v terapii maligních gliomů a kožního skvamocelulárního karcinomu (Bellnier a spol., 2006; Lobel a spol., 2001; McCaw a spol., 2000). Odvozenou strukturou je padeliporfin (Pd-bakteriofeoforbid – TOOKAD Soluble, Steba Biotech), který se nyní testuje ve III. fázi pro vaskulárně cílenou PDT lokalizovaného karcinomu prostaty (Azzouzi a spol., 2013).

Další perspektivní skupinu fotosenzitizérů II. generace představují ftalocyaniny (Pc) a od nich odvozené naftalocyaniny. Chemicky se podobají porfyrinům – jedná se o symetrické cyklické sloučeniny, ovšem s tím rozdílem, že pyrolová jádra jsou místo methinových můstků spojena přes dusík a navíc jsou ke všem pyrolovým jednotkám přikondenzovány benzenové kruhy, což jednak posunuje maximální  $\lambda$  absorpce směrem k červené části spektra (670–700 nm) a jednak zesiluje absorpci při této  $\lambda$ . Do jejich centrálního kruhu se vážou kovové prvky nebo vodík, na které se pak mohou vázat další ligandy (**Obrázek 11**). Přítomnost chelatovaných centrálních kovů a polokovů je důležitá pro vlastní PDT účinek. Některé centrální atomy (diamagnetické kovy – např. Zn, Al, Si) prodlužují trvání tripletového stavu fotosenzitizéru a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT. Tyto výhodné vlastnosti spolu s nepříliš obtížnou syntézou činí ftalocyaniny nadále velice nadějnými fotosenzitizéry budoucnosti.

**Obrázek 11.** Ftalocyaniny a naftalocyaniny



Jako tetrapyrolová barviva jsou známá více jak 100 let. Původní hlavní použití v metalurgickém a chemickém průmyslu se později rozšířilo i do průmyslu textilního a papírenského. Nyní se lze s využitím metaloftalocyaninů potkat v rámci sofistikovaných

elektrotechnických a informačních technologií denně – záznamové strany optických disků, tonery laserových tiskáren a kopírek, displeje z tekutých krystalů, fotobuňky apod. (Sakamoto a Ohno-Okumura, 2009). Jejich použití v PDT je však otázkou posledních cca 30 let. Ftalocyaniny jsou látky vesměs hydrofobní. Kvůli velice špatné rozpustnosti nejen ve vodě, ale i v organických rozpouštědlech, byla jejich aplikace zpočátku problematická. Příčinou této nevhodné vlastnosti je planární uspořádání benzenových jader v makrocyklu, které vede ke tvorbě agregátů – ty se vyznačují velmi slabým fotodynamickým efektem. Alespoň částečné hydrofilie, a tím i možnosti i. v. podání, se dosáhlo teprve za pomoci modifikace jejich molekul na periferii (např. sulfonací). Inkorporace do lipozomů následně umožnila jejich lokální aplikaci ve formě lipozomálních preparátů – např. zinečnatý ftalocyanin (Kolářová a spol., 2007; Li a spol., 2008; Love a spol., 1996; Moša a spol., 1997; Nekvasil a spol., 2007; Regehly a spol., 2007; Yslas a spol., 2007). Oproti všem ostatním fotosenzitizérům spočívá výhoda ftalocyaninů v jejich rychlé absorpci v tumoru, kde dostatečné hladiny pro účinnou PDT je dosaženo řádově po minutách. Směs hlinitého sulfonovaného ftalocyaninu (Photosense, NIOPIC) je registrována v Rusku a tam i schválena k terapii kožních, endobronchiálních tumorů, karcinomu prsu a premaligních lézí oblasti hlavy a krku (Vakulovskaya a spol., 2002). Křemičitý komplex ftalocyaninu je zkoušen k léčbě kožních a podkožních metastáz různých solidních tumorů (Baron a spol., 2005). Naftalocyaniny jsou deriváty ftalocyaninů. Přidání dalších benzenových jader periferně jim umožňuje absorpci při velice dlouhých  $\lambda$  (až 800 nm), čímž se dosažitelnost terapeutické hloubky zvyšuje. Proto lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované neoplazie jako např. maligní melanom, u kterého bylo nejlepších účinků dosaženo s hlinitým naftalocyaninem. Naftalocyaniny patří mezi preparáty s vysokou selektivitou k nádorové tkáni, s pomalým vylučováním z tumoru, s nulovou fotosenzitivitou a s výrazným fotodynamickým efektem na různé tumory (Shopova a spol., 1999).

Výše zmíněné látky patří mezi hlavní fotosenzitizéry II. generace. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických, jež se na PDT testují a případně modifikují k obrazu co nejvíc ideálního fotosenzitizéru. Safyriny jsou ve vodě rozpustné expandované porfyriny s absorpcí světla v oblastech kol 675 nm. Při pokusech na myších vykazovaly vysoký poměr rozdělení fotosenzitizéru mezi nádorovou a okolní svalovou tkáň, ovšem hodnoty maximální intratumorózní koncentrace byly naměřeny až po 3–6 dnech po aplikaci (Král a spol., 2002). Metylénová modř je derivátem fenothiazinu, vykazuje maximální  $\lambda$  668 nm, extracelulárně působí antiviroticky a je pro člověka prakticky netoxická (Wainwright a spol., 2007). Její použití *in vivo* je limitováno enzymovou redukcí na



leukoformu, jež fotodynamicky aktivní už není. V Brazílii se testuje pro terapii Kaposiho sarkomu (Tardivo a spol., 2006). K dalším barvivům patří rhodaminy, které jsou charakteristické svou vysokou fluorescencí. Toho se využívá mj. i k detekci účinnosti jiných fotosenzitizérů. Bromovaný analog TH9402 se *ex vivo* používá k PDT purifikaci autologních kmenových buněk v autotransplantační terapii chronické myeloidní leukemie (Basseur a spol., 2000). K topické terapii některých kožních onemocnění (psoriáza, amelanotický melanom) se používají porfyceny (Szeimies a spol., 1996). Červenofialový hypericin, chemicky hydroxyantrachinon (naftodianthron), jakožto účinná látka výtěžku z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) působí jako antidepresivum, částečně jako přírodní antimikrobiotikum (používá se i ke sterilizaci transfuzních preparátů) a konečně jako diagnostikum při fluorescenční detekci nádorových tkání (Waser a Falk, 2007) a k terapii povrchových tumorů, zejména metastatického melanomu (Kleemann a spol., 2014). Fenomén tzv. letálního hypericizmu, kdy po expozici kůže slunečním a UVA zářením, dochází k výraznému lokálnímu erytému a edému je pozorován u volně se pasoucího skotu po požití velkého množství třezalky. U lidí je výskyt fotosenzitivity při léčbě hypericinem vzácný, projevuje se zvláště u albínů (Waser a Falk, 2007).

### **Fotosenzitizéry třetí generace**

I. generace fotosenzitizérů se vyznačovala prodlouženou kožní fototoxicitou a retencí v organismu pacienta, nízkým extinkčním koeficientem a absorpčním vrcholem v oblasti krátkých  $\lambda$ . Představitelé II. generace sice již měli tyto nevýhodné charakteristiky zmírněné, přesto však vykazují nevyhovující farmakokinetické vlastnosti a ztrátu fotodynamické aktivity ve vodném prostředí. V zájmu překonání některých z těchto nevýhod a zvýšení tumor-selektivity, se vyvíjí III. generace fotosenzitizérů (Muehlmann a spol., 2013). Kromě testování již známých látek na poli PDT (např. bengálské červeně v PDT karcinomu děložního čípku) a vývoje zcela nových chemických látek (s částečně nelineárními vlastnostmi v pro nás žádoucích oblastech  $\lambda$ ) se vývoj biofotoniky ubírá cestou nanotechnologií, tj. zabudováváním již ověřeně působících fotosenzitizérů do nanočástic, které slouží jako jejich nosiče do cílových nádorových tkání (Panzarini a spol., 2014).

Slibnými novými fotosenzitizéry se kromě porfyrin-calixarenových a porfyrin-cyklodextrinových komplexů ukazují tzv. supramolekulární skládačky – klastry. Zejména molybdenové a boranové klastry jsou díky vazbě kov-kov chemicky stabilní, silně luminiscenční a mají vysoké výtěžky singletového kyslíku (Bould a spol., 2011). Přítomnost kovu je základem magneticky cílené distribuce fotosenzitizérů (Furlani a Furlani, 2007). Kladem sloučenin s chelatovaným atomem B je dále možnost kombinace PDT s neutronovou

terapií (Hill a spol., 1992). Velké očekávání v PDT v kombinaci s fototermální terapií se v současnosti vkládá do zlatých nanočástic (Gamaleia a Shton, 2015). Afinity jednotlivých fotosenzitizérů k různým nádorovým buňkám je rozdílná. Taktéž je rozdílná i jejich konečná akumulace v těchto buňkách, na které se podílí rozdílná lymfatická drenáž tumorů, změny v pH, nárůst lipoproteinových receptorů a abnormální nádorové stroma. Proto je nepochybně nejnadějnějším směrem pro fotosenzitizéry III. generace tzv. targeting, cílení fotosenzitizérů. Targeting zvyšuje jejich afinitu k tkáni tumoru, příp. až k subceluárním strukturám (mitochondrie), a tím v konečném důsledku i selektivitu destrukce patologické tkáně (Josefsen a Boyle, 2008).

### **Targeting fotosenzitizérů**

Selektivitu akumulace fotosenzitizérů v nádorové tkáni oproti tkáni zdravé lze zvýšit jednak změnou vlastností jejich samotných molekul, tj. vývojem nových fotosenzitizérů, jednak zlepšením farmakokinetiky již vyzkoušených a osvědčených fotosenzitizérů II. generace. To je principem cílené biodistribuce cestou pasivního i aktivního targetingu.

Pasivní targeting fotosenzitizérů je založen na změně aplikační formy fotosenzitizéru. Mnoho účinných fotosenzitizérů je příliš hydrofobních a ve vodném médiu špatně rozpustných. Fotosenzitizéry enkapsulované do lipozomů, biodegradabilních polymerních částic a ve formě olejových disperzí a konjugátů s hydrofilními polymery využívají k cílení přirozené distribuční mechanismy (pasivní difuze, fagocytóza). Vhodný nosič zabraňuje agregaci fotosenzitizérů v krevním řečišti a takto aplikované fotosenzitizéry mohou jednoduchým fyzikálním procesem zvýšené filtrace pronikat skrz cévní stěnu do poškozených oblastí nádorové tkáně. K efektu zde přispívá i snížené množství lymfatických cév, které za normálních okolností tuto zvýšenou extravazální exsudaci odstraňují (Reddi, 1997). Deriváty ricinového oleje (např. Cremophor EL, BASF), které byly použity jako rozpouštědlo, mění profil lipoproteinů, čímž ovlivňují biodistribuci fotosenzitizérů, a tím i účinnost onkoterapie (Woodburn a spol., 1995). Jinou metodou je inkorporace fotosenzitizérů do lipozomů, kde je možnost i aplikace lokotopické (Nekvasil a spol., 2007). Výborná distribuce lipozomálních fotosenzitizérů do tumorů je podmíněná účinným přenosem na LDL lipoproteiny (Ginevra a spol., 1990). Pro enkapsulaci se používají nejrůznější druhy lipozomů, např. lipozomy ultradeformační, pH senzitivní nebo magnetické. Na LDL a další sérové proteiny se fotosenzitizéry dají procesem tzv. prekomplexace napojit i přímo, kdy hydrofobní jádro LDL částic slouží jako solubilizační médium pro hydrofobní fotosenzitizéry. Také různé druhy syntetických polymerů (poloxamery, polyetylenglykol) nebo polyionické micely, multifunkční nanočástice, albuminové mikrosféry a nanoemulze s inkorporovanými

fotosenzitizéry překonávají endoteliální bariéru lépe než fotosenzitizéry samotné. Rizikem používání nanočástic je, že se jedná o cizorodý materiál, který se inkorporuje do buněk (Vargas a spol., 2008).

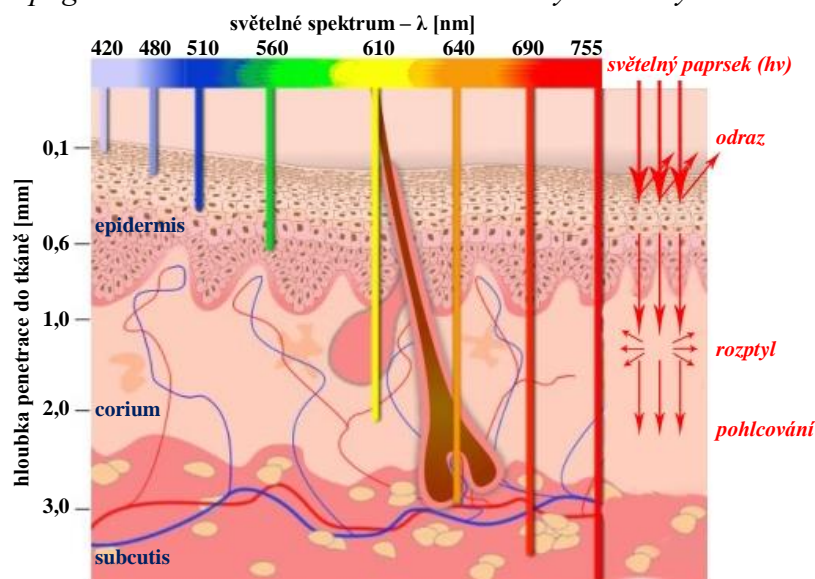
Podstatou aktivního targetingu jsou konjugáty – fotosenzitizéry III. generace, které kromě vlastního fotosenzitizéru obsahují i část s vysokou afinitou k receptoru nebo antigenu na povrchu cílových struktur. Působí tak direktněji a ve specifitější lokalizaci se zvýšenou účinností a tumor-selektivitou, čímž je docíleno podání nižší potřebné efektivní dávky. Konjugáty fotosenzitizérů s monoklonálními protilátkami jsou nástroji velmi perspektivními (Chen a spol., 2006). Mezi nejčastější proteiny a protilátky, které se na fotosenzitizér váží buď přímo kovalentně nebo přes povrch lipozomů, patří EGF, VEGF, interleukiny a mnoho dalších specifických markerů a oligopeptidů. V tomto směru se již mluví o fotoimunoterapii (Huang a spol., 2007). Dalším efektem blokády VEGF je antiangiogeneze v okolí tumoru. Jiné vazebné ligandy, které se v rámci aktivního cílení testují, jsou inzulin, transferin, foláty, alifatické aminy (spermidin, spermin) a steroidy (Taquet a spol., 2007).

### **3.4.6 Terapeutické zdroje světla a světlovodné technologie**

#### **Terapeutické zdroje světla**

Úspěšnost PDT je závislá nejen na volbě fotosenzitizéru a hladině kyslíku v nádorové buňce, ale také na použitém světelném zdroji. Výběr vhodného světelného zdroje je podmíněn dvěma základními faktory: absorpčním spektrem fotosenzitizéru a hloubkou průniku světla do tkáně. Vlnové délky světla používaného v PDT se nachází v rozptylu 600–900 nm. Kratší  $\lambda$  jsou pohlcovány endogenními barvivy (hemoglobin, melanin), vodou a některými lipidy; delší  $\lambda$  zas nemají dostatečnou energii potřebnou k aktivaci fotosenzitizérů (Alexiades-Armenakas, 2006; Kashtan a spol., 2002; Marcus a McIntyre, 2002; Nowis a spol., 2005; Taub, 2007). Tři základní procesy – fyzikální principy optiky – a jejich kombinace řídí všechny interakce světla s tkáněmi: reflexe (odraz), disperze (rozptyl) a absorpce (pohlcování). Tyto procesy se vzhledem k nehomogenitě tkání samostatně stanovují poměrně obtížně. Výsledek jejich působení je dán převažujícím procesem. **Obrázek 12** ilustruje šíření světla o různých  $\lambda$  v tkáních včetně jeho interakcí s nimi. Propagace světla do tkáně je rozhodujícím způsobem ovlivněno  $\lambda$ . Delší  $\lambda$  jsou schopny pronikat do tkáně hlouběji – při vlnové délce 630–800 nm se hloubka penetrace reálně pohybuje od 8 do 20 mm, ale na straně druhé zde může odraz světla dosahovat až 50 %. Odraz světla v dutinách vede ke zvýšení účinku díky úplnému vstřebání světla – množství světla proniklého do tkáně tak může být např. při PDT močového měchýře 5–7× vyšší (Pervaiz a Olivo, 2006).

**Obrázek 12.** Propagace a tkáňová interakce světla o různých vlnových délkách



Zdroj: [www.reflexions.ulg.ac.be](http://www.reflexions.ulg.ac.be), 2015 (modif.)

V minulosti se jako zdroje světla pro PDT používaly širokospektrální, speciálně upravené lampy s barevnými či tepelnými filtry pro konkrétní  $\lambda$ . V roce 1942 Auler a Banzer ve svém experimentu hematoporfyrin aktivovali křemíkovou lampou (Auler a Banzer, 1942). V 60. letech minulého století se používaly lampy s xenonovým obloukem – Xe výbojky (600–660 nm) a postupně pak lampy halogenové (570–750 nm) a v letech 90. lampy wolframové (cca 600 nm) (Alexiades-Armenakas, 2006; Moša a spol., 1997). Konvenční lampy jsou nevýhodné pro jejich výrazný tepelný efekt, nízkou intenzitu světla a hlavně obtížně kontrolovatelnou celkovou energii neionizujícího záření. Je nutno podotknout, že s rozvojem nových fotosenzitizérů ale dochází k jisté renesanci jejich použití. V dermatologii se vzhledem k superficiálně uloženým cílům PDT využívá spíše modré spektrum a inkohrentní světelné zdroje se používají pouze k ozařování velkých ploch – klasické lampy zde nahradily světlo emitující diody – polovodičové LED emitory. LED emitory jsou schopné elektroluminiscencí generovat dostatečnou energii při odpovídající  $\lambda$ . Oproti laserům jsou ale málo výkonné, úzkospektrální a září také inkohrentně (MacCormack, 2008). Zářivé výkony v aktivačních  $\lambda$  však nebyly pro navození fotodynamického jevu v celém objemu tumoru dostatečné a navíc také docházelo k ozaření okolních zdravých tkání.

V současnosti se v PDT jako zdroje dlouhovlnného světla používají více lasery, které produkují velmi intenzivní monochromatické, lineárně polarizované a koherentní světelné paprsky s nastavitelným výkonem (Kruijt a spol., 2006; Kyriazi a spol., 2008). Vzhledem k tomu, že při PDT je třeba zajistit co nejkratší časy exponence, a tedy velkou intenzitu záření na relativně malých plochách, tj. dosažení maximální penetrace do tkáně, vyhovuje nejlépe jako zdroj záření právě laser. Vedlejším pozitivem při jeho použití je částečně i efekt

analgetický a antiedematozní. V rámci PDT své uplatnění nejdříve našly lasery plynové – iontové. V 70. letech 20. století se k terapii diabetické retinopatie používal běžně laser argonový, který své uplatnění našel i v experimentech. Ar laser mohl operovat ve 13 různých  $\lambda$  (nejčastěji však modré 488 nm a zelené 514 nm), což umožňovalo výhodně používat rozdílné fotosenzitizéry (Barnes, 1975; Dougherty a spol., 1975). Dnešní přístroje mají zpravidla nastavenou jen jednu přesnou  $\lambda$ . Nevýhodou jeho použití byla velikost, tím i nepohyblivost přístroje, energetická náročnost, nutnost vodního chlazení, nízká spolehlivost a samozřejmě cena. Plynové lasery postupně nahrazovaly lasery pevnolátkové. Nd:YAG laser díky vysokému výkonu, vyšší spolehlivosti, nižší náročnosti na údržbu a vhodné  $\lambda$  nacházel své uplatnění od roku 1980, kdy se zpočátku využíval při paliativní PDT endobronchiálních tumorů (McCaughan a spol., 1986). Aktivním materiálem je izotropní krystal yttrito-hlinitého granátu dopovaný ionty neodymu a dodnes patří v medicíně k nejpoužívanějším typům laserů. Posledních 25 let mají nejširší využití v PDT lasery diodové. Jejich výhoda spočívá v dobré absorpci v měkkých tkáních s obsahem hemoglobinu, v nízké pořizovací ceně, kompaktních rozměrech a levném provozu. Nevýhodná je ale přednastavená  $\lambda$  bez možnosti její změny, z čehož vyplývá nutnost použití jiného typu laseru pro každý fotosenzitizér. Dalším úskalím využití diodových laserů je poměrně nízká účinnost v převodu elektrické energie na světelnou (< 15 %), takže dochází také k poměrně velikým tepelným ztrátám. Účinnost převodu (až na 50 %) lze zvýšit spárováním každé diody s vlastním světlovodným vláknem. I přes tyto nevýhody mají polovodičové lasery široké uplatnění – používají se jak pro endoskopická vlákna, tak pro ozařování větších ploch. Budoucnost vývoje laserů se zaměřuje na vývoj diodového laseru s možností variability  $\lambda$  dle potřeby jednotlivých fotosenzitizérů. Celá PDT by tak byla cenově dostupnější. Příslibem jsou organické LED lasery a tzv. femtosekundové lasery – barvivové laditelné vysokorychlostní pulzní (excimerové) lasery, které jsou testovány pro dvoufotonovou PDT (Brancaleon a Moseley, 2002; Quian a spol., 2012).

Interakci laserového záření s tkání lze obecně popsat pomocí mechanismů, jež jsou závislé na  $\lambda$ , intenzitě, expoziční době a druhu tkáně. Vzhledem k nízkým intenzitám záření ( $0,1\text{--}10\text{ W/cm}^2$ ) má v PDT uplatnění jen mechanismus fotochemický. Fototermální, fotoablativní a fotoplazmatický mechanismus se u PDT neuplatňují. Odhlédneme-li od typu zdroje, rozhodujícími parametry každého světelného zdroje jsou  $\lambda$ , světelný výkon a celková energie záření – viz **Tabulka 13**. Ideální světelný zdroj pro PDT by měl splňovat tyto charakteristiky:

- a) být dostatečně absorbován fotosenzitizérem,
- b) dosahovat dostatečného průniku do tumoru,

- c) mít dostatečnou energii ke spuštění fotochemické reakce v co nejkratším časovém intervalu,
- d) být co nejvíc šetrný k okolní zdravé tkáni – nevyvolávat purpuru, termické poškození nebo trvalé změny pigmentace.

**Tabulka 13.** Fyzikální veličiny záření – parametry světelného zdroje

Veličina	Definice	Značka	Jednotka
zářivý tok	energie přenesená zářením danou plochou za jednotku času – výkon přenášený zářením	$\Phi_e$	W
vlnová délka	vzdálenost dvou nejbližších bodů postupného periodického vlnění, které kmitají ve fázi	$\lambda$	nm
intenzita záření	ozářenost, hustota zářivého toku – podíl zářivého toku dopadajícího na plošný element v daném bodě a velikosti této plochy	$E_e$	W/cm <sup>2</sup>
dávka ozáření	celková energie záření – podíl zářivé energie dopadající na plošný element v daném bodě a velikosti této plochy	H	J/cm <sup>2</sup>
poměrné spektrální rozložení účinnosti záření	relativní poměrná hodnota – podíl spektrální účinnosti j-tého pásma k maximální účinnosti záření	$S_\lambda$	1

Zdroj: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org), 2015 (modif.)

### Světlovodné technologie

Při ozařování povrchově dostupné větší plochy (např. kůže) světelným zdrojem existují tři základní možnosti. Buď světlo působí na ozařované místo přímo, bez nutnosti jeho modifikace a dalšího přenosu, nebo je k zvýšení jeho penetrace do tkáně použit systém čoček a korekčních filtrů. Cíl minimalizovat ztráty v přenosu světelné energie od zářiče k cílové tkáni by bez rozvoje optických technologií dosažitelný nebyl. Dosažitelnost cílů PDT v orgánových dutinách a trubicích by bez použití světlovodných vláken nebyla možná. Optická vlákna zavedená pracovním kanálem endoskopu zabezpečují direktní a cíleně adresované ozáření. Ke zlepšení rozptylu světla lze dutiny navíc vyplnit koloidním roztokem, který zajistí disperzní rozptyl světla všemi směry. Takto se postupuje např. při odstraňování reziduální nádorové tkáně po operacích tumorů mozku a močového měchýře (Rendon a spol., 2006). Přes konvenční koaxiální konektor se světlo k cíli přenáší optickým vláknem. Možností úpravy zakončení vlákna je víc – od vlákna holého s bodovým působením až po vlákno částečně oplášťované s bočním zářením nebo optické vlákno zakončené mikročočkou či speciálním (sférickým/cylindrickým) difuzérem k působení s rovnoměrným rozptylem světla (Huang a spol., 2008; Mordon a spol., 2015). Poslední jmenované jsou principem tzv. intersticiální PDT, kterou lze využít i k PDT solidních tumorů se zavedením světlovodného aparátu přímo intralezionálně (Šmucler a Mazánek, 2004).

### 3.4.7 Měření účinnosti PDT – dozimetrie a fluorescence

#### Efektivita PDT

Efektivita PDT je ovlivněna faktory zahrnující absorpční spektrum fotosenzitizéru,  $\lambda$  aktivačního světla, hloubku tkáňové penetrace a biologickou odpověď tkáně na singletový kyslík. V ideálním případě by použitá  $\lambda$  měla odpovídat jednomu z absorpčních maxim fotosenzitizéru. A protože tkáňová penetrace závisí na  $\lambda$ , musí být vlnové délky zářiče vybrány tak, aby dostatečné množství fotonů dosáhlo určené místo zásahu. Ve viditelné oblasti spektra se vzrůstající  $\lambda$  roste i hloubka penetrace záření do tkání. Kromě vlnové délky emitovaného vlnění je dalším faktorem, který podstatně ovlivňuje výslednou penetraci do postižených tkání, i absorpční charakteristika „nadložních“ tkání. Právě „nadložní“ funguje jako přirozené stínění, jehož velikost je závislá především na celkové hustotě těchto centrifugálně uložených tkání. Pro klinickou charakteristiku PDT plně postačují údaje o dávce fotosenzitizéru,  $\lambda$  použitého světla a době ozáření. Rozhodujícím momentem v efektivitě PDT je ale světelná energie předaná fotosenzitizéru, kterou lze měřit dozimetrií.

#### Dozimetrie

Dozimetrické měření neionizujícího záření v živých tkáních je značně složité. Existují tři základní možnosti měření – dozimetrie direktní, explicitní a implicitní. Direktní dozimetrie sleduje přímo hladinu singletového kyslíku intratumorálně, explicitní dozimetrie tuto hladinu vypočítává z hodnot fotosenzitizéru a v případě implicitní dozimetrie se k výpočtu používají vedlejší produkty fotochemických reakcí. Účelem světelné dozimetrie je stanovení optimálních dávek fotosenzitizérů a kontrola přesného doručení světelné energie, tím zvýšení účinnosti samotné PDT (Hu a spol., 2014). Velmi vysoké dávky světelné energie vedou k poškození tkáně, nízké dávky naopak k selhání PDT. Vzhledem ke složitosti měření dozimetrie v nehomogenním organickém prostředí je dozimetrie tkáně tumoru pacientů jen záležitostí teoretickou, odvozenou – vypočítává se nepřimo ze světelného paprsku a množství energie dopadnuvší na povrch tkáně, kdy se měření provádějí bioimpedantní spektroskopií *in vivo* (Gersing a spol., 2003). Exaktnějším postupem je histopatologické kvantitativní určení koncentrace fotosenzitizéru *ex vivo* metodami planimetrie a denzitometrie (Sheng a spol., 2004).

#### Fluorescence

Fluorescence je druh fotoluminiscenčního záření, které je vyvoláno buď účinkem jiného dopadajícího záření, nebo účinkem dopadajících částic. Toto sekundární záření je

charakterizováno vyzářením energie atomem, který energii pohltí, ve velmi krátké době ( $10^9$ – $10^6$  s). Jedná se o přechod z prvního singletového stavu do singletové hladiny. Fluorescence hraje důležitou roli v diagnostice malignit. Optické vlastnosti tkáně závisí na míře přítomnosti endogenních chromoforů, jež se liší v nenádorové a nádorové tkáni – při ozáření tkáně UV zářením a i částí viditelného spektra jsou absorpce a následná fluorescence odlišné. Rozdíl mezi zdravou a nádorovou tkání se určuje podle intenzity emitovaného světla, jeho následné distribuce ve spektru a délce trvání fluorescence (Alexiades-Armenakas, 2006; Sheng a spol., 2004; Sugden, 2004). Základním přirozeným nefluorescentním chromoforem je hemoglobin, který pohlcuje  $\lambda$  do 600 nm. Ostatní přítomné látky – myoglobin, kolagen, elastin, fenylalanin, tryptofan, tyrozin, porfyriny apod. – patří mezi tzv. vnitřní, vlastní fluorofory a pohlcují světlo v rozsahu 240–500 nm a vyzařují světlo s  $\lambda$  300–700 nm (Diamond a spol., 2003; Chen a spol., 2002). Jak bylo již zmíněno, většina fotosenzitizérů na straně druhé silnou autofluorescenci vykazují, patří mezi tzv. vnější, nevlastní fluorofory. Této vlastnosti se využívá k diagnostice rozsahu některých nádorových onemocnění kůže, jícnu, bronchů, močového měchýře a krčku dělohy, kdy fotosenzitizéry slouží jako fluorescenční sondy a značky. K fluorescenční spektrometrii lze použít jedno- i dvousondový systém. Fluorescenci lze měřit *in* i *ex vivo* v zobrazení makro- i mikroskopickém. Intraoperační fluorescence umožňuje jednak přesný, aktuální staging malignity a posléze i řízenou resekci tumoru ve zdravé tkáni nebo navigaci PDT v reálném čase. Příkladem budiž využití ALA a Photofrinu v PDT multiformních glioblastomů mozku (Eljamel a spol., 2008).

### **3.4.8 Současnost a budoucnost PDT**

#### **Současné využití PDT**

PDT je v současnosti v rámci terapie různých typů malignit klinicky plně akceptovanou modalitou. V klinické praxi je ve světě používána především jako alternativní metoda k paliativnímu řešení maligních endobronchiálních, ezofageálních a biliárních obstrukcí, k terapii Barrettova jícnu, karcinomů žaludku, močového měchýře a prostaty, karcinomů *in situ* hrdla děložního kožních malignit a tumorů mozku (Agostinis a spol., 2011; Barrett a spol., 2014; Brown a spol., 2004; Triesscheijn a spol., 2006). PDT dále slouží jako peroperační adjuvance při chirurgickém řešení rozsáhlých tumorů různých orgánových systémů, které by si jinak vyžadovali nerealizovatelný extenzivní resekční výkon. Takovým příkladem je i mezoteliom pleury a peritonea (Hopper, 2000). Díky multiorgánové specifitě, a protože se jedná o metodu, která je méně agresivní než chirurgický zákrok a radioterapie, má PDT časté uplatnění i u premalignit a malignit oblasti hlavy a krku. V případě časných



stadií nádorového onemocnění se úspěšnost terapie pohybuje mezi 70–80 % případů. V orofaciální oblasti jsou tímto způsobem léčeny např. karcinomy dutiny ústní, naso- a orofaryngu, hlasivek, laryngu, parotidy (Huang, 2005). Využití v oftalmologii a neurochirurgii již bylo zmíněno. Kompletní odpovědi dosahuje PDT u spinaliomů ve 20 %, bazaliomů ve 70–80 %, maligních melanomů v 50 %. U sekundárních kožních malignit – Kaposiho sarkomu, metastáz karcinomu prsu, endometria a kolorektálního karcinomu až kolem 80 % (Huang, 2005; Štukavec a spol., 2009). Dobré zkušenosti s PDT jsou i při terapii lokální recidivy karcinomu prsu (Klener a Abrahámová, 2002), i když použití PDT je zde nadále „off-label“ (Huang, 2005). Intersticiální PDT je možností u pokročilého karcinomu prostaty, jaterních lézí i sarkomů myoskeletálních (Zhang a spol., 2014). PDT se začíná využívat i u některých nemaligních onemocnění – s dobrým efektem u *acne vulgaris*, dále experimentálně např. k potlačení kardiovaskulárních aterosklerotických změn a u revmatoidní artritidy (Orringer a spol., 2010).

Další terapeutický směr, ve kterém je PDT využívána, souvisí s tzv. čištěním (purging) kostní dřeně. Jako fotosenzitizéry jsou nejčastěji používány Photofrin, benzoporfyrinové deriváty a merocyanin 540. Pomocí PDT jsou tak *ex vivo* odstraňovány leukemické buňky z odebraných autologních štěpů kostní dřeně. Výhodou této metody je, že fotosenzitizér se odstraňuje z kostní dřeně před reinfuzí – transplantací, takže k systémové fotosenzitizaci nedochází. Experimentálně byl tento postup použit i k potlačení metastazujícího karcinomu prsu (Čunderlíková a spol., 2010). Ve stadiu preklinických výzkumů je využití cytotoxického potenciálu PDT proti virům: herpes-, papiloma- a retroviry; proti kvasinkám a plísním (kandidózám) a proti bakteriím: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* i MRSA (Apolikhina a spol., 2011; Mikula a spol., 2014; Rajesh a spol., 2011; Rychtáriková a Kuncová, 2009). Reálně je prozatím PDT v praxi omezena jen na onkologii a pro některé velmi specifické onemocnění v jiných oborech medicíny. Předpokladem však zůstává možnost budoucího rozšíření této metody do dalších indikací. Nynějšími světovými jedničkami v používání a dalším výzkumu PDT jsou USA, Rusko, Bělorusko, Indie, Čína, Japonsko, Írán, Německo, Itálie, Švédsko, Bulharsko a Rumunsko.

### **Nové trendy ve vývoji PDT**

Budoucnost PDT záleží na vývoji nových fotosenzitizérů, vylepšování jejich targetingu, zdokonalování technologií světelných zdrojů a zkoušení kombinací PDT s jinými zavedenými onkoterapeutickými modalitami.

Standardně se v PDT podává co možná nejvyšší bezpečná dávka fotosenzitizéru tak, aby nedocházelo k systémové toxicitě nebo fotosenzitivitě. Při metronomické PDT se podává nižší dávka fotosenzitizéru než je obvyklé (někdy se podává kontinuálně) a následuje delší či frakcionované ozáření světelným zdrojem. Uvedený postup byl prokázán na potkaním modelu u terapie gliosarkomu za použití ALA, kdy podstatně nižší dávka a delší ozáření vedlo k jeho destrukci převážně cestou apoptotickou (Bisland a spol., 2004). Protože se jedná pouze o experiment s nutným několikahodinovým ozářením, není jisté, jestli uvedený postup bude fungovat i u jiných tumorů, s dalšími fotosenzitizéry a diskutabilním komfortem pro pacienta. Komfortnější cestou by jistě byla telemetrická PDT s do hlavy implantovanou optrodou, aktivovanou indukční smyčkou, která se experimentálně osvědčila na modelu intrakraniálního glioblastomu u potkanů (Van Zaane a spol., 2010).

Konceptem dvoufotonové PDT je aktivace fotosenzitizérů rychlým pulsem laseru s  $\lambda$  blížící se infračervenému (IR) záření. Délka světelného impulzu nesmí překročit 100 fs. Ztráty světelné energie jsou zde nižší, protože nedochází k pohlcování hemoglobinem a k výraznému rozptylu do okolních tkání. Termické poškození je minimální. V porovnání s klasickou PDT studie potvrzují hlubší penetraci světla do tkáně – byl prokázán efekt na tumory velikosti 1 cm v průměru a některé práce dokonce prezentují výsledky, kde došlo k nekróze až v hloubce 3 cm (Ogawa a Kobuke, 2008). Další metodou je kombinovaná PDT – PDT za použití 2 rozdílných laserových pulsů. První  $\lambda$  aktivuje fotosenzitizér do jednoduchého excitovaného stavu a druhá  $\lambda$  aktivuje fotosenzitizér do tripletového stadia, které cílové makromolekuly destruuje přímo. Výhodou tohoto postupu je relativní nezávislost od dostatečné intratumorózní hladiny kyslíku (Atif a spol., 2011). Je známo, že hypoxické buňky jsou méně citlivé jak na porfyriny, tak i na PDT. Nádorová tkáň obsahuje oblasti s různým stupněm hypoxie, což samo o sobě může být limitujícím faktorem PDT tumoru. Jednou z možností, kterými by bylo možné zvýšit účinnost PDT, je simultánně použít hyperbarickou oxygenoterapii (Al-Waili a spol., 2005; Jirsa a spol., 1991). Na podobném principu by mohlo fungovat i paralelní užití antioxidantů v pokusu – lapačů (scavengerů) ROS, kupř. melaninu, vitaminů A, C, E apod. Synergický účinek může mít i podání 2 rozličných fotosenzitizérů v jednom PDT cyklu (Acedo a spol., 2014). Užití zolendronátu a následné PDT u metastatického karcinomu prsu slibovalo *in vitro* dobrý synergický tumoricidní účinek, jenž se ale *in vivo* neprokázal. I tak je ale kombinace těchto terapií experimentálně doporučena (Akens a spol., 2014).

Tzv. majáková PDT (beacon PDT) je založena na aktivaci fotosenzitizéru až po dosažení cílového místa, která je dosažena vazbou fotosenzitizéru na různé enzymy, receptory, nebo RNA sondy. Beacon molekuly mají t. č. větší využití v diagnostice jako

fluorescenční sondy (Štefflová a spol., 2007). Fotosenzitizéry se mohou stát také vhodným doplňkem cílené genové terapie. Po prvotním navázání fotosenzitizéru na oligonukleotidy a posléze po vazbě na RNA (antisense terapie) nebo DNA (antigen terapie) vytvářejí s nativní nukleovou kyselinou špatně rozpojitelné duplexy (s RNA) nebo triplexy (s DNA) a brání expresi vybraných cílových genů (Boutorine a spol., 1996).

Za cílem zlepšení transdermální absorpce lokálně podané ALA si v dermatologii a estetické chirurgii při fotorejuvenaci (omlazování pleti) své místo hledá použití mikro Jehlových válečků (tzv. dermarollerů) s následnou PDT frakčním CO<sub>2</sub> laserem (Clementoni a spol., 2010).

### 3.5 SELEKCE ZVÍŘECÍHO MODELU A XENOTRANSPLANTACE

Selekce vhodného experimentálního zvířecího modelu v medicínském výzkumu je klíčová. V experimentální onkologii se používají modely jak *in vitro* (nádorové buňky a tkáně), tak *in vivo* (laboratorní zvířata). Nespornou výhodou experimentu na zvířeti je paradoxně právě jeho krátký život, který umožňuje rychlejší reakci biomodelů na pozorované podněty (Hughes a Lang, 1978). Ke zkoumání tumorů na laboratorních zvířatech lze použít tumory vzniklé spontánně, tumory arteficiální – vyvolané chemickou, biologickou nebo fyzikální onkogenezí a konečně zvířecí tumory transplantované. Nevýhodou všech uvedených možností je, že biologicky se nejedná o tumory lidské. Tento problém překlenula možnost kultivace buněk a tkání *in vitro*, která patří k nejstarším způsobům práce s lidskými tkáněmi v experimentu vůbec (Carrel, 1912). Podle stáří se buněčné kultury dělí na 3 skupiny: primární kultury, sekundární kultury – buněčné kmeny a buněčné linie. Primární kultury se skládají z buněk přímo odebraných z organismu, mají pouze krátkou životnost (několik dní) a dochází v nich k vyselektování buněk, které jsou lépe přizpůsobené kultivačním podmínkám. Buněčné kmeny vznikají na základě primárních kultur z buněk, které byly už alespoň jednou pasážovány. Jedná se o kulturu normálních diploidních buněk (oproti buněčným liniím), které do zániku vydrží v průměru 40–50 dělení. Buněčné linie mají prakticky neomezenou životnost a schopnost neomezeného buněčného dělení, vznikají z buněčných kmenů procesem transformace nebo mohou být izolovány přímo z živé tkáně (např. nádorové buňky s deregulovaným buněčným cyklem) (Green a spol., 1979). Následný přenos takto vykultivované lidské nádorové tkáně a hlavně její růst je podmíněn imunosupresí cílových experimentálních zvířat (Sharkey a Fogh, 1979).

Nejpoužívanějším pokusným zvířetem je bílá laboratorní myš (*Mus musculus var. alba*). Využití ve výzkumu biologie tumorů a výzkumu štetu tak našly i imunosuprimované

athymické nu/nu (bezsrsté, hairless – nude) myši, které byly poprvé popsány Flanaganem v roce 1962, který zjistil, že ztráta srsti je podmíněna přítomností autozomálně recesivního genu a objasnil, proč po poměrně krátké době myši hynuly na rozličné infekce – přítomná homozygotní mutace je u nich provázena agenezí brzlíku a tím i deficitem T-lymfocytů (Flanagan, 1966). Přirozená imunosuprese outbredních nu/nu myši umožňuje na myš aplikovat lidskou tkáň, aniž by došlo k jejímu rozpoznání a odhojení (Pantelouris, 1968). Experiment ovlivňuje jednak nepřítomnost normální imunitní reakce, která by pomáhala rejekci a destrukci tumoru, a možnost odlišného metabolismu protinádorových léčiv u myši (Belizário, 2009). První úspěšnou heterotransplantaci lidského tumoru (konkrétně kolorektálního karcinomu) na athymickou myš provedli v roce 1969 Rygaard s Povlsenem (Rygaard a Povlsen, 1969). Další úspěšné xenotransplantace různých lidských tumorů následovaly. Zajímavostí je, že solidní tumory (karcinom prsu, sarkomy) se transplantují snadno a mohou být dále pasážovány, naopak jiné jsou transplantovány obtížně (hematologické malignity, malignity s hormonální produkcí) (Fogh a spol., 1980). Zde je nutno pouze zmínit, že xenotransplantace opačným směrem, tj. ze zvířete na člověka, znamenají i přes jisté morální a náboženské zábrany do budoucna šanci pro pacienty, kteří už nejsou „perspektivními“ pro transplantaci konvenční (Stadlbauer a spol., 2011).

Vzhledem k faktu, že nu/nu myši jsou vnímavější k virovým i bakteriálním infekcím, péče o ně vyžaduje speciální izolátorový režim systému chovu. Prostředí, ve kterém jsou ustájeny, proto musí být sterilní, stejně tak krmivo a voda a mít vyšší chovnou teplotu (okolo 28 °C). Za optimální stáří jedinců se považuje 6–8 týdnů. Mimo uvedený interval se snižuje pravděpodobnost přihojení tumoru, která je zapříčiněna změnou aktivity NK-buněk. Inokulace nádorových buněk se provádí na bok myši s. c. injekcí (Giovanella a spol., 1978). Chirurgické vzorky buněčných linií se aplikují ve formě suspenze nádorových buněk s ve farmakologii komerčně běžně dostupnou gelatinozní směsí matricových proteinů – Matrigelem (BD Biosciences). Základem Matrigelu jsou komplexní proteinové produkty (převážně kolagen a laminin) myšního Engelbreth-Holm-Swarmova sarkomu. Svoji skladbou se matrice podobá tenkým strukturám bazálních membrán imitujících přirozené extracelulární prostředí. Nanesení buněk na vrstvu Matrigelu dává vznik 3D tkáně, která je zcela podobná tkáním *in vivo*. Formace buněk je závislá od přítomnosti růstových faktorů (FGF, TGF- $\beta$ , EGF) v Matrigelu – ty se podílí na vlastní diferenciaci a další proliferaci buněk (Benton a spol., 2011).

Komplexní interpretaci preklinického výzkumu lidských xenotransplantovaných tumorů u myši ztěžuje velká heterogenita zkoumaných malignit na genetické i buněčné

úrovni, dále poněkud odlišná fyziologie myši a člověka a v neposledné řadě i rozdílná anestetická technika (De Jong a Maina, 2010). Nicméně, model athymických myši s xenotransplantovanými lidskými tumory je v preklinické fázi experimentu s PDT nepostradatelný a vždy musí dalším klinickým zkouškám na pacientech předcházet. I tak je nutno mít na paměti, že užití zvířecích modelů v experimentu by pokaždé mělo být odpovědné a rozumné, tj. řídit se tzv. koncepcí tří „R“:

1. replacement – náhrada zvířat v experimentech technikami *in vitro* apod.,
2. reduction – snížení počtu zvířat zařazovaných do experimentu výběrem vhodné metody a uspořádání experimentu,
3. refinement – zjemnění až úplné vyloučení bolestivých a stresujících přístupů a experimentálních postupů (Weber, 2006).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 HYPOTÉZY A ZÁKLADNÍ CÍLE EXPERIMENTU

#### Hypotézy

Práce je zaměřena na možnosti fotodynamické terapie dvou nejčastějších hormonálně dependentních malignit vůbec – karcinomu prsu a karcinomu prostaty. Nedávné pokroky v patofyziologii těchto karcinomů prokázaly jejich pozoruhodnou biologickou (imunofenotypovou) podobnost (Risbridger a spol., 2010). Karcinom prsu představuje globálně nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění bez rozdílu pohlaví. Mortalita na karcinom prostaty má dlouhodobě stagnační charakter a na tuto malignitu umírá každý pátý onkologický pacient. Nepříznivost situace nutně vede k analýzám indikací doposud používaných terapeutických modalit a testování modalit nových. PDT se v rámci onkologie stala úspěšnou klinickou metodou v terapii tumorů kůže, dutiny ústní, jícnu, bronchů, plic a močového měchýře a plic. V terapii karcinomu prsu a ani prostaty zatím k jejímu klinickému využití nedošlo. Přitom obě malignity jsou anatomicky docela dobře přístupné – celková nebo ještě lépe lokotopická aplikace fotosenzitizeru s následnou přímou iradiací vhodným světelným zdrojem u karcinomu prsu a iradiací endoskopickou u karcinomu prostaty by v dnešní době byly technicky poměrně snadné, a tudíž v praxi široce využitelné. Role PDT by ze začátku byla v paliativní terapii a pokud by se efekt dostatečně prokázal, pak by se jistě dala využít i k terapii časných stadií těchto karcinomů. PDT by se mohla používat samostatně nebo v kombinaci s jinými ověřenými postupy. Experimentální *in vivo* model do podkoží nu/nu myši xenotransplantovaných lidských tumorů představuje v klinickém pojetí pozdní stadium s kožními metastázami zmíněných typů karcinomů nebo naopak stadium časně. Formulace vědeckého předpokladu experimentu je následná:

Nulová hypotéza  $H_0$ : **Terapeutická účinnost PDT jako monoterapie xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu a karcinomu prostaty u nu/nu myší je < 50 %.**

Alternativní hypotéza  $H_1$ : **Terapeutická účinnost PDT jako monoterapie xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu a karcinomu prostaty na modelu nu/nu myší je  $\geq$  50 %.**

#### Základní cíle experimentu

I když účinek PDT na karcinomy je prokázán v mnoha studiích, konkrétní účinnost vždy závisí na typu použitého fotosenzitizeru. Různé preparáty dosahují rozdílných výsledků

PDT u jednotlivých tumorů. V experimentu bude zkoumaným fotosenzitizérem ftalocyanin hydroxyhlinitý. Ftalocyanin hydroxyhlinitý (AlOH-Pc) je zástupcem II. generace fotosenzitizérů, patří mezi moderní cyaninová barviva. Zvýšená účinnost zkoumaného preparátu tkví jednak v chelataci atomem hliníku na základní cyklickou strukturu ftalocyaninu, a jednak v jeho speciální lékové formě – nově vyvinutém a připraveném lipozomálním gelu určeném k lokotopické aplikaci.

Experiment se xenotransplantovaným karcinomem prsu zhodnocuje účinnost aplikačních cest a forem jednotlivých fotosenzitizérů. Do kontrastu k testovanému lokálně podanému gelu AlOH-Pc staví lokálně aplikovaný hydrochlorid metylaminolevulát (Metvix) a dále parenterálně aplikovaný disulfonovaný ftalocyanin hydroxyhlinitý (Al(OH)S<sub>2</sub>-Pc) a porfimer sodný (Photofrin). Pokusné skupiny tedy budou tvořit PDT s novými fotosenzitizéry II. generace (ftalocyanin hydroxyhlinitý a jeho disulfonovaná forma k systémovému použití) versus PDT s komerčně používanými staršími fotosenzitizéry (Metvix, Photofrin), které jsou již schválené k použití v terapii různých malignit jak v Evropě, tak v ostatních zemích světa. Kontrolní skupiny budou tvořit zvířata s lokálně naneseným AlOH-Pc/Metvixem bez světelné iradiace a zvířata s xenoštěpem zcela bez PDT. Předpokladem je sice dostatečná účinnost u všech preparátů už po jedné aplikaci, ale snahou je ověřit právě vyšší účinnost ftalocyaninových preparátů v porovnání s ostatními preparáty. Vyšší terapeutická efektivita by měla být dána jejich vysokou afinitou k epitelovým buňkám karcinomů, která bude ještě potencována pasivním targetingem v případě lipozomální gelové formy. Dalšími otázkami budou stanovení nejúčinnější koncentrace nového gelového preparátu AlOH-Pc a časový interval potřebný k jeho dostatečné akumulaci v tumoru. Starší preparáty, mezi které patří Metvix i Photofrin, potřebují k dosažení dostatečné intratumorózní hladiny hodiny, někdy i dny. Ftalocyanin se naopak vyznačuje intervalem velmi krátkým, který by k dosažení jeho terapeutické hladiny neměl přesáhnout 10 min. Zkrácený interval mezi aplikací a ozáření by v klinické praxi pro pacienty znamenal jasný benefit a umožňoval by PDT sériově opakovat. Aby byla dodržena stejná penetrace světla do tkáně, všechny myši pokusných skupin budeme ozařovat stejným světelným zdrojem – xenonovou lampou s filtrem, i když optimální  $\lambda$  pro ftalocyanin je delší než pro Photofrin i Metvix. Delší  $\lambda$  ale znamená hlubší průnik do tkáně, a tím by vznikly rozdílné podmínky pro všechny čtyři fotosenzitizéry.

Experiment s xenotransplantovaným karcinomem prostaty je zaměřen na porovnání účinnosti PDT s lokotopicky podaným AlOH-Pc v (předešlém experimentu osvědčené) formě lipozomálního gelu u dvou buněčných typů tohoto karcinomu. Cílem bude ověření, že PDT je účinnou metodou i u karcinomu prostaty. Ftalocyaninový gel se bude v pokusných skupinách aplikovat na myši v různých koncentracích. Předpokladem je, že u agresivnější formy, tj.

formy karcinomu s větším metastatickým potenciálem, bude k úspěšné PDT potřeba vyšší koncentrace léčiva.

Vzhledem k riziku obnoveného růstu tumoru budou myši po aplikaci fotosenzitizéru a následně vlastní PDT dále sledovány. K novému růstu tumoru obvykle dochází při nedostatečné hladině fotosenzitizéru v tumoru nebo při nízkém tkáňovém okysličení. Podmínkou reálné využitelnosti nového preparátu je jeho bezpečnost, tj. prakticky nulová fotosenzitivita. K objektivizaci všech výsledků – účinnosti PDT i vyvrácení možné fototoxicity – poslouží po ukončení pokusů nekroptické histologické vyšetření experimentálních zvířat. Kromě vyšetření samotných jizev po úspěšné PDT nebo tumorů v případě kontrol či neúspěchu budou vyšetřeny plíce, ledviny, srdce, játra, střevo, mozek a svalovina k vyloučení subakutní toxicity a kancerogenity gelového ftalocyaninu.

Kromě testování dvou centrálních hypotéz tak z práce vyplynuly další základní otázky a vedlejší problémy, na které bylo nezbytné se zaměřit:

- 1. Bude nově vyvinutý lipozomální gelový preparát s hydrofobním AIOH-Pc účinný u PDT karcinomu prsu? V jakých koncentracích?**
- 2. Bude nově vyvinutý lipozomální gelový preparát s hydrofobním AIOH-Pc účinný i u PDT karcinomu prostaty? V jakých koncentracích?**
- 3. Bude AIOH-Pc dostatečně účinný již po jedné aplikaci?**
- 4. Jak se bude lišit efekt PDT od aplikační cesty fotosenzitizéru? Bude efekt podání lokotopického srovnatelný s podáním systémovým?**
- 5. Budou ftalocyaniny v porovnání s komerčními Metvixem a Photofrinem účinnější?**
- 6. Bude 10minutový interval k dosažení účinné hladiny AIOH-Pc v tumoru dostatečný?**
- 7. Nebude AIOH-Pc vykazovat známky fotosenzitivity?**
- 8. Nebudou známky poškození zdravých tkání AIOH-Pc?**
- 9. Nedojde k regresi nebo úplné remisi tumorů v kontrolních skupinách?**
- 10. Mohla by PDT být použita v terapii karcinomu prsu či prostaty u lidí?**

Předpokládaným výstupem v případě úspěšnosti celého experimentu je potvrzení účinnosti PDT karcinomu prsu i prostaty. V porovnání s ostatními preparáty pak dokázání nejvyšší účinnosti terapie karcinomu prsu lokotopicky podaným ftalocyaninem v lipozomální gelové formě a vypracování optimálního aplikačního modelu nového léčivého preparátu pro karcinom prsu i pro dva odlišné typy karcinomu prostaty. To vše v kratším intervalu mezi



aplikací nového fotosenzitizéru a světelným ozářením v porovnání s jinými preparáty a se žádnou fotosenzitivitou. PDT by tak mohla představovat cílenou onkoterapii s minimálními nežádoucími účinky na ostatní tkáně organismu. Model xenotransplantovaných tumorů vcelku věrně imituje kožní metastázy příslušných malignit. Pokud bude experiment úspěšný, bude takto vedená PDT pro pacienty v pokročilém stadiu karcinomu prsu i prostaty znamenat možnost efektivní paliativní terapie, a tím zlepšení jejich QoL a prodloužení intervalu přežití.

## **4.2 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.2.1 Zvířecí model**

Za vhodný experimentální model byly zvoleny bezsrsté (nude) athymické nu/nu myši (Crl:NU-Foxn1<sup>nu</sup>). Nu/nu myši přijímají ve většině případů xenoštěpy lidské nádorové tkáně, protože jsou imunodeficitní – nemají funkční T-lymfocyty. Tento neizogenní kmen – outbrední linie laboratorních myší má v experimentu výhodu v jejich levnější a snazší produkci a v obecněji platných nálezech. K pokusům byly použity samice kmene CD1 (homozygotní kmen č. 088) s tělesnou hmotností 18–22 g, což odpovídalo 6–8 týdnů věku. Nu/nu myši byly původně vyšlechtěny v Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA, USA). Zvířata byla chována izolátorovým systémem ve sterilním laminárním flow boxu pro malá laboratorní zvířata, typ: KAT-F-SZ/1-1000 při konstantní chovné teplotě 28 °C. Myši byly podestýlány radiačně sterilizovanou jedlovo-smrkovou podestýlkou SAWI – Research Bedding typ HW 300/500 výrobce JELU-WERK, Josef Ehrler, GmbH (Rosenberg, Německo), krmeny radiačně sterilizovanou dietou pro nu/nu myši – ssniff od výrobce ssniff Spezialdiäten, GmbH (Soest, Německo) a napájeny byly autoklávovanou vodou *ad libitum*. Kompletním dodavatelem myší, podestýlky i krmných směsí pro náš pokus byla česká firma AnLab, s.r.o. (Praha, ČR).

### **Etika**

Vzhledem k práci s experimentálními zvířaty byly po celý pokus plně dodržovány tyto právní předpisy: Zákon č. 149/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, Zákon č. 207/2004 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat, Zákon č. 166/1999 o veterinární péči, Vyhláška č. 286/1999 Sb., kterou se provádějí ustanovení Zákona č. 166/1999 Sb., Zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty, Vyhláška č. 209/2004 Sb. o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

#### 4.2.2 Tkáňové linie – xenotransplantáty lidských tumorů

Ke xenotransplantaci lidských tumorů na nu/nu myši byly použity 3 tkáňové linie kavkazské rasy – 1 linie karcinomu prsu a 2 odlišné linie karcinomu prostaty. Všechny byly zakoupeny z European Collection of Cell Cultures, patřící pod státní Public Health England (Salisbury, Velká Británie) prostřednictvím firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. (pobočka v Praze, ČR). Buněčné kultury byly opakovaně pasážovány a rozděleny subkonfluencí na 70–80 %.

Tkáňová linie MDA-MB-231 (M. D. Anderson Metastatic Breast 231) představovala v experimentu lidský adenokarcinom prsu. Původně byla získaná z maligního pleurálního výpotku 51leté ženy s metastatickým invazivním duktálním karcinomem prsu (Cailleau a spol., 1974). MDA-MB-231 nádorové buňky nemají exprimované ER, PR a ani HER-2/neu receptory – jsou triple negativní.

Lidský adenokarcinom prostaty zastupovaly tkáňové linie LNCaP (Lymph Node Cancer of the Prostate) – klon FGC (Fast Growing Colony) a PC-3 (Prostate Carcinoma 3). Rozdíl mezi tkáňovými liniemi karcinomu prostaty je v agresivitě biologického chování. Linie LNCaP má metastatický potenciál velmi malý a je citlivá k androgenům; linie PC-3 má zas naopak metastatický potenciál velký, k androgenům je necitlivá – vykazuje nízkou produkci 5 $\alpha$ -reduktázy a má nízkou frakci prostatické kyselé fosfatázy. Tkáňová linie LNCaP byla originálně vykultivována z metastázy v levé nadklíčkové uzlině u 50letého muže s potvrzeným karcinomem prostaty (Horoszewicz a spol., 1980). Linie PC-3 byla původně pořízena z grade 4 adenokarcinomu prostaty u muže stáří 62 let (Kaighn a spol., 1979).

**Obrázek 13.** Nu/nu myš s narostlým xenoštěpem karcinomu prsu na počátku experimentu



Buňky všech linií se před použitím kultivovaly v médiu s bikarbonátovým pufrovacím systémem – RPMI-1640 doplněném o 10% fetální bovinní sérum, 2% penicilin/streptomycin, 1,25% L-glutamin a 1% pyruvát sodný. Po namnožení a dosažení počtu 10<sup>6</sup> nádorových

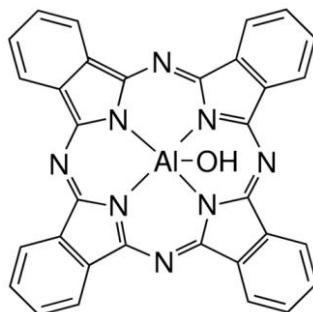
buněk, tj. cca 1 mg tkáňové kultury, byly společně s Matrigelem (BD Matrigel Basement Membrane Matrix – vyroben firmou BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA a v ČR distribuován společností I. T. A. – Intertact, s.r.o., Praha) subkutánně implantovány na pravý bok athymické myši. Objem tumoru byl pravidelně měřen a vlastní experiment s PDT začal poté, co došlo k nárůstu tumoru do velikosti 6 mm v průměru, tj. do objemu cca 0,2–0,4 cm<sup>3</sup> a plochy cca 2 cm<sup>2</sup>, jak je zdokumentováno na předešlém **Obrázku 13**.

#### 4.2.3 Experimentální fotosenzitizéry

Ve studii účinku PDT na karcinom prsu byl ke srovnání s novým AlOH-Pc v lipozomální gelové formě k lokotopické aplikaci použit komerčně běžně dostupný krém 16% hydrochloridu metylaminolevulátu – Metvix (Galderma S.A., Lausanne, Švýcarsko). Absorpční maximum Metvixu je 630 nm. K systémové aplikaci se podával Al(OH)S<sub>2</sub>-Pc, který byl syntetizován ve Výzkumném ústavu organických syntéz, a.s. v Rybitví u Pardubic. Podával se ve formě roztoku s KCl s osmolalitou 0,9 %, maximum absorpce prokazuje kolem 675 nm. Dalším preparátem k parenterálnímu podání byl porfimer sodný pod firemním názvem Photofrin (zakoupen od Axcan Pharma, Inc., Mont-Saint-Hilaire, Kanada) s absorpčním vrcholem 632 nm a koncentrací 2,5 mg/ml. Ve studii s karcinomem prostaty byl použit jenom lipozomální gel AlOH-Pc určen k lokotopické aplikaci.

Nově vyrobený a testovaný lipozomální gel s účinnou látkou 85% ftalocyaninu hydroxyhlinitého (**Obrázek 14**) byl v experimentu aplikován v různých koncentracích – u karcinomu prsu ve 2, 3 a 4 mg/ml; u karcinomu prostaty linie LNCaP ve 4,5, 9 a 18 mg/ml a linie PC-3 ve 2, 4 a 6 mg/ml.

**Obrázek 14.** Ftalocyanin hydroxyhlinitý



Maximum absorbované  $\lambda$  je spektrum 672 nm. AlOH-Pc byl vyroben firmou Synthesia, a.s. (Pardubice, ČR) pod záštitou Výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. (Rybitví, ČR).

Vlastní výroba gelu s lipozomy zřuzovanými s hydrofobními mikročásticemi AIOH-Pc je patentována (Ježek a spol., 2008). Lipozomální gelový preparát se připravuje procesem fluidizace sterilního izotonického roztoku lecitinu v koncentraci 1–40 mg/ml za použití poloprůmyslového mikrofluidizéru (procesor M-110L firmy Microfluidics, Inc., Newton, MA, USA – **Obrázek 15**) při teplotě  $> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tlaku 500–2000 bar. Výsledným produktem jsou mikročástice do průměru 1  $\mu\text{m}$ . Za stálého míchání se potom přidává lyofilizovaný prášek AIOH-Pc v poměru 5:1–0,1:1 ve vztahu k lecitinu. Vzniklá suspenze se opět fluidizuje v menší komoře mikrofluidizéru při teplotě  $> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tlaku 1000–2000 bar. Konečná velikost mikrovezikul se pohybuje od 180 až do 480 nm, průměrná velikost je 200–300 nm. Takto získaná suspenze se směšuje s gelovým základem – čirým lékárenským gelem v objemovém poměru 1:1 ml. Použitý průsvitný gel (Gel 2, Pharmgest, s.r.o., Příbram, ČR) byl připraven jako magistraliter na základě 4% karboxymethylcelulózy.

**Obrázek 15.** Poloprůmyslový mikrofluidizér M-110L



#### 4.2.4 Světelný zdroj použitý v experimentu

Jako zdroj silného světla o velkém světelném toku byla v experimentu použita xenonová lampa onkolight 051 (ONL 051) s převodním filtrem od výrobce Preciosa Crytur, s.r.o. (Turnov, ČR), která pracuje v tzv. daleko-červeném spektru 600–700 nm s maximem kolem 635 nm a intenzitou záření  $200\text{ mW/cm}^2$ . Předností xenonové výbojky je dlouhá životnost (několik tisíc provozních hodin). Její využití je v praxi omezeno vysokým vnitřním přetlakem za provozu, až s možností exploze, proto je pro ochranu okolí kryta dostatečně pevnou lampovou skříní. Xe lampa je vyfocena na **Obrázku 16**.

**Obrázek 16.** Xenonová lampa onkolight 051 použitá v experimentu



#### 4.2.5 Experimentální skupiny – uspořádání pokusu

V případě xenotransplantovaného karcinomu prsu linie MDA-MB-231 byly myši s již narostlým tumorem náhodně rozděleny do 9 skupin po 10 jedincích ( $n = 10$ ). První tři intervenční skupiny byly léčeny lokotopicky podaným lipozomálním gelem AIOH-Pc – každá jinou koncentrací: 2 mg/ml, 3 mg/ml a 4 mg/ml. Další skupina podstoupila plnou PDT s lokotopicky podaným Metvixem, s parenterálně aplikovaným Al(OH)S<sub>2</sub>-Pc a stejně podaným Photofrinem. Koncentrace obou fotosenzitizérů pro *i. v.* aplikaci byly identické – 2,5 mg/ml. Zbylé skupiny byly kontrolní. Dvě skupiny obdržely jen lokálně podaný fotosenzitizér – buď AIOH-Pc v koncentraci 4 mg/ml, nebo Metvix, ale ozářeny světelným zdrojem nebyly. Poslední kontrolní skupina byla tzv. čistá kontrola – „slepý vzorek“ myši, jenž nedostal žádný fotosenzitizér a nebyl ani ozářen.

Experimentální skupina myši se xenotransplantovaným karcinomem prostaty byla vždy tvořena 8 jedinci ( $n = 8$ ). Celkem byly myši náhodně rozděleny do 12 identických skupin – polovina skupin měla implantovanou linii LNCaP a polovina linii PC-3. Pokusných skupin bylo celkem 6 (3 skupiny pro každou linii zvlášť). Na těchto skupinách byl *in vivo* testován účinek lokotopicky aplikovaného AIOH-Pc lipozomálního gelu v rozdílných koncentracích: 4,5 mg/ml, 9 mg/ml, 18 mg/ml u myši s LNCaP a 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml s PC-3. Kontrolních skupin bylo celkem 6 – 3 pro každou linii karcinomu prostaty. Zvířata prvních kontrolních skupin byly zcela prosté terapie (bez aplikovaného fotosenzitizéru i bez světelného ozáření), druhé kontrolní skupiny byly jenom ozářené světelným zdrojem (bez AIOH-Pc) a konečně třetí kontrolní skupiny, kde aplikace AIOH-Pc gelu v nejvyšší koncentraci pro danou linii (18, resp. 6 mg/ml) proběhla, ale myši ozářeny světlem nebyly. Celkový soubor použitý v našem experimentu tedy tvořilo 186 nu/nu myši ( $n = 186$ ). Pro lepší přehlednost uspořádání experimentu jsou všechny skupiny zvířat shrnuty v **Tabulce 14**.

**Tabulka 14. Experimentální skupiny – uspořádání pokusu**

Skupina	Typ	n	Linie tumoru	Fotosenzitizér	Koncentrace	Aplikace	Drug-light interval	Foto-protektce	Xe iradiace
A (2)	pokusná	10	MDA-MB-231	AIOH-Pc	2 mg/ml	loc.	10 min	–	+
A (3)	pokusná	10	MDA-MB-231	AIOH-Pc	3 mg/ml	loc.	10 min	–	+
A	pokusná	10	MDA-MB-231	AIOH-Pc	4 mg/ml	loc.	10 min	–	+
B	pokusná	10	MDA-MB-231	Metvix	0,16 mg/mg	loc.	180 min	+	+
C	pokusná	10	MDA-MB-231	Al(OH)S2-Pc	2,5 mg/ml	i. v.	10 min	–	+
D	pokusná	10	MDA-MB-231	Photofrin	2,5 mg/ml	i. v.	2880 min	+	+
E	kontrolní	10	MDA-MB-231	AIOH-Pc	4 mg/ml	loc.	-	–	–
F	kontrolní	10	MDA-MB-231	Metvix	0,16 mg/mg	loc.	-	–	–
G	kontrolní	10	MDA-MB-231	-	-	-	-	–	–
H	pokusná	8	LNCaP	AIOH-Pc	4,5 mg/ml	loc.	10 min	–	+
I	pokusná	8	LNCaP	AIOH-Pc	9 mg/ml	loc.	10 min	–	+
J	pokusná	8	LNCaP	AIOH-Pc	18 mg/ml	loc.	10 min	–	+
K	kontrolní	8	LNCaP	-	-	-	-	–	–
L	kontrolní	8	LNCaP	-	-	-	-	–	+
M	kontrolní	8	LNCaP	AIOH-Pc	18 mg/ml	loc.	-	–	–
N	pokusná	8	PC-3	AIOH-Pc	2 mg/ml	loc.	10 min	–	+
O	pokusná	8	PC-3	AIOH-Pc	4 mg/ml	loc.	10 min	–	+
P	pokusná	8	PC-3	AIOH-Pc	6 mg/ml	loc.	10 min	–	+
R	kontrolní	8	PC-3	-	-	-	-	–	–
S	kontrolní	8	PC-3	-	-	-	-	–	+
T	kontrolní	8	PC-3	AIOH-Pc	6 mg/ml	loc.	-	–	–

#### 4.2.6 PDT v experimentu

Po dosažení stanovené velikosti xenotransplantovaného tumoru, tj. cca 6 mm v průměru a objemu cca 0,2–0,4 cm<sup>3</sup>, a rozdělení myši do výše uvedených skupin začal experiment se samotnou PDT. K vyloučení vystresování a pohybu zvířat při cílené aplikaci PDT byly na začátku experimentu všechny myši uvedeny do ataralgie (neuroleptanalgie). Narkotizační protokol sestával z disociativního anestetika ketaminu a sedativa xylazinu, který snižuje vedlejší ketaminové projevy a docílí myorelaxaci. Myšim se tak současně intraperitoneálně aplikoval ketamin v doporučeném dávkování 100 mg/kg a xylazin v dávkování 16 mg/kg v celkové objemové koncentraci 5 ml/kg.

### PDT karcinomu prsu

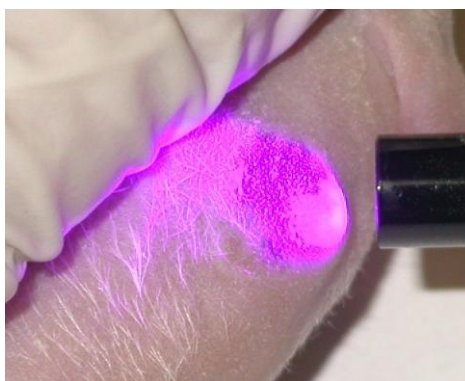
Ke stanovení nejvhodnější terapeutické koncentrace lipozomálního gelu AIOH-Pc pro karcinom prsu se testovaly gely o různé koncentraci: 2, 3 a 4 mg/ml. Každý gel byl lokálně aplikován zevně na tumor v dávce 0,2 ml/tumor a doba jeho působení pod částečně okluzivním obvazem byla 10 min (**Obrázek 17**).

**Obrázek 17.** Působení ftalocyaninového gelu – okluzivní obvaz



Hydroxidy ftalocyaninu hlinitého dosahují vysokých penetračních koncentrací v tumoru již po minutách. Z dřívějších pokusů s distribucí ftalocyaninu v tumoru a dalších orgánech v různých časových intervalech po aplikaci je známo, že 10 min je jediný dostatečně účinný časový interval (tzv. drug-light interval) k dosažení optimální terapeutické hladiny fotosenzitizéru intratumorálně. Časový limit 30 min je účinný jen částečně, zatímco 60 min, 4 h a 24 h jsou zcela neúčinné (Nekvasil a spol., 2007). **Obrázek 18** s průkazem UV fluorescence lokotopicky podaného AIOH-Pc po stanovené době působení makroskopicky dokumentuje efektivitu targetingu tohoto fotosenzitizéru.

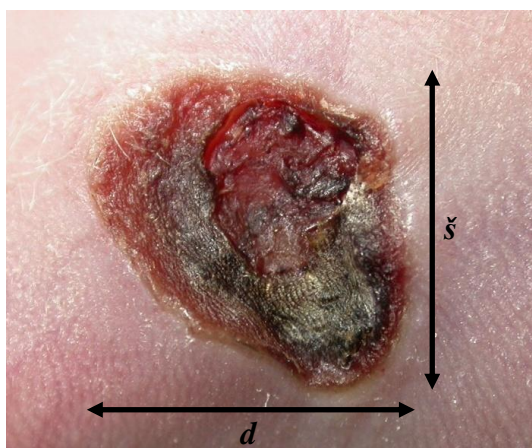
**Obrázek 18.** Fluorescence tumoru v UV světle



Konečně byl tumor ze vzdálenosti 1 cm ozářen xenonovou lampou se zářivým tokem 0,97 W a celkovou energií záření 100 J/cm<sup>2</sup>. Kolem tumoru byl ozářen i cca 5mm lem zdravé

tkáně, zbylá část těla zvířete ozářena nebyla. Délka iradiace trvala přesně 8 min. Rozptyl pracovních vlnových délek xenonové lampy se pohyboval v rozmezí 600–700 nm (maximum kolem 635 nm). Každý v experimentu použitý fotosenzitizér má sice mírně odlišnou optimální  $\lambda$ , ale použití světla o rozdílné a pro daný fotosenzitizér specifické  $\lambda$  by vedlo k různé penetraci světla do tkáně, tedy by stejné podmínky pro všechny látky dodrženy nebyly. Efektivita 4 mg/ml AlOH-Pc gelu se srovnávala s krémem Metvix. 1 g Metvixu obsahuje 160 mg metylaminolevulátu ve formě hydrochloridu. Krém byl aplikován dle instrukcí výrobce v příbalovém letáku – 0,4 mg bylo nanášeno lokálně na tumor ve vrstvě tlusté cca 1 mm. Ozáření světelným zdrojem probíhalo za stejných podmínek, ale až po 3 h od aplikace. Léčným skupinám se systémovou aplikací se fotosenzitizéry podávaly ve formě izotonických 0,9% roztoků bolusově i. v. do laterální ocasní žíly. Al(OH)S2-Pc byl podán v dávkovacím schématu 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti ( $\pm 500 \mu\text{g}/\text{myš}$ ), doba působení před ozářením činila opět 10 min. Dávka Photofrinu byla 2 mg/kg tělesné hmotnosti ( $\pm 500 \mu\text{g}/\text{myš}$ ) a jeho doba působení až 48 h. Způsob světelné iradiace byl identický. Skupiny myši léčené Photofrinem i Metvixem byly v době působení fotosenzitizérů (48 h nebo 3 h) chráněny před přímým slunečním světlem kvůli riziku fotosenzitivity. Skupiny s ftalocyaninovými preparáty byly přímému slunečnímu světlu volně vystaveny a známky fotosenzitivity zaznamenány nebyly. Všechny skupiny byly pravidelně sledovány. Po dobu následujících 30 dnů se zaznamenávala plocha nekrotického tumoru a dopočítával se objem tumoru. Parametry ( $d$  – délka,  $\check{s}$  – šířka) viditelné plochy nekrózy ( $S$ ) byly měřeny posuvným měřítkem (mikrometrem) v třídním intervalu – zobrazeno na **Obrázku 19**. Plocha nekrózy se vypočítávala podle vzorce:  $S = d \times \check{s}$ . Objem tumoru ( $V$ ) se pak stanovoval podle formule:  $V = (d \times \check{s}^2) / 2$ .

**Obrázek 19.** Měření plochy nekrotického tumoru



$d$	délka tumoru
$\check{s}$	šířka tumoru



Kontrolní skupiny nu/nu myši v pokusu PDT karcinomu prsu byly tři. Dvě skupiny obdržely pouze lokálně podaný fotosenzitizér – lipozomální gel AIOH-Pc v účinné koncentraci 4 mg/ml nebo Metvix bez iradiace světlem. Tyto kontroly sloužily k potvrzení předpokladu, že jen samotné podání fotosenzitizéru nemá žádný terapeutický vliv a to i bez ohledu na druh jeho účinné látky. Třetí kontrolní skupina představovala čistou kontrolu – myši se xenoštěpy tumoru nebyly nijak terapeuticky intervenovány, hodnotil se růst karcinomu na živém zvířecím modelu. Poslední, 30. den pokusu byla všechny experimentální zvířata usmrceny metodou cervikální dislokace a kromě jedinců určených k nekroptickému vyšetření zlikvidovány asanační službou.

### **PDT karcinomu prostaty**

Stejná metodika se použila i v PDT obou buněčných podtypů karcinomu prostaty. K určení optimální terapeutické koncentrace lipozomálního gelu AIOH-Pc pro karcinom prostaty a porovnání účinnosti na jeho jednotlivé tkáňové linie se zkoumaly gely o různé koncentraci: 4,5, 9 a 18 mg/ml u linie LNCaP a 2, 4, 6 mg/ml u linie PC-3. Dávkování aplikovaných lipozomálních gelů s ftalocyaninem na povrch každého tumoru se nelišilo – použito bylo 0,2 ml. Cílené 8minutové světelné ozáření probíhalo za stejných podmínek, opět až po 10minutovém lokálním působení léčivého preparátu. Zvířata nebyla chráněná před sluncem či denním světlem a žádné fotosenzitivní reakce zaznamenány nebyly. Harmonogram výstupných měření (*d* a *š* nekrotických tumorů), postupy při výpočtech (*S*, *V*), délka trvání experimentu (30 dní) i konečný osud nu/nu myši se shodovali s předchozím experimentem.

Charakteristika kontrolních skupin byla v pokusu PDT karcinomu prostaty mírně odlišná. Podobně jak u karcinomu prsu, dvě kontrolní skupiny byly opět kontroly čisté – myši s volně rostoucím karcinomem prostaty linie LNCaP/PC-3, neovlivněné PDT. Dvě další skupiny dostaly bez světelného terapeutického působení jen lokálně aplikovaný lipozomální gel AIOH-Pc v koncentraci 18 mg/ml u LNCaP a 6 mg/ml PC-3. Zbylé 2 kontroly se xenoštěpy linie LNCaP i PC-3 podstoupily jen ozáření Xe lampou, ale nedostaly žádný fotosenzitizér. Zde by se dal předpokládat alespoň fototermický účinek, jenž by mohl vést ke zpomalení růstu, příp. k částečné regresi tumoru. Proti laserům používaným běžně v onkoterapeutické praxi byl výkon v experimentu použitého světelného zdroje ale podstatně nižší.

#### 4.2.7 *Histologické zpracování*

Po usmrcení myši na konci experimentu byla oblast tumoru u všech myši odebrána ostrou kompletní excizí. Nekropsie jizevnaté tkáně u myši s úspěšnou PDT a oblasti tumoru u myši s neúspěšnou PDT a kontrolních posloužila k objektivizaci efektivity terapie. Již makroskopicky šlo obvykle dobře rozeznat reziduální nebo novotvořenou nádorovou tkáň. Jizva po úspěšné PDT byla palpačně jemná, bez hmatné rezistence. Vzorky tkání se po označení chemicky fixovaly v 10% roztoku neutrálního formolu (4% roztoku formaldehydu). Tkáně byly k mikroskopickému vyšetření zpracovány v celém rozsahu metodou parafinových bločků v těchto krocích: odvodnění v alkoholech vzestupné řady, projasnění xylenem, prosycení a posléze zalití do parafínu. Následovalo nablokování, prokrájení bločků mikrotomem na 7  $\mu\text{m}$  řezy a natahování preparátů. Nekróza tumoru v oblasti jizvy, tj. remise po úspěšné PDT byla histologicky potvrzena vymizením nádorových buněk. Použito bylo barvení hematoxylin-eosinem v Gillově modifikaci.

**Obrázek 20.** *Nekropsie myši s odběrem vzorků na histologické vyšetření*



V případě použití lipozomálního gelu AIOH-Pc byly z každé pokusné skupiny i ze skupin kontrolních z jedné myši odebrány orgánové vzorky (viz předchozí **Obrázek 20**). Histopatologické vyšetření jater, ledvin, srdce, tenkého střeva, plic a kosterní (příčně pruhované) svaloviny sloužilo k vyloučení případného poškození vnitřních orgánů celým procesem PDT, chemickou sloučeninou testovaného fotosenzitizéru nebo pouhým světelným ozářením. Vzorky tkáně byly i v tomto případě obarveny HE.

### 4.3 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

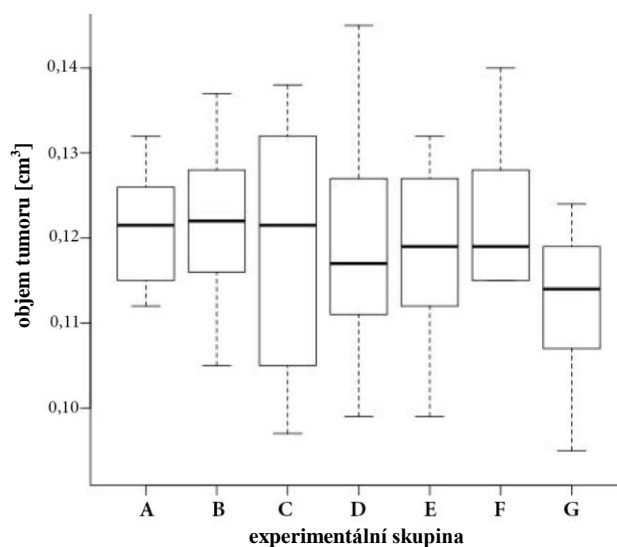
Provedený laboratorní experiment je typově preklinická metodologicko-intervenční analytická studie s kvantitativním výzkumem. Experiment byl kontrolovaný a rozdělení probandek (nu/nu myši) do intervenčních a kontrolních skupin probíhalo randomizovaně.

Byla stanovena nulová hypotéza  $H_0$  a alternativní hypotéza  $H_1$  a tyto hypotézy byly statisticky testovány. Statistická signifikance, tj. p-hodnota  $< 0,001$  byla interpretována jako statisticky významný výsledek, zamítající nulovou hypotézu  $H_0$  na hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ . 1% pravděpodobnost chyby I. druhu (falešné pozitivivity) byla i přes relativně malý rozsah rozptylů plně vyhovující. Metody popisné statistiky (aritmetický průměr, standardní – směrodatná odchylka, medián, rozpětí a relativní četnosti) byly použity pro charakteristiky souborů při statistickém zpracování výsledků.

Před vlastní analýzou dat byla otestována homogenita výchozích podmínek metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Metodou ANOVA se testovaly i konečné stavy všech kontrolních skupin. Smyslem tohoto parametrického testu bylo vyloučit případ, kdy v jedné ze skupin budou výchozí podmínky charakterizované jako objem tumoru výrazně odlišné od ostatních skupin. Případná odlišnost by mohla znehodnotit výsledek tím, že podstatně menší nebo podstatně větší objem tumoru by mohl signalizovat odlišné biologické chování. Navíc s odlišným objemem se mění poměr mezi povrchem a objemem tumoru, takže lze předpokládat i odlišnou odpověď na PDT. Použitá analýza rozptylu jednoduchého třídění posloužila k zobecnění analogie případu zjišťování rozdílu průměrů mezi dvěma nezávislými skupinami pomocí nepárového t-testu. Výpočet testovacího kritéria  $F$  tyto rozdíly průměrů mezi více skupinami prokázal. Pro všechny experimentální skupiny myši s karcinomem prsu (A (2,3), A–G) bylo  $F = 0,5803$ , pro skupiny s karcinomem prostaty linie LNCaP (H–M) 1,2191 a linie PC-3 (N–T) 0,1746. Hypotézy o rovnosti středních hodnot nebylo možné zamítnout ani v jednom případě, tudíž nebyl důvod se domnívat, že se výchozí velikosti tumorů v jednotlivých skupinách liší.

ANOVA předpokládá normalitu a homoskedasticitu (homogenní rozptyl) dat. Normalita se obvykle předpokládá, pokud nejsou patrné odlehlé hodnoty; protože odlehlé hodnoty patrné nebyly, testovala se pouze shoda rozptylů (homoskedasticita) Bartlettovým testem. Graficky jsou homogenity rozptylů našich vzorků znázorněny na krabicových diagramech (boxplotech) v **Grafu 3** pro skupiny s PDT karcinomu prsu a dále v **Grafu 4** a **Grafu 5** pro skupiny, které podstoupily experiment s PDT dvou odlišných linií karcinomu prostaty.

**Graf 3.** Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie MDA-MB-231



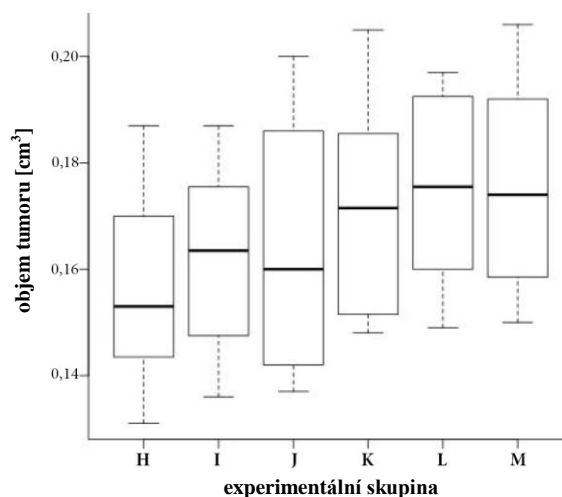
**Pokusné skupiny (A–D):**

- A** AIOH-Pc 4 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- B** Metvix 0,16 mg/mg crm. loc. + Xe iradiace
- C** Al(OH)S2-Pc plv. sol. i. v. + Xe iradiace
- D** Photofrin 2,5 mg/ml plv. sol. i. v. + Xe iradiace

**Kontrolní skupiny (E–G):**

- E** AIOH-Pc 4 mg/ml gel loc. bez Xe iradiace
- F** Metvix 0,16 mg/mg crm. loc. bez Xe iradiace
- G** bez fotosenzitizéru, bez Xe iradiace

**Graf 4.** Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie LNCaP



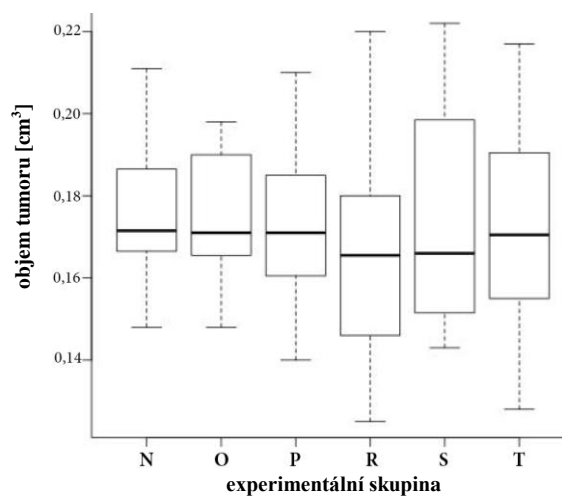
**Pokusné skupiny (H–J):**

- H** AIOH-Pc 4,5 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- I** AIOH-Pc 9 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- J** AIOH-Pc 18 mg/ml gel loc. + Xe iradiace

**Kontrolní skupiny (K–M):**

- K** bez fotosenzitizéru, bez Xe iradiace
- L** bez fotosenzitizéru, se Xe iradiací
- M** AIOH-Pc 18 mg/ml gel loc., bez Xe iradiace

**Graf 5.** Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie PC-3



**Pokusné skupiny (N–P):**

- N** AIOH-Pc 2 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- O** AIOH-Pc 4 mg/ml gel loc. + Xe iradiace
- P** AIOH-Pc 6 mg/ml gel loc. + Xe iradiace

**Kontrolní skupiny (R–T):**

- R** bez fotosenzitizéru, bez Xe iradiace
- S** bez fotosenzitizéru, se Xe iradiací
- T** AIOH-Pc 6 mg/ml gel loc., bez Xe iradiace

Pro analýzu výsledků byly použity dva přístupy: četnost pozitivních odpovědí na PDT a rychlost ústupu u pozitivních odpovědí. Pro statistické srovnání nespojitých proměnných byl v případě orientačního zhodnocení četnosti pozitivních odpovědí použit Fisherův přímý exaktní test (kontingenční tabulka s malým obsazením políček). Rychlost odpovědi byla hodnocena tím, že byl sestaven nejjednodušší model zániku tumoru podle rovnice:  $V_t = V_0 \times e^{-kt}$ , kde  $V_t$  představuje objem tumoru v daném čase  $t$  – konkrétní den měření,  $V_0$  objem tumoru hned po xenotransplantaci,  $e$  je Eulerovo číslo (základ přirozených logaritmů) a parametr  $k$  se označuje jako rychlostní konstanta a charakterizuje rychlost rozpadu tumoru. Hodnota  $k$  je však do značné míry neintuitivní, a proto byla nahrazena převodem na poločas rozpadu  $T_{1/2}$  ( $T_{1/2} = \ln 2 / k$ ). Ke srovnání poločasů byl použit neparametrický Mann-Whitneyův pořadový (Wilcoxonův) test. Dynamika zániku tumoru charakterizovaná poločasem rozpadu není dobrou charakteristikou reakce zvířecího modelu se xenoštěpem tumoru na PDT. Zde je ovšem třeba vzít v potaz, že měření v kritické fázi bylo z hlediska studia dynamiky rozpadu výrazně podzorkované. Tím se ovšem otevírá prostor pro další výzkum a např. pro sestavení statisticky vhodného modelu rozpadu xenotransplantovaného tumoru při PDT.

Pomineme-li dynamiku rozpadu tumoru, můžeme jednoduše na konci pokusu vypočítat rozsah celkového zpomalení nádorového růstu (*TGI* – total growth inhibition) podle vzorce:  $\% TGI = 1 - (V_E / V_K) \times 100$ .  $V_E$  představuje průměrný objem tumoru v léčené pokusné skupině a  $V_K$  průměrný objem tumoru v kontrolní – neléčené skupině. Tyto výsledky se pak dají jednoduše zhodnotit nepárovým oboustranným Studentovým t-testem. Parciální odpověď na protinádorovou terapii je u experimentálních zvířat definována jako  $TGI > 50 \%$  (ale  $< 100 \%$ ) počátečního objemu tumoru, tj. v 0. den experimentu. Kompletní odpověď znamená  $TGI = 100 \%$ , kdy je objem tumoru již neměřitelný (v kterýkoliv den experimentu). Pro pokusy s monoterapií je hraniční účinnost stanovena jako kontinuální  $TGI \geq 50 \%$  po dobu nejméně 1 doubling time tumoru (času potřebného ke zdvojnásobení velikosti tumoru) kdykoliv po zahájení terapie (Gehan, 1965; Grever a spol., 1992; Wu, 2010).

Softwarem použitým v práci byl statistický program IBM SPSS Statistics Premium (v19), programovací jazyk R Development Core Team R (v3.0.1) a Microsoft Excel 2010 (v14.0).

#### 4.4 VÝSLEDKY

Nu/nu myši reagovaly na PDT poměrně rychle. V intervenčních experimentálních skupinách byly u zvířat první známky nekrózy zaznamenány již 24 h po ozáření. 7. den

experimentu byla u léčených skupin patrná téměř kompletní regrese objemů tumorů s makroskopickou demarkací nekróz. Postupný terapeutický efekt PDT je zobrazen na **Obrázku 21**. V případě úspěšné PDT byla makroskopickým výsledkem jemná oploštěná jizva krytá epitelem (**Obrázek 22**).

**Obrázek 21.** *Experimentální PDT xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu*

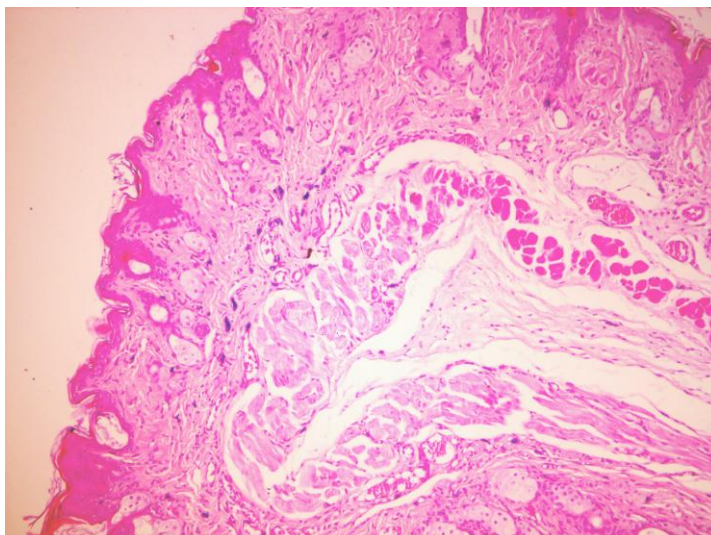


**Obrázek 22.** *Výsledek úspěšné PDT karcinomu prsu – klidná kožní jizva (30. den)*



V histopatologickém mikroskopickém nálezu dominovalo výrazné zmnožení plazmocytů s příměsí mastocytů v řídkém prosáknutém kolagenním vazivu. Mastocyty byly často v horním coriu a subcutis degranulované. Nádorové změny a přítomnost maligních buněk pozorovány nebyly (viz **Obrázek 23** na následující straně). Rozdíl v histologickém obrazu čerstvé jizevnaté tkáně mezi skupinami léčených různým typem fotosenzitizéru pozorován nebyl.

**Obrázek 23.** Čerstvá jizevnatá tkáň po PDT (HE 100×)



Ve všech kontrolních skupinách tumor vždy rostl a mikroskopicky byly naopak vždy nádorové buňky posléze prokázány. Stejný nálezn byl i u myši s relapsem po neúspěšné PDT, kde u léčených skupin navíc vlivem terapie docházelo k centrální nekróze a exulceraci implantovaných tumorů – bez ohledu na jejich histologický původ, tj. u karcinomu prsu i u obou linií karcinomu prostaty (**Obrázek 24**).

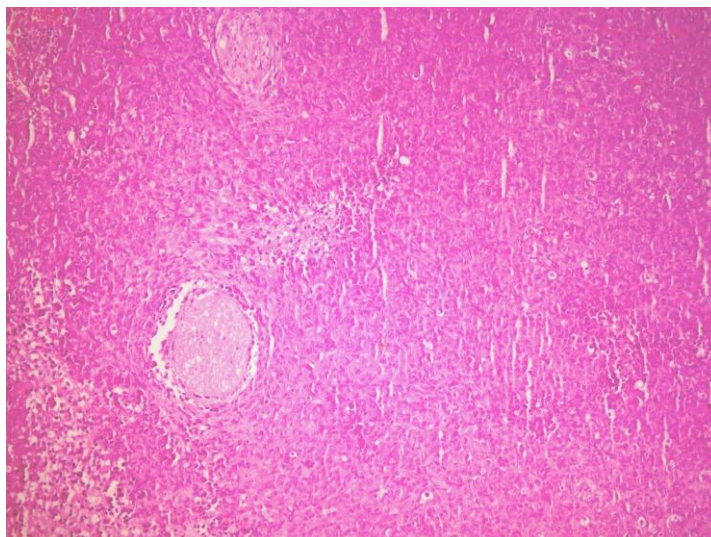
**Obrázek 24.** Neúspěšná PDT – ulcerovaný tumor prostaty s centrální nekrózou (30. den)



Mikroskopický obraz po HE barvení byl u myši všech kontrol a u případů selhané PDT stejný. Tumory byly jen lehce regresivně změněné, uchovávali si solidní uspořádání a rostly infiltrativně. Lymfangioinvaze a perineurální propagace byly vyjádřené víc u tkáňové linie LNCaP. U myši čistých kontrol byla centrální nekrotizace tumoru patrná víc. Doprovázena byla rozsáhlou reaktivní kulatobuněčnou celulizací (lymfocyty a plazmocyty) – tzv. úklidovou reakcí („tidying-up“ reaction). Vitální nádorová tkáň se nacházela převážně

v okrajových částech léze a hrubě orientačně zajímala cca 30–70 % celé tumorozní masy, jak lze vidět i na **Obrázku 25**. Podle morfologického popisu a biologického chování se u všech třech tkáňových linií jednalo o karcinomy špatně diferencované (high grade, grade 3) s 2–4 mitózami na velké zorní pole.

**Obrázek 25.** Tumorozní nekrotická masa po neúspěšné PDT karcinomu prsu (HE 100×)



Vzhledem k faktu, že se jednalo o tumory uložené subkutánně, tak s nimi myši poměrně dobře přežily i při konečné téměř 9násobné velikosti tumorů původně xenotransplantovaných. Obecně vedou s. c. implantáty primárních a kultivovaných nádorových buněk ke vzniku metastatického onemocnění jen zřídka (Bobek a spol., 2011) a za 1 měsíc našeho pokusu použité linie prakticky šanci na systémovou generalizaci ani neměly. Celý experiment se tak obešel bez předčasného úhynu myší. Během experimentu nebylo u zvířat zaznamenáno žádné neobvyklé chování.

Výsledky PDT xenotransplantovaného karcinomu prsu linie MDA-MB-231, karcinomu prostaty linie LNCaP a linie PC-3 jsou odpověďmi na jednotlivé základní otázky, výzkumné cíle položené před začátkem naší práce.

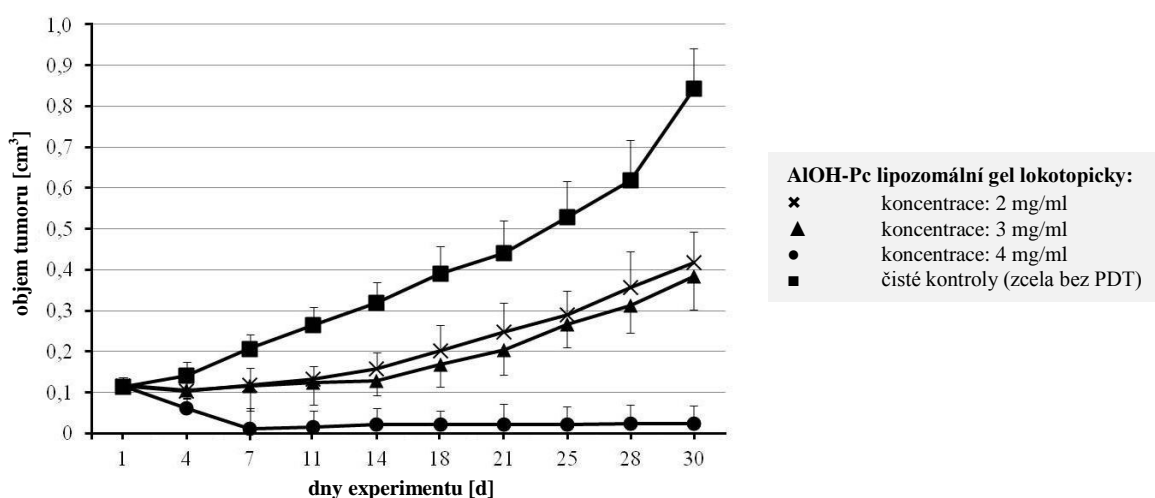
**1. Bude nově vyvinutý lipozomální gelový preparát s hydrofobním AIOH-Pc účinný u PDT karcinomu prsu? V jakých koncentracích?**

Ke stanovení nejúčinnější dávky AIOH-Pc v nově vyvinutém lipozomálním gelovém preparátu pro PDT xenotransplantovaného karcinomu prsu tkáňové linie MDA-MB-231 byly v *in vivo* experimentu testovány tři koncentrace fotosenzitizéru. Lipozomální gely s koncentracemi AIOH-Pc 2 i 3 mg/ml podané lokotopicky účinně snížili rychlost růstu tumoru.



Jejich maximální efekt byl pozorován zejména prvních 14 dnů experimentu. V porovnání s čistě kontrolní skupinou byl vliv takto vedené PDT významný – na konci experimentu (30. den) byly průměrné velikosti tumorů zvířat léčených poloviční. Terapie za použití lipozomálního gelu s koncentrací AIOH-Pc 4 mg/ml vedla k zmenšení tumorů už od počátku experimentu po vykonané PDT. Během období 7 dnů se objemy tumorů snížily na 1/10 objemů před zahájením terapie. Bez jakékoliv další terapie či opakování PDT další významný růst tumorů u této použité koncentrace až do ukončení experimentu zdokumentován nebyl. Tumory byly na konci pokusu u léčených myši téměř 20× menší než u kontrolních myši bez použití PDT (**Graf 6**).

**Graf 6.** Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie MDA-MB-231



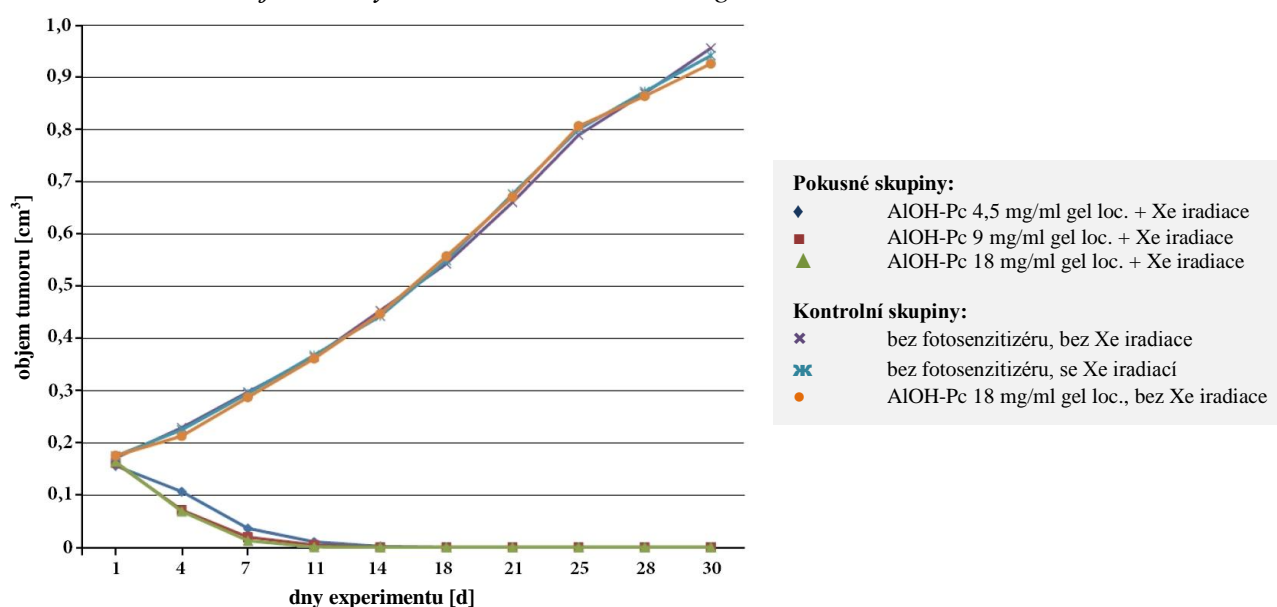
## 2. Bude nově vyvinutý lipozomální gelový preparát s hydrofobním AIOH-Pc účinný i u PDT karcinomu prostaty? V jakých koncentracích?

Na kontrolních skupinách bylo dokázáno, že samotná aplikace fotosenzitizéru bez ozáření světelným zdrojem a naopak vliv na růst tumoru nemají. Tumory myši těchto dvou kontrolních skupin rostly prakticky stejně jako u čistých kontrol. Tento závěr platil jak u linie LNCaP, tak u PC-3.

U xenotransplantovaných tumorů linie LNCaP byl opět testován nově formulovaný lipozomální gel s účinným AIOH-Pc ve třech různých koncentracích za účelem zjištění účinné koncentrace fotosenzitizéru pro terapii modelu méně agresivního karcinomu prostaty s nízkým metastatickým potenciálem. Lokotopicky podaný lipozomální gel AIOH-Pc v koncentracích 4,5, 9 a 18 mg/ml vedl k redukci objemů tumorů bezprostředně po ozáření. 7. den pokusu představovaly objemy 1–20 % původních tumorů. V rámci 14denní lhůty se pak tumory zmenšily na velikost nepalpovatelnou a mikrometrem neměřitelnou. V tomto stavu přetrvávaly až do ukončení experimentu a v 30. den tak byly myši všech pokusných skupin

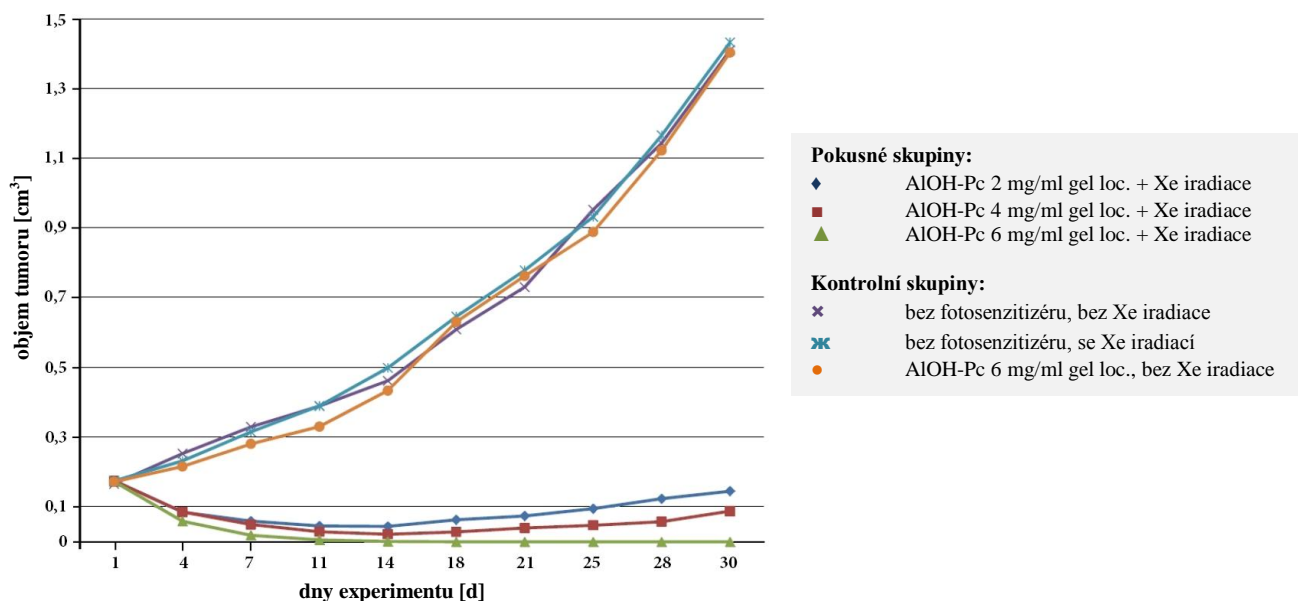
vyléčené. U nejnižší testované dávky AIOH-Pc (4,5 mg/ml) byl trend snižování objemů tumorů v prvních 7 dnech experimentu pomalejší, s vyššími dávkami se efektem vyrovnal až 14. den. I když byl terapeutický účinek oproti vyšším koncentracím (9 a 18 mg/ml) mírně opožděný, statisticky byl nevýznamný a ke konečnému zničení tumoru došlo ve stejné době jako s vyššími použitými dávkami (**Graf 7**).

**Graf 7.** Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie LNCaP



*In vivo* experiment s linií LNCaP prokázal výbornou terapeutickou účinnost nejnižší použité dávky AIOH-Pc 4,5 mg/ml. To znamená, že práh účinku leží pod touto koncentrací. V případě biologicky agresivnější linie karcinomu prostaty PC-3 vysoké koncentrace fotosenzitizéru testovány paradoxně nebyly. Odvážným cílem bylo dokázat, že PDT s použitím užšího (a nižšího) rozptylu koncentrací AIOH-Pc  $4 \pm 2$  mg/ml bude i v tomto případě efektivní. Kvůli stanovení optimální terapeutické dávky byly zkoumané lokotopicky aplikované lipozomální gely AIOH-Pc s koncentracemi 2, 4 a 6 mg/ml. Gely v koncentraci 2 a 4 mg/ml nebyly u tkáňové linie PC-3 dostatečně kurativní – účinnost byla výborná prvních 11 dnů, ale od 14. dne experimentu docházelo k postupnému opětovnému růstu tumorů. Relaps malignit byl sice pozvolný, nedošlo k strmému překotnému bujení a v konečném výsledku objemy ani nedosáhly původních velikostí svých xenoštěpů (50–80 %). K celkovému odstranění tumorů nižší koncentrace fotosenzitizéru nepostačovaly, avšak svým působením výrazně růst tumorů tlumily. Jedině AIOH-Pc v koncentraci 6 mg/ml vykazoval dostatečnou účinnost – v 7. den poklesly objemy tumorů na 1/10 původních hodnot a 14. den experimentu byly již neměřitelné. Nulové objemy byly v této skupině udrženy až do konce experimentu, u těchto myší došlo ke kompletní remisi (**Graf 8** na následující straně).

**Graf 8.** Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie PC-3



### 3. Bude AIOH-Pc dostatečně účinný již po jedné aplikaci?

U karcinomu prsu vedla jednorázová lokotopická aplikace AIOH-Pc v gelovém lipozomálním základu stanovené optimální koncentrace 4 mg/ml s následným jednodobým ozářením xenonovou lampou k remisi v 90 %. Jedná se o vysokou terapeutickou účinnost tohoto fotosenzitizéru v terapii karcinomu prsu již po jedné aplikaci.

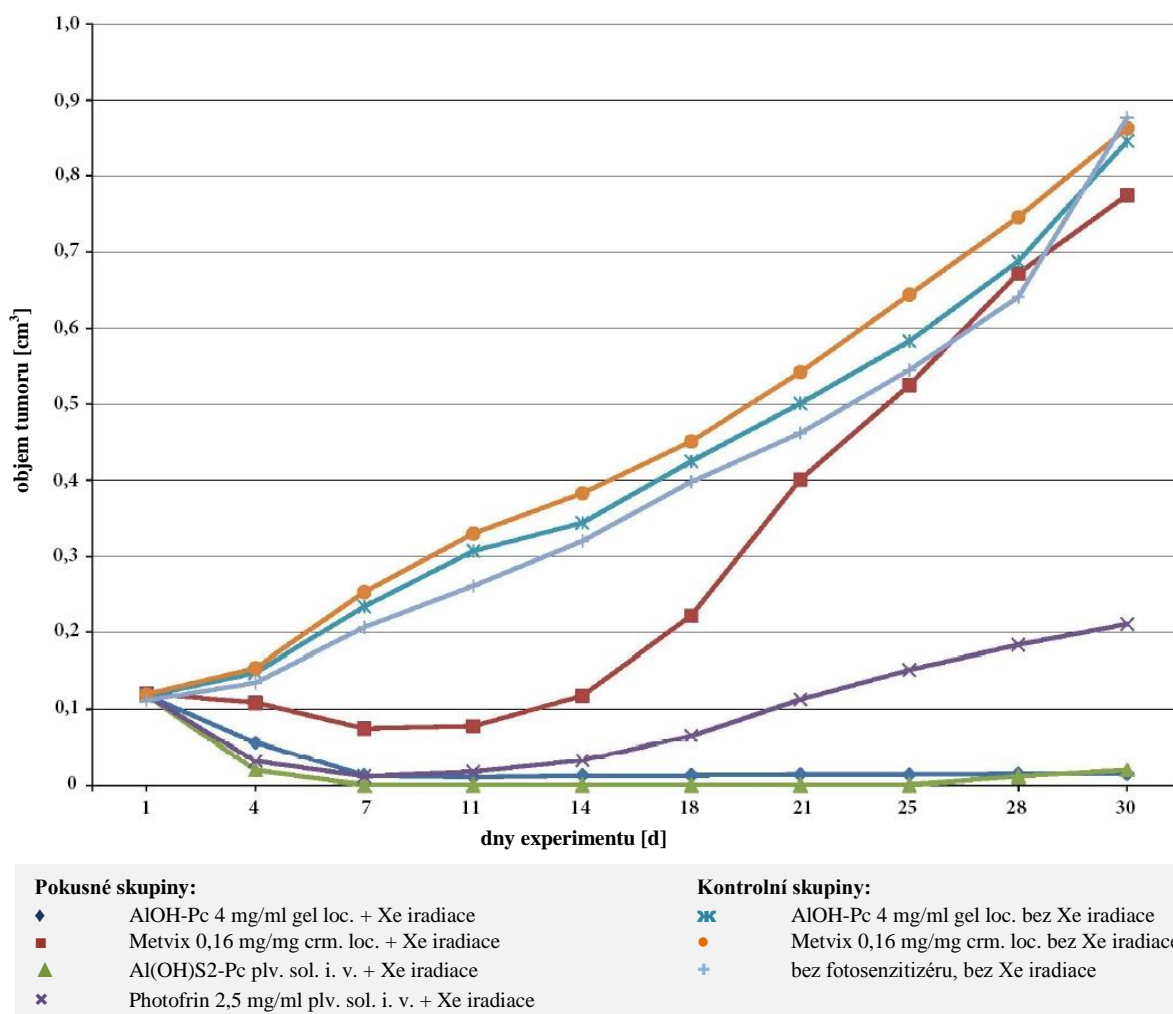
Jeden cyklus PDT s jednou úvodní aplikací AIOH-Pc dle protokolu ve vyšších koncentracích je u karcinomu prostaty 100% účinný u linie LNCaP a 100 % účinnosti dosahuje v zjištěné optimální koncentraci 6 mg/ml i u agresivnější linie PC-3. Nižší dávky fotosenzitizéru podané jedenkrát u PC-3 tumorů nejsou terapeuticky účinné. K dosažení remise tumorů by bylo nutné navýšit dávkování nebo celý cyklus s další aplikací AIOH-Pc o stejné koncentraci v polovině terapie – po 14 dnech – zopakovat.

### 4. Jak se bude lišit efekt PDT od aplikační cesty fotosenzitizéru? Bude efekt podání lokotopického srovnatelný s podáním systémovým?

Různé aplikační cesty různých fotosenzitizérů byly hodnocené na modelu PDT xenotransplantovaného karcinomu prsu, jehož výsledky jsou v dalším textu zobrazeny v **Grafu 9**. Onkologická efektivita daného fotosenzitizéru není na způsobu podání příliš závislá. Je ale nutno přiznat, že porovnávané ftalocyaniny nebyly zcela identické chemické sloučeniny (AIOH-Pc vs. Al(OH)S<sub>2</sub>-Pc). Disulfonovaná forma AIOH-Pc, která byla aplikována systémově, se od lokotopicky podaného AIOH-Pc liší o 3 nm vyšším absorpčním maximem. Tento rozdíl statisticky významný nebyl. Systémově podaný ftalocyanin vykazoval rychlejší nástup účinku. Po 4 dnech experimentu byly velikosti tumorů jen 16%

oproti na začátku xenotransplantovaným, kdežto u myši s lokotopicky podaným gelem AlOH-Pc PDT zredukovala velikost tumorů souhrnně na 50 %. Účinky se postupně vyrovnávaly od týdne po ozáření a od 28. dne až do konce byla efektivita různou cestou podaných ftalocyaninů identická. Rozdíly mezi podáním lokálním a systémovým jsou vždy. Nejpodstatnější byly však dva. Výhodou lokotopické aplikace je jednodušší, komfortnější cesta podání léčiva a teoreticky větší nádorová specificita preparátu ve formě gelu s fotosenzitizérem zachyceným v lipozomech.

**Graf 9.** Účinnost různých typů fotosenzitizérů v PDT linie MDA-MB-231



## 5. Budou ftalocyaniny v porovnání s komerčními Metvixem a Photofrinem účinnější?

Lokotopická terapie přípravkem Metvix zpomalovala růst tumorů prsu, který byl snížen po dobu prvních 2 týdnů; nekrotická fáze byla v tuto dobu pozorována jen nepatrně. Poté byl však dokumentován rychlý růst u všech testovaných zvířat. V koncovém bodě experimentu byly velikosti tumorů 6násobné, tj. jen o něco málo menší než v obou

kontrolních skupinách bez ozáření nebo v čisté kontrolní skupině. Jak vyplývá z **Grafu 9**, lipozomální gel hydrofobního AlOH-Pc prokázal v porovnání s Metvixem mnohem vyšší účinnost v experimentální PDT karcinomu prsu. Úplné remise byla dosažena u 9 z 10 testovaných myší. Terapie byla neúspěšná pouze u jedné léčené myši, u které od 11. dne experimentu došlo k opětovnému pomalému růstu tumoru. U zbývajících myší byly tumory v tentýž den až po zbytek experimentu již neměřitelné. Po Metvixu se na krátkou dobu objevovaly (sotva patrné) nekrózy, poté docházelo k brzkému výraznému bujení tumorů z jejich okrajových částí. Náš nový preparát se ukázal jako výhodnější i z časového hlediska – jeho drug-light interval byl pouze 10 min, zatímco v případě použití komerčně vyráběné 16% ALA mohlo vlastní ozáření myši následovat až za 3 h. Mnohem vyšší antitumorozní efekt lokotopicky podaného ftalocyaninu s pasivním targetingem byl oproti Metvixu u PDT karcinomu prsu nesporný.

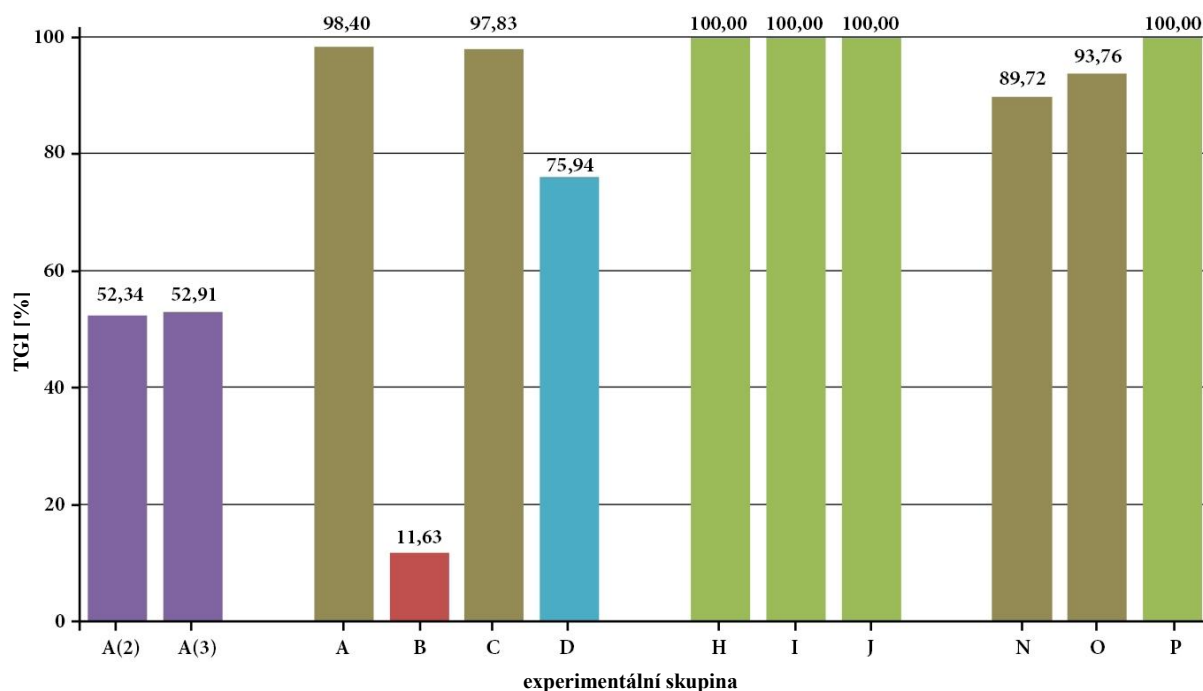
V experimentu PDT karcinomu prsu se systémově aplikovanými fotosenzitizéry byly proti sobě postavené klinicky používaný Photofrin a ftalocyanin určený k celkovému podání – Al(OH)S2-Pc. Účinnost preparátu byla podobná pouze první 4 dny experimentu (**Graf 9**). Zlomovým byl 14. den po iradiaci, kdy u 30 % myší léčených Photofrinem došlo k opětovnému růstu tumorů; u myší léčených Al(OH)S2-Pc k tomuto zlomu nedošlo a objemy tumorů byly neměřitelné až do ukončení pokusu. Jedno zvíře ve skupině nezareagovalo na terapii porfimerem od začátku experimentu. Neúspěšná PDT ve skupině s ftalocyaninem byla zaznamenána u jedné myši, u které došlo k relapsu 28. den experimentu a velikost tumoru dosáhla takřka xenotransplantované hodnoty. Klíčovým rozdílem mezi testovanými preparáty byl čas nutný k penetraci fotosenzitizéru intratumorálně. Drug-light interval potřebný u Al(OH)S2-Pc činil pouze 10 min, kdežto u i. v. podaného Photofrinu byl 288× delší (48 h), navíc s nutností ochrany zvířat před přímým světlem k zamezení fototoxického působení.

## **6. Bude 10minutový interval k dosažení účinné hladiny AlOH-Pc v tumoru dostatečný?**

Vedlejším problémem, který vyplynul ze základních cílů práce, byla délka intervalu potřebného k dosažení dostatečné koncentrace preparátu v tumoru, a tím efektivní PDT. U AlOH-Pc bylo prokázáno, že desetiminutový interval je dostatečný k dosažení dostatečné hladiny fotosenzitizéru v karcinomech prsu i prostaty. Tento krátký drug-light interval nový preparát zásadně odlišuje od ostatních používaných (ALA, porfimery), které dostatečné intratumorální koncentrace dosahují po hodinách a některé až po dnech. V klinické praxi by se jednalo o značnou výhodu – protože časová prodleva po podání ftalocyaninu je minimální, pacienti by byli schopni absolvovat celou PDT při jediné návštěvě lékaře. V případě nutnosti

opakování PDT by toto bylo možné v kratším časovém odstupu. To je zásadní rozdíl proti používaným fotosenzitizérům I. i II. generace, kdy pacient přichází k ozáření obvykle po několika hodinách nebo až dnech. Účinnost PDT jen po 10minutovém působení lipozomálního gelu ALOH-Pc byla potvrzena inhibicí nádorového růstu, jež se při podání optimální dávky pro konkrétní typ tumoru pohybovala kolem stropových hodnot, tj. v rozmezí 98–100 %, jak je doloženo **Grafem 10**.

**Graf 10.** Celkové zpomalení nádorového růstu po PDT v experimentu



**PDT karcinomu prsu – linie MDA-MB-231:**

A(2)	AIOH-Pc gel loc.: 2 mg/ml
A(3)	3 mg/ml
A	4 mg/ml
B	Metvix 0,16 mg/mg crm. loc.
C	Al(OH)S2-Pc plv. sol. i. v.
D	Photofrin 2,5 mg/ml plv. sol. i. v.

**PDT karcinomu prostaty – linie LNCaP:**

H	AIOH-Pc gel loc.: 4,5 mg/ml
I	9 mg/ml
J	18 mg/ml

**PDT karcinomu prostaty – linie PC-3:**

N	AIOH-Pc gel loc.: 2 mg/ml
O	4 mg/ml
P	6 mg/ml

## 7. Nebude AIOH-Pc vykazovat známky fotosenzitivity?

Další položená otázka se týkala možné fotosenzitivity nově zkoumaného AIOH-Pc. Po celou dobu experimentu za použití ftalocyaninového lipozomálního gelu známky fotosenzitivity u nu/nu myši vystavených dennímu světlu zaznamenány nebyly. Příčinou nulové fotosenzitivity je vysoká afinita preparátu k nádorové tkáni, které selektivita je ještě potencována lipozomální formulací. K ostatním zdravým tkáním, zvláště ke kůži, byla afinita AIOH-Pc nízká. Lokotopické podání a rychlá clearance fotosenzitizéru z organismu fotochemickou bezpečnost přípravku dále zvyšovaly. Tím se použitý ftalocyanin liší např. od HpD, kde fotosenzitivita trvá asi 1 měsíc. Než dojde ke kompletnímu vyloučení těchto

preparátů z organismu, je nutné se vyhýbat přímému slunečnímu světlu. Stejně tak i některé preparáty fotosenzitizérů II. generace vyvolávají fotosenzitivitu trvající řádově týdny. U myši nebyly samozřejmě zdokumentovány ani individuální projevy fotoalergie. Protože použité athymické myši v minulosti s fotosenzitizérem do styku nikdy nepřišly a co hlavně – nedisponují T-lymfocyty – epidermální buněčná cytotoxická reakce (imunopatologická reakce pozdního, IV. typu), objevující se většinou 12–48 h od kontaktu s alergenem a zprostředkována zejména cytotoxickými CD8+ lymfocyty (Black, 1999), do úvahy v našem experimentu ani nepřípadala.

### **8. Nebudou známky poškození zdravých tkání AIOH-Pc?**

Vyšetření orgánových vzorků pokusných skupin nepotvrdilo žádné patologické změny při kompletní pitvě myši, žádné změny také nebyly nalezeny ani při histologickém vyšetření jednotlivých orgánů a tkání. Subakutní orgánová toxicita a kancerogenita použitého AIOH-Pc byla tímto vyloučena. Analýza vzorků odebraných v kontrolních skupinách vyloučila změny vzniklé působením jen samotného fotosenzitizéru nebo pouhého terapeutického Xe světla. Tkáně nejevily chemické a ani termické poškození. Důvodem intaktnosti zdravých tkání v okolí je opět vysoká afinita AIOH-Pc primárně k maligním buňkám, což by univerzálně měly splňovat všechny fotosenzitizéry II. a samozřejmě III. generace. Závěry platily jak pro PDT karcinomu prsu, tak pro PDT karcinomu prostaty.

### **9. Nedojde k regresi nebo úplné remisi tumorů v kontrolních skupinách?**

Ve skupinách tzv. čistých kontrol, kde myši neobdržely žádnou terapii, byl regresivní růst (nebo spontánní remise) xenoštěpů tumorů logicky již v úvodu experimentu vyloučen. Dle předpokladu zde došlo k rychlé lokální progresi malignity. U karcinomu prsu a u karcinomu prostaty tkáňové linie LNCaP dosáhly tumory dvojnásobku své původní velikosti už 7. den experimentu a při ukončení experimentu byly skoro 9× větší. Xenoštěpy karcinomu prostaty linie PC-3 vykazovaly bez terapeutického zásahu rychlejší progresi – za 7 dní svoje objemy bezmála ztrojnásobily, v 30. den narostly o cca 800 % původní nádorové hmoty.

Růst tumorů kontrolních skupin s lokálně aplikovaným fotosenzitizérem kopíroval průběh kontrol neintervenčních. Samostatná iradiace Xe lampou nezpůsobuje regresi tumorů. Předpoklad alespoň termického účinku použitého světelného zdroje, který by mohl vést ke zpomalení růstu, příp. k částečnému optickému debulkingu tumorů, byl vyvrácen. První příčinou byla celková energie ozáření při PDT v experimentu, která byla totiž podstatně nižší než u kurativního použití intenzivnějšího světla – laseru – v praxi, kdy jsou kromě fotochemických mj. využívány i jeho fotodisrupční, foto- a termoablativní, vaporizační a

koagulační účinky (Steiner, 2011). Druhou příčinou bylo, že byl použit zdroj s dalekočerveným spektrem světla (600–700 nm), nikoliv zdroj blízkého IR světla (800–2500 nm), které již fototermální ablační vlastnosti v experimentální terapii tumorů vykazuje (O'Neal a spol., 2004).

### 10. Mohla by PDT být použita v terapii karcinomu prsu či prostaty u lidí?

V experimentu byla prokázána vysoká efektivita jednoho cyklu PDT za použití lipozomálního ftalocyaninového gelu v terapii xenotransplantovaných lidských karcinomů prsu a prostaty u athymických myší (viz i **Graf 10**). Při dodržení optimálního dávkování vedla tato terapie k remisi ve většině případů (90–100 %), a to bez ohledu na typ malignity – shrnutím je následující **Tabulka 15**.

**Tabulka 15.** Výsledky PDT v experimentu

Malignita	Linie	Fotosenzitizér	Koncentrace	Aplikace	Iradiace	Remise	Relaps
karcinom prsu	MDA-MB-231	AlOH-Pc	2 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	0 %	100 %
	MDA-MB-231	AlOH-Pc	3 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	0 %	100 %
	MDA-MB-231	AlOH-Pc	4 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	90 %	10 %
	MDA-MB-231	Metvix	0,16 mg/mg	lokotopická	600–700 nm	0 %	100 %
	MDA-MB-231	Al(OH)S2-Pc	2,5 mg/ml	systémová	600–700 nm	90 %	10 %
	MDA-MB-231	Photofrin	2,5 mg/ml	systémová	600–700 nm	60 %	40 %
karcinom prostaty	LNCaP	AlOH-Pc	4,5 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	100 %	0 %
	LNCaP	AlOH-Pc	9 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	100 %	0 %
	LNCaP	AlOH-Pc	18 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	100 %	0 %
	PC-3	AlOH-Pc	2 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	0 %	100 %
	PC-3	AlOH-Pc	4 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	20 %	80 %
	PC-3	AlOH-Pc	6 mg/ml	lokotopická	600–700 nm	100 %	0 %

Na předešlých fotkách experimentálních nu/nu myší je vidět, že PDT i při svém omezeném tkáňovém průniku má schopnost zlikvidovat poměrně objemné tumory (proпорčně k tělu zvířete). Toho je docíleno i zevním působením světla na tumor ze všech stran – nekróza vzniká na celém jeho povrchu.

Závěrečnou výzkumnou otázkou bylo, zda by experimentem navrženou PDT bylo možno používat v terapii karcinomu prsu a prostaty i u lidí. Ftalocyaninový lipozomální gel je preparát s vysokou afinitou k buňkám obou hormonálně dependentních karcinomů.



Terapeuticky účinnou hladinu dosahuje v prezentovaných tumorech rychle, má nulovou fotosenzitivitu a je šetrný na okolní zdravé tkáně. V porovnání s ostatními zkoumanými fotosenzitizéry prokazoval nejrychlejší akumulaci intratumorálně, jež byla objektivně verifikována fluorescencí v UV světle. Výborné vstřebávání přípravku bylo zjevně potencováno právě lipozomálními nosiči (Torchilin, 2005). Při zvažování využití takto aranžované PDT v klinické praxi by její velkou výhodou představoval prakticky zanedbatelný časový interval mezi aplikací léčiva a následným ozářením. Další výhodou přípravků ftalocyaninové řady je jasně definovaná chemická struktura, což se obecně o HpD, kde často preparáty sestávají až ze 40 různých substancí, říct nedá. V neposlední řadě je nutno zmínit, že PDT je procesem nebolestivým, u člověka by nebylo zapotřebí použití anestezie. Jasnou výhodou PDT je konečně fakt, že se jedná prakticky o bezkrevnou, nonanemizační metodu. Použití PDT v terapii karcinomu prsu by bylo anatomicky příznivější, ale za použití sofistikovaných světlovodných technologií, mikroinvazivních postupů nebo zapojení aktivního targetingu fotosenzitizérů by použití PDT nečinilo problémy ani v terapii karcinomu prostaty.

#### **4.5 DISKUZE**

V našem výzkumu byl prokázán účinek fotodynamické terapie na karcinom prsu a karcinom prostaty, čímž byla zodpovězena i stěžejní vědecká otázka naší práce. Ve výsledcích byla jednoznačně demonstrována velká úspěšnost PDT za lokotopického použití hydroxyhlinitého ftalocyaninu v lipozomálním gelu. Tím se osvědčila i vyšší účinnost moderních ftalocyaninových preparátů z pomezí II. a III. generace fotosenzitizérů v porovnání se staršími preparáty I. a II. generace. Současné indikační možnosti PDT u lidských pacientů jsme naším výzkumem rozšířili alespoň v teoretické rovině. Zatím se sice jedná pouze o experiment, ale vzhledem k tomu, že PDT je metodou u některých maligních i benigních onemocnění již reálně používanou a představuje metodu s velkým potenciálem využití (Allison, 2014), věříme, že dojde i ke klinickému využití těchto nových poznatků.

Důležité je také zdůraznit, že xenotransplantované tumory byly v našem experimentu destruovány čistě endogenními procesy, tj. vlastním účinkem PDT, nikoliv „vypálením“ světelným zdrojem. Technicky by tkáňová evaporace byla možná pouze za použití výkonnějšího laseru, ne xenonové výbojky. Intaktnost okolní a nadložní zdravé tkáně byla potvrzena histologicky. Tumory, které byly na konci pokusu objemově stejné jak ty původně implantované, se obvykle vyznačovaly rozsáhlou centrální nekrotizací. Nositelky takových

tumorů byly hodnoceny jako myši po neúspěšné PDT. Musíme však připustit možnost, že v reálných podmínkách u imunokompetentního modelu by se tyto léze velmi suspektně časem a bez dalšího arteficiálního – externího zásahu samy odhojily *per secundam intentionem*. Této tendenci nasvědčují počínající reparativní tkáňové pochody – úklidové reakce – v histologickém obrazu. K posouzení úspěšnosti testované metody se nám namísto dynamiky zániku tumoru (charakterizované poločasem rozpadu) jako model rozpadu kožní metastázy při PDT nakonec více osvědčila celková inhibice nádorového růstu (TGI), jež vlastně vyjadřuje cytostatický efekt terapie – o kolik % byl tumor zpomalen v růstu proti kontrolní skupině.

Náš experiment byl částečně limitován použitím světelného zdroje s relativně rozptýleným spektrem. Domníváme se, že použití zdroje s nastavitelnou operační  $\lambda$ , tj. vždy pro daný typ fotosenzitizéru jinou, „na míru šitou“ vlnovou délkou by efektivitu PDT možná zlepšilo. Úplně ideálním by pro tento účel byl diodový laser s jednou vlnovou délkou (single wavelength diode laser) nebo draží, ale univerzálnější diodový laser laditelný (Karu a Kolyakov, 2005). Vylepšení fotochemických vlastností nových fotosenzitizérů by mohlo docílit fotodynamické odpovědi už na menší dávky laserové iradiace, což by výskyt vedlejších účinků taktéž snižovalo. Nevýhodou PDT s použitím laserového světelného zdroje jsou bezpečnostní rizika. Platí zde obecné rizikové faktory aplikací laserů v medicíně týkající se bezpečnosti práce, odlišné chirurgické techniky a v neposlední řadě ekonomických požadavků. Pro práci s lasery jsou vypracovány zvláštní předpisy a vyhlášky s cílem omezit bezpečnostní riziko na minimum. Riziko spočívá hlavně v možném poškození očí personálu i pacientů (podle  $\lambda$  laseru v jiném segmentu oka), způsobení požáru a exploze (např. kyslíku) a poškození elektrické rozvodné sítě (vysoké napětí při spouštění). S laserem smí pracovat jen osoby řádně vyškolené, zdravotně a mentálně způsobilé a po řádném vstupním lékařském vyšetření (především očním). Každý laser musí mít příslušnou certifikaci a musí být pravidelně kontrolován autorizovaným technikem. Odlišná chirurgická technika obecně spočívá ve specifických operačních postupech – důležité je zvládnutí odhadu nevratného termického poškození a bezkontaktní preparace, která je pro chirurga velmi nezvyklá, proto je nutné, aby operatér přešel preklinickou přípravou na modelech. Naštěstí při využití laseru v PDT pochopitelně tyto požadavky na chirurga odpadají. Laserové přístroje jsou spojeny s vysokými investičními a fixními náklady. Jen časté využití přístroje dokáže pokrýt ekonomicky náročný provoz. V opačném případě je laseroterapie přítěží a také zručnost obsluhujícího personálu nedostatečná (Javůrek, 1995; Smalley, 2011).

Hlinité ftalocyaniny se preferenčně vychytávají v buňkách karcinomů. Hned po hodinovém lokálním působení např. chloridu ftalocyaninu hlinitého (velká podobnost s našim

AlOH-Pc) ve formě čistého roztoku se v literatuře uvádí absorpce cca 8,6 ng/mg tkáně. V porovnání s 20–30% krémem ALA je k dosažení absorpce 11,3 ng/mg nádorové tkáně nutná doba jeho působení až 18–24 h (Kyriazi a spol., 2008). Při použití se absorpční koeficient AlOH-Pc gel se od Metvixu liší o 4 mW. Podmínkou při měření a porovnávání absorpčních koeficientů je prostředí se stejným pH, v kyselém prostředí mohou být hodnoty i dvojnásobně vyšší (Kolářová a spol., 2001). Ftalocyaniny se vyznačují velmi vysokou selektivitou pro vychytávání v nádorové tkáni již samy o sobě, systémem targetingu lze tuto preferenční akumulaci jenom zvýšit. Maligní tkáň absorbuje ftalocyaniny přibližně 40× víc než normální tkáň kůže (Kyriazi a spol., 2008). Shrme-li výhody ftalocyaninu proti jiným fotosenzitizérům v rámci PDT různých druhů malignit, pak se ftalocyanin vyznačuje vysokou afinitou k buňkám karcinomu prsu a prostaty, rychlou akumulací v tumorech, vysokou terapeutickou účinností, nevyskytují se případy fotosenzitivity a nežádoucích vedlejších účinků. Protože je také aktivován světlem o delší vlnové délce (ideální  $\lambda$ : 670–700 nm), umožňuje jeho lepší penetraci do hloubky cílových tkání: 5–8 mm oproti 1–5 mm, běžných při používání látek I. generace na bázi porfyriu. Lokotopické podání nového fotosenzitizéru dosahuje biologické odezvy v 2–3× větších hloubkách než u klasických preparátů. Oproti systémové aplikaci přináší topická aplikace i výhodu v obejití jaterního first-pass efektu.

Ačkoliv kožní fototoxicita v experimentu zaznamenána nebyla, při sluneční expozici zůstává v klinické praxi nejběžnější morbiditou spojenou s PDT (Allison, 2014). Z nežádoucích účinků PDT je vždy zapotřebí rozeznat dočasnou lokální zánětovou odpověď a vlastní fotosenzitivitu. Znamky lokálního zánětu jsou kromě mírného lemu erytému kolem léčeného místa provázeny subjektivním pruritem. Příznaky obvykle vymizí spontánně do 7–10 dnů. Fotosenzitivita se projevuje fototoxickou a vzácně i fotoalergickou reakcí. Fototoxicita může být tzv. fotodynamická a nefotodynamická. Vznik fotodynamické fototoxicity je kromě expozice UVA záření podmíněn i přítomností kyslíku a nejčastěji se vyskytuje po použití HpD nebo preparátů s obsahem derivátů uhelného dehtu. Nefotodynamická fototoxická reakce je indukovaná psoraleny. Obrazem akutní fototoxicity je výrazný erytém s mohutným edémem (podobně např. jako u slunečních popálenin), dlouhodobě pak kožní hyperpigmentace, která může mít v návaznosti na chronické neuvážené slunění za následek i vznik kožních malignit (Epstein, 1999). Vystupňované projevy podobné bulozní pseudoporfyrii po PDT jsou vzácné, ve většině případů jsou také spojeny s nedodržením režimu, tj. cíleným opalováním (Rossi a spol., 2005). Maximální fotosenzitivita se u většiny fotosenzitizérů II. generace projeví do 1,5 h od podání, pak strmě klesá a délka jejího trvání je závislá od podané dávky (Houle a Strong, 2002). Její přetrvávání

nezávisí od lokalizace léčeného tumoru a ani od funkčního stavu jater. Jistou roli snad hraje pohlaví – prolongovaná fotosenzitivita se při testech s Photofrinem potvrdila víc u žen. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je určitě nízká kožní pigmentace – pacienti se světlým fototypem I a II musí být po PDT sledování bedlivěji. Protože akční světelné spektrum fototoxicity se nachází ve viditelné oblasti, je fotoprotekce po PDT potřebná u každého. 4–6 týdnů od podání Photofrinu se nemocní nesmí vystavovat přímému slunečnímu světlu a venku by měli chodit spíš celotělově zahaleni. Rozptýlené denní a umělé světlo v místnosti obvykle fotosenzitivitu nevyvolávají, ba dokonce nízké hladiny světla fotosenzitivitu postupně redukuje. Pozdní příznaky fotosenzibilizace se mohou vyskytnout ale i v odstupu měsíců až desítek let (Moriwaki a spol., 2001). Aplikace fotosenzitizéru může dále navodit fotoalergii, která má podobu kopřivky nezávislé na sluneční expozici a je zprostředkována T-lymfocyty. Přestože tyto projevy časté nejsou, jsou mírně častější po podání lokotopickém (Epstein, 1999). Používání fotosenzitizérů nenavozujících fotosenzibilizaci vůbec nebo jen velmi krátkodobě je proto vysoce žádoucí.

I když otázka účinnosti metody po jedné aplikaci bývá většinou sporná, nic na situaci nemění, že při potenciálním klinickém využití našich poznatků by nemocní těžili z biologicky bezpečné, aplikačně nenáročné a časově komfortní terapie s možností bezproblémového opakování PDT cyklu. Drug-light interval pouhých 10 min s kompletní odpovědí na terapii u zvířecích modelů se v současné literatuře zatím jeví v porovnání s komerčně dostupnými přípravky jako snadno nepřekonatelný (Nekvasil a spol., 2007). Dobu 4–6 h mezi aplikací fotosenzitizéru a ozářením (např. při metvixové PDT keratózy a bazaliomů) už pacienti označili za nevyhovující (Annemans a spol., 2008). Při úvaze o jednorázovém podání fotosenzitizéru je za dobu 3 h teoreticky možno provést až 18 cyklů PDT (18 rozličných pacientů nebo variace mnoha opakování PDT u několika pacientů) s AIOH-Pc, kdežto např. s Metvixem pouze cyklus jeden (1 pacient). Pozitivní časový faktor doby minimálního působení fotosenzitizéru před ozářením světlem je velkou výhodou pro nemocné – za stejnou dobu může být vedení terapie mnohem agresivnější. Pokles časové náročnosti terapie společně se snížením periterapeutické morbidity tak v konečném důsledku znamenají levnější a efektivnější variantu pro pacienta i celkově pro zdravotní systém.

I když uspořádání experimentu nebylo zaměřeno na toto pozorování, a tedy data nejsou příliš silná, z hodnocení výsledků lze dále usuzovat, že po dosažení jisté koncentrace fotosenzitizéru je účinek PDT patrný u všech subjektů, pod tímto prahem je účinek nedostatečný. Náš experiment v konečném důsledku tak přispěl i k vypracování optimálního

aplikačního schématu pro použití AIOH-Pc v PDT jedné linie karcinomu prsu a dvou odlišných linií karcinomu prostaty v režimu jednoho cyklu PDT (**Tabulka 16**). Vzhledem k testování dvou *in vivo* odlišně se chovajících typů adenokarcinomu prostaty, které se v praxi mohou často i prolínat, bylo by v případě prostaty onkologicky bezpečnější používat pro obě linie účinnou prahovou koncentraci AIOH-Pc 6 mg/ml. Dosáhnutí absolutní účinnosti i u karcinomu prsu by určitě bylo možné pouhým dalším zvýšením koncentrace fotosenzitizéru v podávaném preparátu.

**Tabulka 16.** Optimální aplikační schéma pro lokotopické použití AIOH-Pc gelu

Parametr PDT	Karcinom prsu	Karcinom prostaty
koncentrace fotosenzitizéru	4 mg/ml	6 mg/ml
dávka fotosenzitizéru	0,2 ml/tumor	
doba působení fotosenzitizéru	10 min	
vlnová délka použitého světla	600–700 nm (~ 672 nm)	
zářivý tok světelného zdroje	0,97 W	
celková energie záření	100 J/cm <sup>2</sup>	
doba záření	8 min	

Očekávanou představou je, že PDT karcinomu prsu nebo prostaty u lidí by v klinické praxi byla jistě nejprve používána k paliativní terapii pokročilých nádorových onemocnění. Hlavní funkcí paliativní onkochirurgie je zlepšení QoL nebo prodloužení života pacienta, což PDT teoreticky splňuje a stala by se tak důležitou součástí komplexní terapie. Vyhlídkou by mohly být sanační výkony na exulcerovaných tumorech prsu, lokální recidivy a obzvláště fotodynamické metastazektomie. PDT by představovala elegantní řešení kožních metastáz karcinomu prsu i prostaty za přijatelné morbidity zákroku. Prokázání účinnosti u pokročilých malignit by byla cesta k využití PDT i naopak v časných stádiích zmíněných neoplazií. Předpokladem radikální terapie lokalizovaných a časných forem je jejich dokonalé odstranění. K indikacím by zde patřily potenciálně maligní a semimaligní – borderline tumory, dále stacionární a progredientní prekancerózy (např. PIN u prostaty, Pagetova nemoc u prsu), preinvazivní karcinomy – karcinomy *in situ* (DCIS, LCIS) a konečně časně formy karcinomů (všechny T1 N0 M0). U karcinomu prsu by v indikovaných případech mohla být PDT doplněna ještě o klasickou nebo sentinelovou lymfadenektomii. Problémem z praxe je, že velikost časných tumorů vhodná pro volbu PDT jako primární kurativní metody bývá zachycena zcela ojediněle – i náhodný záchyt při screeningu obvykle odhalí tumory objemnější. Kombinace PDT v diagnostice uplatněním fluorescence a navazující PDT by

představovala jisté řešení. Tento algoritmus se začíná využívat zejména v onkoneurochirurgických studiích. V případě nitrolebních expanzí má PDT uplatnění i jako sanace tzv. topicky maligních tumorů – tumorů histologicky benigních, ovšem vyrůstající v místech, kde již sama jejich expanze je život ohrožující (Eljamel a spol., 2008; Friesen a spol., 2002). Reálným omezením širšího využití PDT je mělká a disperzní penetrace světla do cílové tkáně.

PDT by mohla být metodou volby k odstranění tumorů s rychlou progresí. Adenokarcinom prsu i adenokarcinom prostaty tuhle charakteristiku splňují. Jak náš experiment prokázal, v jednom cyklu je PDT schopná teoreticky odstranit vrstvu až cca 8 mm nádorové tkáně, což je kupř. dvojnásobné množství proti laserové vaporizaci v jednom sezení (4 mm) (Steiner, 2011). Opakování cyklů v terénu nerizikových topografických podmínek uložení tumoru při dobré snášenlivosti a compliance pacienta by tak dokázalo tumor postupně v krocích zlikvidovat. Logickým omezením využití PDT je situace, kdy by vertikální růst novotvaru byl rychlejší než dynamika PDT. Domníváme se, že kombinace PDT a tepelné laserové destrukce by tento problém byla schopna překlenout a odstranit jakýkoliv novotvar minimálně tak úspěšně jako konvenční chirurgie, ovšem s nižším rizikem poškození pacienta. Je potřeba si přiznat, že pro paliativní řešení objemnějších patologických procesů existuje celá řada jiných dostupnějších modalit – od prostého mechanického odstranění chirurgem až po kryalizaci. PDT by v těchto případech sice měla sofistikovaný základ, ale téměř stejný klinický přínos. Výhodnější by pak bylo spojení PDT s endoskopickými a světlovodnými technikami. Např. u obturujícího karcinomu prostaty by opakovaně aplikovaná PDT dokázala průchodnost uretry jistě bez obtíží udržet. Moderní systémy optických vláken spolu s digitalizovanou navigací dnes již dokážou dopravit světlo do téměř jakékoliv části těla, příkladem mohou být výsledné zlepšené přežívání nemocných s vyšší QoL po PDT paliaci neresekabilního obstrukčního cholangiocelulárního karcinomu (Zoepf a spol., 2005), dále PDT sdružená s miniinvazivní mukozektomií Barrettova jícnu a tubulovilozního adenomu rekta (Roche a spol., 1998) a transanální řešení maligních stenóz (Štukavec a spol., 2009) – PDT tudíž již není omezena výhradně pro léze superficiální. U dutých orgánů umožňuje prevenci lokálních stenotických komplikací a u parenchymatózních orgánů intersticiální destrukci tumorů (Svanberg a spol., 2010). Intersticiální PDT našlo své reálné uplatnění s perkutánně zaváděnými vlákny u inoperabilního karcinomu hlavy pankreatu (Bown a spol., 2002), prostaty (Altschuler a spol., 2009), tumorů hlavy a krku včetně řešení cévních anomálií (Jerjes a spol., 2011; Succo a spol., 2014).

Jak u karcinomu prsu, rovněž u klasické operativy dalších solidních tumorů konvenčními chirurgickými postupy, by bylo patrně slibné intraoperačně resekční výkony v závěru doplnit ještě o PDT. Ošetření lůžka po radikální prostatektomii PDT by mohlo docílit snížení pozdějšího výskytu implantačních metastáz. V případě R0 resekcí by bylo tak cílem minimalizování lokálních recidiv, u R1 resekcí zas snaha o eliminaci mikroskopických reziduí a u R2 debulking tumorových hmot. Intraoperační využití fotodynamiky se analyzovalo i u marginálních resekcí rekurentního maligního melanomu (Hori a spol., 2014) a navrhovalo v terapeutickém managementu difuzního maligního mezoteliomu (Ris a spol., 1991). Neoadjuvantní zapojení PDT do celkové terapie je studováno jako preresekční přístup u lokálně pokročilých centrálních nemalobuněčných karcinomů plic (Akopov a spol., 2014).

Další výzkum bude založen nadále na spolupráci s Oddělením experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky 1. LF UK v Praze, Oddělením biofyziky membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v Praze, Biotechnologickým a biomedicínským centrem AV ČR a UK ve Vestci a Výzkumným ústavem organických syntéz v Rybitví. V době mezi provedeným experimentem, publikacemi výsledků a sepsáním dizertační práce byl lipozomální preparát s ftalocyaninem v ČR již Úřadem průmyslového vlastnictví patentován (Ježek a spol., 2008) a byla přijata mezinárodní patentová přihláška pro všechny státy EU a vybrané státy (Švýcarsko, Chorvatsko, Norsko, USA a Kanada), kde momentálně probíhají schvalovací řízení jednotlivých zemí. V roce 2011 byl lipozomální preparát s ALOH-Pc za dodržení podmínek správné výrobní praxe vyroben v provozu firmy WAKE, s.r.o. (Rokycany, ČR) a následně v testech porovnán s původním laboratorním preparátem. Jeho vysoká terapeutická účinnost byla stejná za současného vyloučení nežádoucí toxicity. Identické účinnosti bylo dosaženo mj. přesným zachováním polymorfie krystalové mřížky centrálního atomu hliníku definované tzv. práškovým difraktogramem (vysoké poměrné zastoupení formy  $\alpha$  při skladování preparátu). O praktickém použití našeho preparátu se uvažuje v terapii kožních tumorů a kožních metastáz různých typů malignit. Jak konkurence, tak i možnost spolupráce jsou optimální – studium PDT v současnosti probíhá v cca 70 výzkumných centrech po celém světě, z nichž se 45 nachází v Kanadě a USA.

Co se týče výzkumu a testování nových fotosenzibilizujících agens, výhody nových preparátů oproti preparátům dosud používaným je možné vidět v tom, že umožní léčit nejen kožní tumory, ale i léze uložené hlouběji; budou vychytávány a shromažďovány v maligních buňkách rychleji, čímž omezí čas potřebný mezi aplikací přípravku a terapií světlem; budou eliminovány organismem rychleji, čímž zas sníží riziko nežádoucích fotosenzitivních reakcí.

K zdokonalení targetingu fotosenzitizerů bude potřebné zintenzivnit studium interakce mikroprostředí tumoru s léčivem. Sledování reziduálních nádorových buněk lze docílit použitím jejich fluorescenčního značení (Kimura a spol., 2010; Tran a spol., 2010; Větvicka a spol., 2009; Zhang a spol., 2010). Nedávné údaje naznačují, že exprese fluorescenčních proteinů zvyšuje účinnost PDT (Momiyama a spol., 2012), proto se dá se předpokládat, že vzhledem k využití daleko-červeného světla k aktivaci AlOH-Pc, terapie nebude ovlivněna expresí zeleného fluorescenčního proteinu. Pro přesnější implementaci výsledků navozením co nejvíc fyziologických podmínek v pokusech s lidskými tumory na zvířatech by mohl do budoucna posloužit hlavně Hoffmanův ortotopický myší model pro metastázy (Hoffman, 1999). Zajímavou variantou by byl i výzkum dynamiky růstu tumorů po PDT v porovnání s dynamikou po standardní radio- nebo chemoterapii.



## 5 ZÁVĚR

Sumarizace všech zmíněných výsledků našeho experimentu zamítá nulovou hypotézu  $H_0$  a akceptuje alternativní hypotézu  $H_1$ . **PDT se v experimentu prokázala jako účinná metoda monoterapie xenotransplantovaných lidských tumorů, konkrétně karcinomu prsu a karcinomu prostaty u nu/nu myší, ve více než 50 %.** Vyjádřením terapeutické účinnosti je procentuální celkové zpomalení nádorového růstu (% TGI) po experimentální PDT, jež při dodržení optimálního aplikačního schématu pro lokotopické použití ftalocyaninového gelu dosahuje 98,4% TGI u karcinomu prsu a 100% TGI u obou tkáňových linií karcinomu prostaty.

Na základě získaných údajů lze potvrdit, že fotodynamická terapie těchto dvou biologicky podobných malignit, patřících na vrchol incidence a to nejen v ČR, je v experimentu na athymických myších velmi úspěšnou metodou. Tumory jsou PDT kurativní v závislosti na dávce fotosenzitizéru. V našich pokusech se plně osvědčil potenciál nově vyvinutého fotosenzitizéru II. generace – ftalocyaninu hydroxyhlinitého podávaného lokotopicky ve formě lipozomálního gelu. Lipozomy s vlastním léčivem s konečnou velikostí do 500 nm byly připraveny patentovaným postupem mikrofluidizace. Pasivní lipozomální targeting zvyšuje jeho nádorově specifickou akumulaci schopnost a řadí jej tak vlastně do III. generace fotosenzitizérů. Kromě jmenované vyšší cílenosti a snadnější aplikační cesty při podání lokotopickým byla onkologická efektivita testovaných ftalocyaninů v konečném výsledku prakticky identická. U jiných testovaných fotosenzitizérů se tato platnost ale nepotvrdila, což platilo i o jejich chabých protinádorových schopnostech v rámci experimentální PDT. Jedinečnost nově zkoumaného preparátu v porovnání s jinými, již certifikovanými a hromadně vyráběnými, léčivými přípravky dále spočívá v extrémně krátké době nutného preradiačního působení (10 min) za zachování výtečných protinádorových účinků, rychlé eliminaci a bezproblémové snášenlivosti zvířecím modelem – bez náznaků fotosenzitivity a bez známek subakutní orgánové toxicity nebo kancerogenity. Bezpečnost používání byla objektivizována histopatologickým vyšetřením.

Terapeutického efektu bylo dosaženo již jedním cyklem terapie, tj. pouze jednou aplikací fotosenzitizéru. Pro PDT xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu linie MDA-MB-231 byla nejúčinnější dávka 4 mg/ml AIOH-Pc, která způsobila celkové zpomalení nádorového růstu v 98,4 % a vyléčila tak 90 % myší. Lipozomální gel AIOH-Pc prokázal slibnou účinnost i proti dvěma liniím xenotransplantovaného lidského karcinomu prostaty. V případě experimentální PDT biologicky méně agresivní linie LNCaP se osvědčilo

dávkování 4,5 mg/ml se 100% nádorovou inhibicí i stejným zastoupení remisí. U agresivnější formy karcinomu prostaty – tkáňové linie PC-3, která se vyznačuje vysokým metastatickým potenciálem, byla dostačující kurativní koncentrace zmiňovaného fotosenzitizéru 6 mg/ml, díky které se celkový růst tumorů zpomalil také 100%, a všechny myši byly na konci experimentu úspěšně vyléčeny.

Jen samotné podání fotosenzitizéru bez ozáření nebo samotné ozáření světlem vhodné charakteristiky bez použití fotosenzitizéru nemá žádný terapeutický efekt – fotodynamická terapie je efektivní výhradně v kombinaci těchto kroků.

Závěrem je nutné zdůraznit, že využitelnost PDT v klinické praxi je vzhledem k penetračním schopnostem světla limitována velikostí tumoru. Jednorázová PDT je určena pro léze menších rozměrů. Alespoň k částečnému zmenšení rozsáhlých tumorů je zapotřebí cyklus opakovat nebo použít intersticiálních technik. Ukazuje se, že s vývojem nových technologií používání PDT není limitováno ani nepříznivou lokalizací tumoru. Nejpřístupnějšími nadále však zůstávají léze povrchní. Význam PDT v terapii karcinomu prsu a prostaty u lidí by mohl být zpočátku v sanačních, paliativních výkonech u stadií IV a po osvědčení terapeutické modality pak rozšířen i o kurativní výkony u stadia 0 a různých typů prekanceróz.

Oproti klasickým onkologickým modalitám má PDT zavedená v praxi mnoho výhod: zanedbatelné vedlejší účinky, nízká úroveň periterapeutických komplikací, vyšší kvalita života pacienta bez nutnosti hospitalizace, tj. mimo lůžkové oddělení, možnost opakování terapie, eventualita spojení fluorescenční diagnostiky a samotné terapie do jednoho kroku – to vše za nižších finančních nákladů v porovnání s chemo- a radioterapií (Miškovský a spol., 2005). Z vlastní charakteristiky PDT dále plyne široké spektrum jejího použití (benigní i maligní onemocnění), miniinvazivita spojená s dobrým hojením, minimální pooperační bolestivostí a výborným estetickým efektem, nízká systémová toxicita (zatím bez zdokumentovaných kancero- či mutagenity), zaručený a vědecky ověřený komplexní účinek na molekulární, buněčné i tkáňové úrovni. Prospěšnost metody je ještě podložena žádnou nebo minimální krevní ztrátou (tzv. nonanemizace), bez potřeby celkové anestezie (maximálně lokální anestezie nebo analgosedace) a konečně tím nejdůležitějším – rychlým efektem terapie.

Nevýhody PDT plynou především z omezené penetrace světla do cílových tkání, proto PDT není ideální terapie první volby u pokročilých a diseminovaných forem onemocnění, kde je indikována pouze s paliativním záměrem ke zlepšení QoL a prodloužení intervalu přežití. U tumorů velkých objemů není zbylí, než cykly PDT opakovat. Současně praktikována PDT má

limity i v značné fototoxicitě používaných fotosenzitizérů a nepochybně i v ceně současných fotosenzitizérů a světlených zdrojů. Je proto nanejvýš vhodné vyvíjet nové fotosenzitizéry III. generace, které by se rychleji a specifičtěji akumulovaly v nádorové tkáni a naopak ze zdravých tkání se rychle vylučovaly. To je přesně principem selektivní lokotopické fotosenzibilizace uplatněné i v našem experimentu. Po dostatečném rozšíření metody a vypršení patentové ochrany na některé moderní fotosenzitizéry by PDT mohla být řádově ekonomicky mnohem přístupnější.

Význam PDT se dá posuzovat ve dvou rovinách – vědecké a klinické. Z hlediska vědeckého je fotodynamická terapie významná, protože:

- a) PDT je důležitým mezinárodním výzkumným úkolem, o čemž svědčí stoupající počet publikací, citací a specializovaných kongresů,
- b) ustanovení PDT jako „zlatého standardu“ eradikace některých typů malignit by bylo ve vývoji onkologie průlomové,
- c) vhodná synergie PDT s konvenční chirurgickou terapií, chemoterapií a radioterapií by mohla změnit algoritmus protinádorové terapie obecně, a to se značným posunem k šetření zdravých tkání pacienta za minimální celkové zátěže organismu.

Z pohledu klinické využitelnosti PDT v medicínské praxi by byla PDT výhodná zejména pro:

- a) nahrazení neselektivní a kvůli dosažení onkoradikalitě vědomě nadměrné chirurgické destrukce tkání (vedení řezu v „bezpečně zdravé hranici“). Zvláště v oblasti orofaciální chirurgie znamená pro pacienta úspěšný chirurgický zákrok často velmi mutilující, handicapující poškození. PDT by tak výrazně omezila nutnost dalších rekonstrukčních operací, protože cíleně zasahuje struktury makroskopicky obtížně identifikovatelné,
- b) snížení morbiditý spojené s vlastním terapeutickým postupem,
- c) zlepšení QoL nemocných (nejen při paliaci) a snížení celkové mortality,
- d) jednoduché uplatnění v terapii recidiv po jakémkoliv typu primární onkoterapie a
- e) přesun řady pacientů z péče ústavní do ambulantní, a tím logicky možné snížení počtu akutních nemocničních lůžek.

Závěrem lze s očekáváním konstatovat, že metoda fotodynamická terapie v sobě potenciálně skýtá radikalitu chirurgie, progresivitu biofyziky, exaktnost biochemie, eleganci dermatologie a naději onkologie. Další rozvoj PDT v klinické praxi závisí na průkazu, zda

účinnost této terapie, případně i v kombinaci s konvenčními postupy, je vyšší než u dosud standardně používaných a obecně uznávaných modalit. A to vše s přímým pozitivním dopadem na osud nemocných.

## 6 SOUHRN

Fotodynamická terapie představuje velmi nadějnou metodu. Kromě jejího využití v terapii velmi specifických benigních onemocnění se výzkum zaměřuje zejména na její uplatnění v onkologii. Potenciál PDT v rámci protinádorové terapie plyne z možnosti selektivní a přesné destrukce maligních lézí. Umožňuje nejen tumory cíleně zasáhnout, ale pomocí fluorescence i spolehlivě diagnostikovat hranice mezi zdravými a patologicky změněnými tkáněmi. I když principům a účinkům PDT se výzkum věnuje již více než 70 let, nadále nejsou všechny podstatné detaily zcela vyřešené. Zásadou nanotechnologických postupů se zdokonalují starší a vyvíjejí nové, více specifické (s vylepšeným targetingem) a účinnější fotosenzitizéry. Technologická revoluce za poslední léta výrazně změnila také lasery a optická vlákna. S důrazem na imunitní reakce doprovázející fotodynamickou protinádorovou terapii se hlouběji zkoumá účinek PDT na molekulárním, buněčném a tkáňovém stupni. Tak bylo zjištěno, že při PDT maligní buňky zanikají kromě nekrózy a apoptózy i procesem autofagocytózy. Všechny tyto pokroky mají za cíl zvyšování účinnosti PDT, a tím rozšiřování jejího klinického uplatnění.

V současné době se PDT v klinické praxi nejvíce používá v dermatologii, oftalmologii a onkologii. Výhodou v terapii různých kožních onemocnění (např. bazaliomy, spinaliomy, akné) je jejich dobrá anatomická dostupnost, která umožňuje lokotopickou aplikaci fotosenzitizéru a snadný přístup při ozařování světlem. PDT zde vykazuje i velmi dobrý kosmetický efekt. V oftalmologii dominuje terapie senilní degenerace makuly.

Onkologické indikace PDT jsou omezeny především na paliaci a jako doplněk konvenčních, zejména onkochirurgických postupů s cílem zlepšení kvality života a prodloužení přežívání nemocných. V onkologii byla PDT již v klinické praxi vyzkoušena na mnoha pacientech v terapii různých malignit, jmenovitě tumorů jícnu, žaludku, tlustého střeva, hlavy a krku, ústní a nosních dutin, hrtanu, hltanu, plic, močového měchýře a prostaty, jater, prsu, genitálií, dokonce i mozku. I přes zjevný efekt zůstává tato možnost terapie stále využita jen minimálně. Důvodů na poněkud skeptický pohled na PDT je několik. Hlavními jsou nedostatečné povědomí, nedostupnost a ve výsledku malá zkušenost s fotodynamikou v klinické praxi. Bezvýznamnou není ani dnešní cena nových fotosenzitizérů a nutnost pořízení kvalitního světelného zdroje, nejlépe laseru. Objektivními příčinami, proč si PDT prozatím nenašla své pevné místo v onkologii, jsou samotné limity této metody. Největším omezením je nedostačující hloubka penetrace aktivizujícího světla do cílových tkání. Průnik se daří zlepšovat za pomoci technologického pokroku ve vývoji světelných zdrojů a

zdokonalováním fotosenzitizérů – posouváním absorpčních maxim k vyšším vlnovým délkám (blížícím se 700 nm). Při objemných tumorech je nutné cyklus superficiální PDT opakovat nebo uplatnit metodu intersticiální. U světelných zdrojů je sporná přednastavená vlnová délka, která ohraničuje použití jen pro jeden nebo úzkou skupinu fotosenzitizérů. Řešením by byly např. laditelné diodové lasery. Úskalí spojené s následnou fotosenzibilizací se daří obcházet preferovaným použitím fotosenzitizérů nové generace.

Klasická protinádorová terapie byla po minulé desetiletí hlavní doménou studií PDT, současný výzkum fotodynamiky posouvá možnosti praktické aplikace fotodynamického efektu např. v čištění kostní dřevě od leukemických buněk, v antibakteriální a antivirové terapii, v terapii aterosklerózy, v dezinfekci a sterilizaci, nebo už zmíněné diagnostice. Je předpoklad, že v budoucnu by se mohlo jednat o metodu s mnohem širšími indikacemi.

K dokonalému přiblížení povahy zkoumaných malignit – karcinomu prsu a karcinomu prostaty – se práce dle nejnovějších poznatků snaží o ucelený a především vysoce aktuální pohled na problematiku. Vzhledem k neustále narůstající incidenci a skoro neměnné mortalitě obou hormonálně dependentních tumorů je naší povinností tyto nepříznivé trendy ovlivnit. Kromě toho, že tato práce shrnuje a doplňuje nedostatek současných informací v česky psaných publikacích, předestírá i možnost uplatnění právě PDT v onkologické terapii těchto nejčastějších nádorových onemocnění. Naším cílem je tedy snaha nabídnout nové terapeutické možnosti nemocným s těmito závažnými onemocněními nejdříve v rámci paliativní terapie a následně i jako kurativní východisko pro stadia časná.

V naší studii jsme *in vivo* na vhodných zvířecích modelech (nu/nu myši) prokázali efektivitu PDT na xenotransplantované lidské tumory. Konkrétně se jednalo o jednu linii karcinomu prsu a dvě biologicky odlišné linie karcinomu prostaty. Klíčovým aspektem v našem experimentu je použití nově vyvinutého fotosenzitizéru – ftalocyaninu hydroxyhlinitého ve formě lipozomálního gelu určenému k lokotopické aplikaci. Po jeho aplikaci na povrch tumoru je možné světlem ozařovat hned po 10 minutách, zatímco u většiny již schválených léčiv je tento drug-light interval podstatně delší (2–4 hodiny u hydrochloridu metylaminolevulátu apod.). Výsledkem je kompletní remise tumorů u 90 % myši se xenotěpy karcinomu prsu a u 100 % myši s oběma typy karcinomu prostaty. Nový preparát na rozdíl od starších použitých preparátů (kupř. porfimeru sodného) nezpůsobuje fotosenzitivitu a není ani orgánově toxický. Práce potvrzuje výzkumné závěry zahraničních studií – se vzrůstající dávkou fotosenzitizéru v aplikovaném preparátu se zvyšuje terapeutická

účinnost PDT. S tímto vědomím jsme dokázali vypracovat a ověřit modely optimálního dávkování ftalocyaninu pro lidský karcinom prsu a prostaty.

Hlavní výhodou takto v praxi aranžované PDT by bylo přenesení terapie do ambulantního provozu – pacienti nepotřebují celkovou anestezii, zákroky probíhají prakticky bez krevních ztrát a bezbolestně, nenastává fotosenzibilizace a cykly lze v relativně rychlém sledu v případě potřeby k dosažení onkologické radikality opakovat.

V kontrastu se všemi současnými možnostmi onkologické terapie je PDT schopná selektivní destrukce tumoru se šetrností k ostatním zdravým tkáním. Zdá se být velmi slibným terapeutickým nástrojem pro řešení menších primárních nebo recidivujících a metastazujících karcinomů prsu i prostaty. Vhodnou indikací by pro vynikající anatomickou přístupnost a schopnost zužitkování všech kladů lokotopické aplikace fotosenzitizérů jistě představovaly jejich kožní metastázy.

## 7 SUMMARY

Photodynamic therapy represents a highly promising method which is used in the treatment of very specific benign diseases. The current research is especially focused on its oncological applications. The possibility of selective and precise destruction of malignant lesions makes PDT a potential domain in anticancer treatment. It allows to target tumours precisely and also reliably distinguish between diseased and healthy tissue. The PDT principles and effects have been researched for more than seventy years, nevertheless not all essential details are figured out. The advances in nanotechnology has helped to develop more effective photosensitizers that are more selective (with enhanced targeting). The technological revolution markedly changed lasers and optical fibers over the past years. The PDT effects on molecular, cellular and tissue level are studied closely with emphasis on immunity reaction accompanying photodynamic therapy. It was determined that malignant cells die away during the process of necrosis, apoptosis as well as in process of autophagocytosis whilst using PDT. All these findings aim to increase PDT efficacy and extend its clinical utility.

In todays clinical practice PDT is mostly used in dermatology, ophthalmology and oncology. A good anatomical accessibility permitting the locotopical application of photosensitizer and allowing easy light admission during the irradiation is advantageous in the therapy of various skin diseases (e.g. basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, acne). PDT is achieving very good cosmetic results in this aspect. Treatment of senile macular degeneration is the highlight in the use of PDT in ophthalmology.

Oncological indications of PDT are limited primarily to palliative treatment and are used as an adjunct to conventional oncosurgical routines with the aim of improving the quality of life and prolonging patient survival. Photodynamic therapy has been extensively tested in oncological clinical practice specifically on patients with different types of malignancies, namely tumours of oesophagus, stomach, colon, head and neck, oral, paranasal cavities, larynx, pharynx, urinary bladder, prostate, liver, breast, genitals, and even brain. Although the effects are evident, PDT is used only minimally. There are several reasons for PDT to be viewed skeptically. The main case is insufficient awareness, unavailability and in fact little experience with the photodynamics in clinical use. Acquisition cost of a high-quality light source (preferably a laser) and the price of new photosensitizers play the role as well. PDT notwithstanding the mentioned economic reasons has its objective limits. The most significant restraint is the inability of activating light penetration to the target tissues. Future development of light sources and photosensitizers will help to improve the penetration depth



by shifting absorption peaks to higher wavelengths (up to 700 nm). Extensive tumours must be treated by superficial PDT in repetitive cycles or by applying the interstitial method. Presetting the wavelength of the light source is controversial because it limits the use only for a particular group of photosensitizers. Tunable diode lasers might solve this problem. Preferred usage of new generation photosensitizers helps reducing the risk of subsequent body photosensibilisation.

Classical anticancer therapy was the main domain of PDT studies over the past decades. Contemporary photodynamics research shifts potentiality of practical photodynamic effect usage in, e.g. bone marrow purging, antibacterial and antiviral therapy, treatment of atherosclerosis, disinfection, sterilization or already mentioned diagnostics. It is assumed that it might be a method with broader indications in the future.

In order to approach the nature of investigated malignancies – breast and prostate carcinoma – perfectly, our work brings a comprehensive and up-to-date view on the issue. Because the incidence of both hormone-dependent tumors is still increasing with almost unconverted very high mortality, it is our duty to influence these negative trends. The work summarizes and integrates the lack of actual information in Czech publications and proposes the possibility of PDT application for these most frequent malignancies. The aim is to offer a new therapeutic option for oncological patients. The curative treatment of early stages besides the palliative treatment would be finally a great achievement.

The efficacy of experimental PDT on xenotransplanted human tumours has been proven in our *in vivo* study. Nu/nu mouse was used as a proper animal model. One particular cell line of mammary carcinoma and two biologically different cell lines of prostate carcinoma were tested. The key aspect of our experiment was the application of newly developed photosensitizer – hydroxy-aluminum phthalocyanine in the form of liposomal gel designed for locotopical application. While majority of already registered drugs can be irradiated after a longer period of time (e.g. methyl aminolevulinate hydrochloride: 2–4 hours), hydroxy-aluminum phthalocyanine permits light irradiation after 10 minutes. Therapy achieved complete remission in 90% of mice with mammary carcinoma xenografts and in 100% of those with prostate carcinoma xenografts. The new photosensitizer, unlike the older ones (e.g. porfimer sodium), does not cause photosensitivity or organ toxicity. The study confers to international experimental outcomes – increasing dose of photosensitizer in an applied formulation increases the therapeutic efficacy of PDT. We were able to process and verify models of optimal phthalocyanine dosage for human mammary and prostate carcinoma.

The major benefit of such arranged PDT would be its performance as an outpatient procedure. General anesthesia is not needed, photosensibilisation does not occur and in addition the treatment is painless and without any blood loss. Oncological radicality can be achieved by repetitive cycles that can be performed in relatively short sequences, if necessary.

In contrast to all contemporary oncological modalities, PDT is fully capable of selective tumour destruction being thrifty and safe to surrounding healthy tissues. Photodynamic therapy seems to be a very promising therapeutic tool especially for the treatment of smaller primary or recurrent and metastatic breast and prostate cancer. Excellent anatomical accessibility of their cutaneous metastases makes it an ideal indication for the application of PDT with locotopical photosensitizer.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abrahámová J. *Současné možnosti léčby karcinomu prsu*. Remedica. **2002**; 12(4):233-246.
2. Abrol N, Seth A, Chatterjee P. *Cutaneous metastasis of prostate carcinoma to neck and upper chest*. Indian J Pathol Microbiol. **2011**; 54(2):394-395.
3. Acedo P, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A. *Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer*. Cell Death Dis. **2014**; 5:e1122.
4. Acimovic M, Dabic-Stankovic K, Pejicic T, Dzamic Z, Rafailovic D, Hadzi-Djokic J. *Preoperative Gleason score, percent of positive prostate biopsies and PSA in predicting biochemical recurrence after radical prostatectomy*. J BUON. **2013**; 18(4):954-960.
5. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochem Photobiol. **2001**; 74(5):656-669.
6. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer J Clin. **2011**; 61(4):250-281.
7. Akens MK, Wise-Milestone L, Won E, Schwock J, Yee AJ, Wilson BC, Whyne CM. *In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on metastatic breast cancer cells pre-treated with zoledronic acid*. Photodiagnosis Photodyn Ther. **2014**; 11(3):426-433.
8. Akopov A, Rusanov A, Kazakov N, Chistiakov I, Gerasin A, Carlson A. *Preresectional and intraoperative photodynamic therapy in locally advanced central non-small-cell lung cancer*. Interact Cardiovasc Thorac Surg. **2014**; 19(1):S23.
9. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, Hamilton RW, Lee BY, Lucas P. *Hyperbaric oxygen and malignancies: a potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy*. Med Sci Monit Basic Res. **2005**; 11(9):RA279-289.
10. Alcaraz I, Cerroni L, Rütten A, Kutzner H, Requena L. *Cutaneous metastases from internal malignancies: a clinicopathologic and immunohistochemical review*. Am J Dermatopathol. **2012**; 34(4):347-393.
11. Alexiades-Armenakas M. *Laser-mediated photodynamic therapy*. Clin Dermatol. **2006**; 24(1):16-25.
12. Alhathloul A, Hein R, Andres C, Ring J, Eberlein B. *Post-irradiation morphea: case report and review of the literature*. J Dermatol Case Rep. **2012**; 6(3):73-77.

13. Allison RR. *Photodynamic therapy: oncologic horizons*. *Future Oncol.* **2014**; 10(1):123-124.
14. Altschuler MD, Zhu TC, Hu Y, Finlay JC, Dimofte A, Wang K, Li J, Cengel K, Malkowicz SB, Hahn SM. *A heterogeneous algorithm for PDT dose optimization for prostate*. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* **2009**; 7164:71640B.
15. Anderson DE. *Familial versus sporadic breast cancer*. *Cancer.* **1992**; 70(6):1740-1746.
16. Annemans L, Caekelbergh K, Roelandts R, Boonen H, Leys C, Nikkels AF, van Den Haute V, van Quickenborne L, Verhaeghe E, Leroy B. *Real-life practice study of the clinical outcome and cost-effectiveness of photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in the management of actinic keratosis and basal cell carcinoma*. *Eur J Dermatol.* **2008**; 18(5):539-546.
17. Apolikhina IA, Sukhikh GT, Teterina TA, Aslanyan KO, Kuzmin SG, Vorozhtsov GN. *Antiviral and antimycotic effects of PDT with ALAsense*. *Photodiagn Photodyn.* **2011**; 8(2):170-171.
18. Argani P, Cimino-Mathews A. *Overview of histologic grade: Nottingham histologic score ("Elston grade")*. In: Johns Hopkins Pathology, Johns Hopkins University [online]. **2012** [cit. 15. 6. 2014]. Dostupné z URL: <<http://www.pathology.jhu.edu/breast/grade.php>>.
19. Atif M, Fakhar-e-Alam M, Sabino Lg, Ikram M, de Araujo MT, Kurachi C, Bagnato VS, AlSalhi MS. *Analysis of the combined effect of lasers of different wavelengths for PDT outcome using 600, 630, and 660 nm*. *Laser Phys. Lett.* **2011**; 8(5):386-392.
20. Auler H, Banzer G. *Investigations on the role of porphyrins in tumor-bearing humans and animals*. *Z Krebsforsch.* **1942**; 53:65-68.
21. Azzouzi AR, Barret E, Moore CM, Villers A, Allen C, Scherz A, Muir G, de Wildt M, Barber NJ, Lebdaï S, Emberton M. *TOOKAD<sup>®</sup> Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer*. *BJU Int.* **2013**; 112(6):766-774.
22. Babjuk M, Matoušková M. *Společné doporučené postupy v uroonkologii ČUS, ČOS a SROBF – zhoubné nádory prostaty*. In: Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit, Masarykova univerzita v Brně [online]. **2009** [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z URL: <[http://www.uroweb.cz/res/file/terapeuticke-postupy/postup\\_C61\\_prostata.pdf](http://www.uroweb.cz/res/file/terapeuticke-postupy/postup_C61_prostata.pdf)>.

23. Babjuk M, Stepp H, Jirsa M, Hofstetter A, Dvořáček J, Šafařík L. *Hodnocení fotodynamického účinku syntetického porfyriu TPPS<sub>4</sub> [meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine] na buňky lidského nádoru močového měchýře in vitro*. Ces Urol. **2000**; 4:11-16.
24. Banks E, Reeves G, Beral V, Bull D, Crossley B, Simmonds M, Hilton E, Bailey S, Barrett N, Briers P, English R, Jackson A, Kutt E, Lavelle J, Rockall L, Wallis MG, Wilson M, Patnick J. *Influence of personal characteristics of individual women on sensitivity and specificity of mammography in the Million Women Study: cohort study*. BMJ. **2004**; 329(7464):477.
25. Barnes F. *Applications of lasers to biology and medicine*. Proc IEEE. **1975**; 63(9):1269-1278.
26. Baron ED, Hanneman K, Scull, HM, Hsia A, McCormick T, Oleinick NL, Kenney M, Cooper KD. *Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy for the treatment of pre-malignant and malignant skin conditions: an update*. J Invest Dermatol. **2005**; 125:A7.
27. Barrett T, Davidson SR, Wilson BC, Weersink RA, Trachtenberg J, Haider MA. *Dynamic contrast enhanced MRI as a predictor of vascular-targeted photodynamic focal ablation therapy outcome in prostate cancer post-failed external beam radiation therapy*. Can Urol Assoc J. **2014**; 8(9-10):E708-714.
28. Beerlage HP, Aarnink RG, Ruijter ET, Witjes JA, Wijkstra H, Van De Kaa CA, Debruyne FM, De La Rosette JJ. *Correlation of transrectal ultrasound, computer analysis of transrectal ultrasound and histopathology of radical prostatectomy specimen*. Prostate Cancer Prostatic Dis. **2001**; 4(1):56-62.
29. Belizário JE. *Immunodeficient mouse models: an overview*. Open Immunol J. **2009**; 2:79-85.
30. Bellnier DA, Greco WR, Loewen GM, Nava H, Oseroff AR, Dougherty TJ. *Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX*. Lasers Surg Med. **2006**; 38(5):439-444.
31. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. *Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells*. Int J Cancer. **2011**; 128(8):1751-1757.
32. Berenbaum MC, Bonnett R, Chevretton EB, Akandeadebakin SL, Ruston M. *Selectivity of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins and chlorins and of photofrin-II in*

- causing photodamage in tumor, skin, muscle and bladder – the concept of cost-benefit in analyzing the results.* Lasers Med Sci. **1993**; 8:235-243.
33. Berrington de González A, Darby S. *Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries.* Lancet. **2004**; 363(9406):345-351.
  34. Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. *Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors.* Photochem Photobiol. **2004**; 80(1):22-30.
  35. Black CA. *Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective.* Dermatol Online J. **1999**; 5(1):7.
  36. Bloom HJ, Richardson WW. *Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.* Br J Cancer. **1957**; 11(3):359-377.
  37. Bluefarb SM, Walk, Gecht M. *Carcinoma of the prostate with zosteriform cutaneous metastases.* Arch Dermatol. **1957**; 76:402-407.
  38. Blum HF. *General photochemical aspects of photodynamic action.* In: Blum HF. Photodynamic action and diseases caused by light. New York: Reinhold Publishing, **1941**; 47. ISBN 978-00-2841-560-4.
  39. Bobek V, Kološtová K, Pintérová D, Boubelík M, Gürlich R, Hoffman RM. *Tail spontaneous metastatic mouse model: comparison of metastatic potential of orthotopic and heterotopic models imaged by GFP and RFP protein.* In Vivo. **2011**; 25(6):849-852.
  40. Bould J, Baše T, Londesborough MGS, Oro LA, Macías R, Kennedy JD, Kubát P, Fuciman M, Polívka T, Lang K. *Reversible capture of small molecules on bimetallaborane clusters: synthesis, structural characterization, and photophysical aspects.* Inorg Chem. **2011**; 50:7511-7523.
  41. Boutorine AS, Brault D, Takasugi M, Delgado O, Hélène C. *Chlorin-oligonucleotide conjugates: synthesis, properties, and red light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes.* J Am Chem Soc. **1996**; 118(40):9469-9476.
  42. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, Jones L, Wyld P, Gillams A, Hatfield AW. *Photodynamic therapy for cancer of the pancreas.* Gut. **2002**; 50(4):549-557.
  43. Brancalion L, Moseley H. *Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy.* Lasers Med Sci. **2002**; 17(3):173-186.

44. Brasseur N, Ménard I, Forget A, el Jastimi R, Hamel R, Molfino NA, van Lier JE. *Eradication of multiple myeloma and breast cancer cells by TH9402-mediated photodynamic therapy: implication for clinical ex vivo purging of autologous stem cell transplants*. Photochem Photobiol. **2000**; 72(6):780-787.
45. Bressler NM, Bressler SB. *Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne): impact on ophthalmology and visual sciences*. Invest Ophthalmol Vis Sci. **2000**; 41(3):3624-3628.
46. Brown GT, Patel V, Lee CC. *Cutaneous metastasis of prostate cancer: a case report and review of the literature with bioinformatics analysis of multiple healthcare delivery networks*. J Cutan Pathol. **2014**; 41(6):524-528.
47. Brown SB, Brown EA, Walker I. *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. Lancet Oncol. **2004**; 5(8):497-508.
48. Brown SB, Brown JE, Vernon DI. *Photosensitising drugs – their potential in oncology*. Expert Opin Investig Drugs. **1999**; 8(12):1967-1979.
49. Brychta M. *Systémová terapie solidních nádorů*. In: Kubecová M. Onkologie. Praha: 3. LF UK, **2011**; 36-50. ISBN 978-80-254-9742-5.
50. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, Mihatsch MJ. *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients*. Hum Pathol. **2000**; 31(5):578-583.
51. Burstein HJ. *Off-label use of oncology drugs: too much, too little, or just right?* J Natl Compr Canc Netw. **2013**; 11:505-506.
52. Busch J, Gonzalgo M, Leva N, Ferrari M, Friedersdorff F, Hinz S, Kempkensteffen C, Miller K, Magheli A. *Propensity Score Vergleich der verschiedenen radikalen Operationstechniken beim high risk Prostatakarzinom*. Aktuelle Urol. **2015**; 46(1):45-51.
53. Busch TM. *Local physiological changes during photodynamic therapy*. Lasers Surg Med. **2006**; 38(5):494-499.
54. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. J Natl Cancer Inst. **1974**; 53(3):661-674.
55. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. *Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: clinical results*. J Eur Acad Dermatol Venereol. **2007**; 21(4):439-451.
56. Carducci MA, Nelson JB, Bowling MK, Rogers T, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Donehower R, Leahy TL, Carr RA, Isaacson JD, Janus TJ, Andre A, Hosmane BS, Padley RJ. *Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics*. J Clin Oncol. **2002**; 20(8):2171-2180.

57. Carrel A. *On the permanent life of tissues outside of the organism*. J Exp Med. **1912**; 15(5):516-528.
58. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat Rev Cancer. **2006**; 6(7):535-545.
59. Claus EB, Risch N, Thompson WD. *Autosomal dominant inheritance of early onset breast cancer*. Cancer. **1994**; 73:643-651.
60. Clementoni MT, B-Roscher M, Munavalli GS. *Photodynamic photorejuvenation of the face with a combination of microneedling, red light, and broadband pulsed light*. Lasers Surg Med. **2010**; 42(2):150-159.
61. Cohen L, Schwartz S. *Modification of radiosensitivity by porphyrins. II. Transplanted rhabdomyosarcoma in mice*. Cancer Res. **1966**; 26(8):1769-1773.
62. Cohen LA. *Nutrition and prostate cancer: a review*. Ann N Y Acad Sci. **2002**; 963:148-155.
63. Cooke R, Jones ME, Cunningham D, Falk SJ, Gilson D, Hancock BW, Harris SJ, Horwich A, Hoskin PJ, Illidge T, Linch DC, Lister TA, Lucraft HH, Radford JA, Stevens AM, Syndikus I, Williams MV, England and Wales Hodgkin Lymphoma Follow-up Group, Swerdlow AJ. *Breast cancer risk following Hodgkin lymphoma radiotherapy in relation to menstrual and reproductive factors*. Br J Cancer. **2013**; 108(11):2399-2406.
64. Cuzick J. *Chemoprevention of breast cancer*. Breast Cancer. **2008**; 15(1):10-16.
65. Čapoun Z. *Prediktivní a prognostické nástroje pro karcinom prostaty*. In: Česká urologická společnost [online]. **2013** [cit. 25. 3. 2015]. Dostupné z URL: <<http://www.cus.cz/pro-odborniky/pro-praxi/dotazniky-a-kalkulatory/prediktivni-a-prognosticke-nastroje-pro-karcinom-prostaty>>.
66. Čunderlíková B, Vasovič V, Sieber F, Furre T, Borgen E, Nesland JM, Peng Q. *Hexaminolevulinate-mediated photodynamic purging of marrow grafts with murine breast carcinoma*. Bone Marrow Transplant. **2011**; 46(8):1118-1127.
67. D'Amico AV. *Combined-modality staging for localized adenocarcinoma of the prostate*. Oncology (Williston Park). **2001**; 15(8):1049-1059.
68. Dar IH, Kamili MA, Dar SH, Kuchaii FA. *Sister Mary Joseph nodule – a case report with review of literature*. J Res Med Sci. **2009**; 14(6):385-387.
69. Dawood S. *Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options*. Drugs. **2010**; 70(17):2247-2258.



70. De Bari B, Fiorentino A, Arcangeli S, Franco P, D'Angelillo RM, Alongi F. *From radiobiology to technology: what is changing in radiotherapy for prostate cancer.* Expert Rev Anticancer Ther. **2014**; 14(5):553-564.
71. De Jong M, Maina T. *Of mice and humans: are they the same? Implications in cancer translational research.* J Nucl Med. **2010**; 51(4):501-504.
72. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samaratunga H. *Gleason grading: past, present and future.* Histopathology. **2012**; 60(1):75-86.
73. Delouya G, Bahary P, Carrier JF, Larouche RX, Hervieux Y, Béliveau-Nadeau D, Donath D, Taussky D. *Refining prostate seed brachytherapy: comparing high-, intermediate-, and low-activity seeds for I-125 permanent seed prostate brachytherapy.* Brachytherapy. **2015**; pii:S1538-4721(14)00691-6.
74. Diamond KR, Farrell TJ, Patterson MS. *Measurement of fluorophore concentrations and fluorescence quantum yield in tissue-simulating phantoms using three diffusion models of steady-state spatially resolved fluorescence.* Phys Med Biol. **2003**; 48(24):4135-4149.
75. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. *Photodynamic therapy for cancer.* Nat Rev Cancer. **2003**; 3:380-387.
76. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. *Photodynamic therapy.* J Natl Cancer Inst. **1998**; 90(12):889-905.
77. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. *Photoradiation therapy. II. cure of animal tumors with hematoporphyrin and light.* JNCI J Natl Cancer Inst. **1975**; 55(1):115-121.
78. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors.* Cancer Res. **1978**; 38(8):2628-2635.
79. Driul L, Bernardi S, Bertozzi S, Schiavon M, Londero AP, Petri R. *New surgical trends in breast cancer treatment: conservative interventions and oncoplastic breast surgery.* Minerva Ginecol. **2013**; 65(3):289-96.
80. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice.* In: Webový portál epidemiologie zhoubných novotvarů v ČR, Masarykova univerzita v Brně [online]. **2014** [cit. 17. 5. 2014]. Dostupné z URL: <<http://www.svod.cz>>.
81. Easton DF, Ford D, Bishop DT. *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers.* Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet. **1995**; 56(1):265-271.

82. Eberl MM, Fox CH, Edge SB, Carter CA, Mahoney MC. *BI-RADS classification for management of abnormal mammograms*. J Am Board Fam Med. **2006**; 19(2):161-164.
83. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. *Tumours of the prostate*. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization classification of tumours – pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press, **2004**; 158-214. ISBN 92-832-2412-4.
84. Edge SB, Compton CC. *The American Joint Committee on Cancer: the 7<sup>th</sup> edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol. **2010**; 17(6):1471-1474.
85. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, Epstein JI, Walsh PC, Trock BJ, Partin AW. *An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011*. BJU Int. **2013**; 111(1):22-29. Erratum in: BJU Int. **2013**; 111(3):524.
86. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. *ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial*. Lasers Med Sci. **2008**; 23(4):361-367.
87. Elston CW, Ellis IO. *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology. **1991**; 19(5):403-410.
88. Engelová D. *Možnosti chirurgického řešení karcinomu prsní žlázy*. Postgrad Med. **2005**; 7(1):129-134.
89. Epstein JH. *Phototoxicity and photoallergy*. Semin Cutan Med Surg. **1999**; 18(4):274-284.
90. Epstein JI, Sanderson H, Carter HB, Scharfstein DO. *Utility of saturation biopsy to predict insignificant cancer at radical prostatectomy*. Urology. **2005**; 66(2):356-360.
91. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Forman D, Bray F, Dikshit R, Elser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM. *GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. In: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [online]. January 09, **2014** [cit. 17. 5. 2014]. Dostupné z URL: <<http://globocan.iarc.fr>>.
92. Ferré A, Cordonnier C, Demailly M, Hakami F, Sevestre H, Saint F. *Bladder tumor targeting by Hexvix<sup>®</sup> fluorescence: 4 years results after prospective monocentric evaluation*. Prog Urol. **2013**; 23(3):195-202.
93. Feyer PC, Steingraeber M. *Radiotherapy of bone metastasis in breast cancer patients – current approaches*. Breast Care (Basel). **2012**; 7(2):108-112.

94. Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO. *Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins.* Proc Soc Exp Biol Med. **1948**; 68: 640-641.
95. Flanagan SP. '*Nude*', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res. **1966**; 8(3):295-309.
96. Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE, Fogh JM, Daniels WP. *Twenty-three new human tumor lines established in nude mice.* Exp Cell Biol. **1980**; 48(3):229-239.
97. Foretová L. *Genetika nádorů prsu.* Onkologie. **2008**; 2(1):44-48.
98. Foster RD, Esserman LJ, Anthony JP, Hwang ES, Do H. *Skin-sparing mastectomy and immediate breast reconstruction: a prospective cohort study for the treatment of advanced stages of breast carcinoma.* Ann Surg Oncol. **2002**; 9(5):462-466.
99. Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland JM, Peng Q. *5-aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review).* Int J Oncol. **2002**; 21(3):577-582.
100. Furlani EJ, Furlani EP. *A model for predicting magnetic targeting of multifunctional particles in the microvasculature.* J Magn Magn Mater. **2007**; 312:187-193.
101. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. *Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually.* J Natl Cancer Inst. **1989**; 81(24):1879-1886.
102. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadová E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehr M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F. *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours.* J Pathol. **2014**; 232(2):199-209.
103. Gamaleia NF, Shton IO. *Gold mining for PDT: great expectations from tiny nanoparticles.* Photodiagnosis Photodyn Ther. **2015**; pii:S1572-1000(15)00029-0.
104. Gehan EA. *A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly – censored samples.* Biometrika. **1965**; 52:203-223.
105. Geisler C, Gaisa NT, Pfister D, Fuessel S, Kristiansen G, Braunschweig T, Gostek S, Beine B, Diehl HC, Jackson AM, Borchers CH, Heidenreich A, Meyer HE, Knüchel R, Henkel C. *Identification and validation of potential new biomarkers for prostate*

- cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS. Biomed Res Int. 2015;* 2015:454256.
106. Gersing E, Kelleher DK, Vaupel P. *Tumour tissue monitoring during photodynamic and hyperthermic treatment using bioimpedance spectroscopy. Physiol Meas. 2003;* 24(2):625-637.
  107. Ghossain A, Ghossain MA. *History of mastectomy before and after Halsted. J Med Liban. 2009;* 57(2):65-71.
  108. Gilleard O, Goodman A, Cooper M, Davies M, Dunn J. *The significance of the Van Nuys prognostic index in the management of ductal carcinoma in situ. World J Surg Oncol. 2008;* 6(1):61-67.
  109. Ginevra F, Biffanti S, Pagnan A, Biolo R, Reddi E, Jori G. *Delivery of the tumour photosensitizer zinc(II)-phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies in vitro and in vivo. Cancer Lett. 1990;* 49(1):59-65.
  110. Giovanella BC, Stehlin JS Jr, Williams LJ Jr, Lee SS, Shepard RC. *Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. Cancer. 1978;* 42(5):2269-2281.
  111. Gleason DF. *Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep. 1966;* 50(3):125-128.
  112. Gozuacik D, Kimchi A. *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene. 2004;* 23(16):2891-2906.
  113. Green H, Kehinde O, Thomas J. *Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;* 76(11):5665-5668.
  114. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W, Rhoads K, Chan S, Leedom T, King R, McLennan J, Crawford B, Kelly Marcom P, Shelley Hwang E. *Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. Ann Surg Oncol. 2013;* 20(10):3254-3258.
  115. Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA. *The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. Semin Oncol. 1992;* 19(6):622-638.
  116. Grossweiner LI. *Singlet oxygen: generation and properties. In: Internet Photochemistry and Photobiology, Emedia Science [online]. 2001 [cit. 3. 1. 2015]. Dostupné z URL: <<http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html>>.*
  117. Grönberg H, Smith J, Emanuelsson M, Jonsson BA, Bergh A, Carpten J, Isaacs W, Xu J, Meyers D, Trent J, Damber JE. *In Swedish families with hereditary prostate cancer,*

- linkage to the HPC1 locus on chromosome 1q24-25 is restricted to families with early-onset prostate cancer. Am J Hum Genet. 1999; 65(1):134-140.*
118. Gupta AK, Ryder JE. *Photodynamic therapy and topical aminolevulinic acid: an overview. Am J Clin Dermatol. 2003; 4(10):699-708.*
  119. Hayes DF, Thor AD. *c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. Semin Oncol. 2002; 29(3):231-245.*
  120. He D, Zeng J, Li X, Wu K, Wu D, He H, Song W, Li L. *Priapism as the initial manifestation of a penile and lower limb cutaneous metastasis of prostate adenocarcinoma with low serum PSA level. J Androl. 2012; 33(6):1160-1164.*
  121. He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, Gelmann EP, Abate-Shen C, Carter KC. *A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. Genomics. 1997; 43(1):69-77.*
  122. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F. *EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. Eur Urol. 2011; 59(1):61-71.*
  123. Hellerstedt BA, Pienta KJ. *The current state of hormonal therapy for prostate cancer. CA Cancer J Clin. 2002; 52(3):154-179.*
  124. Helm TN, Lee TC, Elston DM, Heymann WR, Schwartz RA, Wells MJ. *Dermatologic manifestations of metastatic carcinomas. In: Medscape [online]. 2014 [cit. 11. 1. 2015]. Dostupné z URL: <<http://emedicine.medscape.com/article/1101058>>.*
  125. Heneghan HM, Prichard RS, Lyons R, Regan PJ, Kelly JL, Malone C, McLaughlin R, Sweeney KJ, Kerin MJ. *Quality of life after immediate breast reconstruction and skin-sparing mastectomy – a comparison with patients undergoing breast conserving surgery. Eur J Surg Oncol. 2011; 37(11):937-943.*
  126. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. *Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. Cancer. 1991; 68(10):2142-2149.*
  127. Heroková J, Gatěk J. *Diagnostika a léčba onemocnění prsu. In: Speciální chirurgie, Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 2012 [cit. 2. 7. 2014]. Dostupné z URL: <[http://eportal.chirurgie.upol.cz/portal\\_final/?page\\_id=2634](http://eportal.chirurgie.upol.cz/portal_final/?page_id=2634)>.*
  128. Hes O, Michal M, Mukenšnábl P, Hora M, Smitková V, Zámečník M. *Nádorové léze. In: Nádory prostaty, Fakultní nemocnice Plzeň a Biopstická laboratoř Plzeň [online].*

- 2011** [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z URL:  
<<http://www.prostata.nadory.cz/nadorove.html>>.
129. Hill JS, Kahl SB, Kaye AH, Stylli SS, Koo MS, Gonzales MF, Vardaxis NJ, Johnson CI. *Selective tumor uptake of a boronated porphyrin in an animal-model of cerebral glioma*. Proc Natl Acad Sci U S A. **1992**; 89:1785-1789.
130. Hippeli S, Elstner EF. *OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxynitrite toxicity*. Z Naturforsch C. **1997**; 52(9-10):555-563.
131. Hirsch A, Kachnic LA, Sabel MS. *Management of locoregional recurrence of breast cancer after breast conserving therapy*. In: UpToDate, Wolters Kluwer Health [online]. **2013** [cit. 29. 3. 2015]. Dostupné z URL:  
<<http://www.uptodate.com/contents/management-of-locoregional-recurrence-of-breast-cancer-after-breast-conserving-therapy>>.
132. Hirsch A, Kachnic LA, Sabel MS, Hayes DF. *Management of locoregional recurrence of breast cancer after mastectomy*. In: UpToDate, Wolters Kluwer Health [online]. **2015** [cit. 29. 3. 2015]. Dostupné z URL:  
<<http://www.uptodate.com/contents/management-of-locoregional-recurrence-of-breast-cancer-after-mastectomy>>.
133. Hoedemaeker RF, Vis AN, Van Der Kwast TH. *Staging prostate cancer*. Microsc Res Tech. **2000**; 51(5):423-429.
134. Hoffman RM. *Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic*. Invest New Drugs. **1999**; 17(4):343-359.
135. Hopper C. *Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer*. Lancet Oncol. **2000**; 1(4):212-219.
136. Hori H, Teramoto Y, Fukuyama Y, Maruo T. *Marginal resection and acridine orange photodynamic therapy in a cat with recurrent cutaneous malignant melanoma*. Int J Appl Res Vet Med. **2014**; 12(3):181-185.
137. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA. *The LNCaP cell line – a new model for studies on human prostatic carcinoma*. Prog Clin Biol Res. **1980**; 37:115-132.
138. Houle JM, Strong HA. *Duration of skin photosensitivity and incidence of photosensitivity reactions after administration of verteporfin*. Retina. **2002**; 22(6):691-697.
139. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA.

- SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*. In: SEER Database, National Cancer Institute Bethesda, MD [online]. **2014** [cit. 20. 12. 2014]. Dostupné z URL: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011)>.
140. Hönscheid P, Datta K, Muders MH. *Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response*. Int J Radiat Biol. **2014**; 90(8):628-635.
  141. Hu SC, Chen GS, Wu CS, Chai CY, Chen WT, Lan CC. *Rates of cutaneous metastases from different internal malignancies: experience from a Taiwanese medical center*. J Am Acad Dermatol. **2009**; 60(3):379-387.
  142. Hu XM, Zhang FJ, Dong F, Zhou Y. *Three-dimensional illumination procedure for photodynamic therapy of dermatology*. J Biomed Opt. **2014**; 19(9):98003.
  143. Huang L, Zhao FQ, Huang X, Zhang FS. *Study of photoimmunoconjugates*. Prog Chem. **2007**; 19(4):527-534.
  144. Huang Z. *A review of progress in clinical photodynamic therapy*. Technol Cancer Res Treat. **2005**; 4(3):283-293.
  145. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, Barqawi AB, Chen YK. *Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges*. Technol Cancer Res Treat. **2008**; 7(4):309-320.
  146. Hughes HC, Lang CM. *Basic principles in selecting animal species for research projects*. Clin Toxicol. **1978**; 3(5):611-621.
  147. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer. **2002**; (8):563-572.
  148. Chambó RC, Tsuji FH, de Oliveira Lima F, Yamamoto HA, Nóbrega de Jesus CM. *What is the ideal core number for ultrasound-guided prostate biopsy?* Korean J Urol. **2014**; 55(11):725-731.
  149. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. *A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation*. J Chronic Dis. **1987**; 40(5):373-383.
  150. Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, Hasan T. *Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. **2006**; 16(4):279-305.
  151. Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, Wang SS. *New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy*. Cancer J. **2002**; 8(2):154-163.
  152. Chen Z, Wu AH, Gauderman WJ, Bernstein L, Ma H, Pike MC, Ursin G. *Does mammographic density reflect ethnic differences in breast cancer incidence rates?* Am J Epidemiol. **2004**; 159(2):140-147.

153. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. *Staging of prostate cancer*. *Histopathology*. **2012**; 60(1):87-117.
154. Issacs JT. *Hormonal balance and the risk of prostatic cancer*. *J Cell Biochem Suppl*. **1992**; 16H:107-108.
155. Javůrek J. *Laserové přístroje*. In: Javůrek J. *Fototerapie biolaserem – léčebná metoda budoucnosti*. Praha: Grada Publishing, **1995**; 61-82. ISBN 978-80-7169-046-5.
156. Javůrek J. *Světlo a lidský organismus*. In: Javůrek J. *Fototerapie biolaserem – léčebná metoda budoucnosti*. Praha: Grada Publishing, **1995**; 13-21. ISBN 978-80-7169-046-5.
157. Jeffes EW. *Levulan<sup>®</sup>: the first approved topical photosensitizer for the treatment of actinic keratosis*. *J Dermatolog Treat*. **2002**; 13(1):S19-S23.
158. Jelski W, Chrostek L, Szmitkowski M, Markiewicz W. *The activity of class I, II, III and IV alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in breast cancer*. *Clin Exp Med*. **2006**; 6(2):89-93.
159. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*. **2011**; 61:69-90.
160. Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S, Morley S, Hopper C. *Interstitial PDT for vascular anomalies*. *Lasers Surg Med*. **2011**; 43(5):357-365.
161. Jewett HJ. *The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer*. *Urol Clin North Am*. **1975**; 2(1):105-124.
162. Ježek P, Nekvasil M, Poučková P. *Liposomální gelový ftalocyaninový preparát pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění a způsob jeho přípravy*. Česká republika. Patentový spis CZ 298978 B6. 26. 3. **2008**.
163. Jirsa M Jr, Poučková P, Doležal J, Pospíšil J, Jirsa M. *Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumour-bearing nude mice*. *Eur J Cancer*. **1991**; 27(1):109.
164. Jodlbauer A, Von Tappeiner H. *On the participation of oxygen in the photodynamic effect of fluorescent substances*. *Muench Med Wschr*. **1904**; 52:1139-1141.
165. Jori G, Coppellotti O. *Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications*. *Anti-Infect Agents Med Chem*. **2007**; 6(2):119-131.
166. Josefsen LB, Boyle RW. *Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?* *Br J Pharmacol*. **2008**; 154(1):1-3.
167. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. *Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis*. *Photochem Photobiol Sci*. **2007**; 6(12):1234-1245.



168. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol. **1979**; 17(1):16-23.
169. Kammerer R, Buchner A, Palluch P, Pongratz T, Oboukhovskij K, Beyer W, Johansson A, Stepp H, Baumgartner R, Zimmermann W. *Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy*. PLoS One. **2011**; 6(6):e21834.
170. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. *Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release*. Mol Cell Endocrinol. **2005**; 239(1-2):27-36.
171. Karu TI, Kolyakov SF. *Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy*. Photomed Laser Surg. **2005**; 23(4):355-361.
172. Kashtan H, Haddad R, Greenberg R, Skornick Y, Kaplan O. *A non-laser light source for photodynamic therapy: in vitro effects on normal and malignant cells*. J Med. **2002**; 33(1-4):93-104.
173. Kasper P. *Cyproterone acetate: a genotoxic carcinogen?* Pharmacol Toxicol. **2001**; 88(5):223-231.
174. Kelly JF, Snell ME. *Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder*. J Urol. **1976**; 115(2):150-151.
175. Kenfield SA, Stampfer MJ, Chan JM, Giovannucci E. *Smoking and prostate cancer survival and recurrence*. JAMA. **2011**; 305(24):2548-2555.
176. Kessel D. *Proposed structure of the tumor-localizing fraction of HPD (hematoporphyrin derivative)*. Photochem Photobiol. **1986**; 44(2):193-196.
177. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A. *Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women*. JNCI J Natl Cancer Inst. **2003**; 95(16):1218-1226.
178. Khan MO, Ather MH. *Chromogranin A – serum marker for prostate cancer*. J Pak Med Assoc. **2011**; 61(1):108-111.
179. Kim JH, Lee SW. *Current status of penile rehabilitation after radical prostatectomy*. Korean J Urol. **2015**; 56(2):99-108.
180. Kim JH, Yoo BW, Yang WJ. *Hepatic failure induced by cyproterone acetate: a case report and literature review*. Can Urol Assoc J. **2014**; 8(5-6):E458-461.
181. Kimura H, Lee C, Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM. *UV light killing efficacy of fluorescent protein-expressing cancer cells in vitro and in vivo*. J Cell Biochem. **2010**; 110(6):1439-1446.

182. Kinzler KW, Vogelstein B. *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.* Nature. **1997**; 386(6627):761-763.
183. Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. *St John's Wort (Hypericum perforatum L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death.* PLoS One. **2014**; 9(7):e103762.
184. Klein A, Babilas P, Karrer S, Landthaler M, Szeimies RM. *Photodynamic therapy in dermatology – an update 2008.* J Dtsch Dermatol Ges. **2008**; 6(10):839-846.
185. Klener P. *Jiné maligní nádory kůže.* In: Klener P. *Klinická onkologie.* Praha: Galén a Karolinum, **2002**; 517-518. ISBN 978-80-7262-151-3.
186. Klener P. *Metastázy do kůže.* In: Klener P. *Klinická onkologie.* Praha: Galén a Karolinum, **2002**; 311. ISBN 978-80-7262-151-3.
187. Klener P, Abrahámová J. *Karcinom prostaty.* In: Klener P. *Klinická onkologie.* Praha: Galén a Karolinum, **2002**; 452-460. ISBN 978-80-7262-151-3.
188. Klener P, Abrahámová J. *Nádory prsu.* In: Klener P. *Klinická onkologie.* Praha: Galén a Karolinum, **2002**; 495-513. ISBN 978-80-7262-151-3.
189. Klimenko VV, Bogdanov AA, Knyazev NA, Rusanov AA, Dubina MV. *Different photodynamic effect between continuous wave and pulsed laser irradiation modes in k562 cells in vitro.* J Phys Conf Ser. **2014**; 541(1):012040.
190. Knudson AG Jr. *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A. **1971**; 68(4):820-823.
191. Kolářová H. *Fotodynamická terapie.* In: Kuna P, Navrátil L. *Klinická radiobiologie.* Praha: Manus, **2005**; 171-175. ISBN 978-80-86571-09-02.
192. Kolářová H, Kubínek R, Navrátil L, Strnad M, Réblová K, Škopek J. *Laser-induced photodynamic effect.* Proc SPIE. **2001**; 4606:144-147.
193. Kolářová H, Nevřelová P, Bajgar R, Jírová D, Kejlová K, Strnad M. *In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine.* Toxicol In Vitro. **2007**; 21(2):249-253.
194. Korbélik M. *PDT-associated host response and its role in the therapy outcome.* Lasers Surg Med. **2006**; 38(5):500-508.
195. Koukourakis G, Kelekis N, Armonis V, Kouloulis V. *Brachytherapy for prostate cancer: a systematic review.* Adv Urol. **2009**; 2009:327945.
196. Körbler J. *Untersuchung von Krebsgewebe im fluoreszenzerregenden Licht.* Strahlentherapie. **1931**; 41:510-518.

197. Král V, Davis J, Andrievsky A, Králová J, Synytsya A, Poučková P, Sessler JL. *Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins*. J Med Chem. **2002**; 45(5):1073-1078.
198. Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenborg HJ, Robinson DJ. *Laser speckle imaging of dynamic changes in flow during photodynamic therapy*. Lasers Med Sci. **2006**; 21(4):208-212.
199. Kume H, Kawai T, Nagata M, Azuma T, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Fukuhara H, Homma Y. *Intermittent docetaxel chemotherapy is feasible for castration-resistant prostate cancer*. Mol Clin Oncol. **2015**; 3(2):303-307.
200. Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M, Trebst T. *Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, **2008**; 24(2):87-94.
201. Lacroix M. *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer. **2006**; 13(4):1033-1067.
202. Lapeš M, Petera J, Jirsa M. *Photodynamic therapy of cutaneous metastases of breast cancer after local application of meso-tetra-(para-sulphophenyl)-porphin (TPPS4)*. J Photochem Photobiol B. **1996**; 36(2):205-207.
203. Lehman CD, Lee CI, Loving VA, Portillo MS, Peacock S, DeMartini WB. *Accuracy and value of breast ultrasound for primary imaging evaluation of symptomatic women 30–39 years of age*. AJR Am J Roentgenol. **2012**; 199(5):1169-1177.
204. Leonard R, Hardy J, van Tienhoven G, Houston S, Simmonds P, David M, Mansi J. *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. J Clin Oncol. **2001**; 19(21):4150-4159.
205. Levesque PE, Nieh PT, Zinman LN, Seldin DW, Libertino JA. *Radiolabeled monoclonal antibody indium 111-labeled CYT-356 localizes extraprostatic recurrent carcinoma after prostatectomy*. Urology. **1998**; 51(6):978-984.
206. Li JY, Li YY, Jin W, Yang Q, Shao ZM, Tian XS. *ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL*. J Exp Clin Cancer Res. **2012**; 31(1):102-109.
207. Li Y, Pritchett TM, Huang J, Ke M, Shao P, Sun W. *Photophysics and nonlinear absorption of peripheral-substituted zinc phthalocyanines*. J Phys Chem A. **2008**; 112(31):7200-7207.

208. Liepe K, Kropp J, Runge R, Kotzerke J. *Therapeutic efficiency of rhenium-188-HEDP in human prostate cancer skeletal metastases*. Br J Cancer. **2003**; 89(4): 625–629.
209. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. *Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland*. N Engl J Med. **2000**; 343(2):78-85.
210. Lipson RI, Baldes EJ. *The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative*. Arch Dermatol. **1960**; 82:508-516.
211. Lipson RI, Baldes EJ, Olsen AM. *The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection*. J Natl Cancer Inst. **1961**; 26:1-11.
212. Lobel J, MacDonald IJ, Ciesielski MJ, Barone T, Potter WR, Pollina J, Plunkett RJ, Fenstermaker RA, Dougherty TJ. *2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) in a nude rat glioma model: implications for photodynamic therapy*. Lasers Surg Med. **2001**; 29(5):397-405.
213. Long JP Jr, Prout GR Jr. *The usefulness of serum acid phosphatase in monitoring patients with advanced prostate carcinoma*. Adv Exp Med Biol. **1992**; 324:245-254.
214. Lookingbill DP, Spangler N, Helm KF. *Cutaneous metastases in patients with metastatic carcinoma: a retrospective study of 4020 patients*. J Am Acad Dermatol. **1993**; 29(2):228-236.
215. Love WG, Duk S, Biolo R, Jori G, Taylor PW. *Liposome-mediated delivery of photosensitizers: localization of zinc (II)-phthalocyanine within implanted tumors after intravenous administration*. Photochem Photobiol. **1996**; 63(5):656-661.
216. Lövey J, Nie D, Tóvári J, Kenessey I, Tímár J, Kandouz M, Honn KV. *Radiosensitivity of human prostate cancer cells can be modulated by inhibition of 12-lipoxygenase*. Cancer Lett. **2013**; 335(2):495-501.
217. Luini A, Gatti G, Zurrada S, Talakhadze N, Brenelli F, Gilardi D, Paganelli G, Orecchia R, Cassano E, Viale G, Sangalli C, Ballardini B, dos Santos GR, Veronesi U. *The evolution of the conservative approach to breast cancer*. Breast. **2007**; 16(2):120-129.
218. Luna A, Merino ME, Alberdi CG, Abba MC, Segal-Eiras A, Croce MV. *MUC1 positive cutaneous metastasis with transepidermal elimination from a breast carcinoma*. Int Med Case Rep J. **2013**; 6:81-84.
219. Luo Y, Kessel D. *Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine*. Photochem Photobiol. **1997**; 66(4):479-483.

220. MacCormack MA. *Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes*. Semin Cutan Med Surg. **2008**; 27(1):52-62.
221. Macek P, Barret E, Sanchez-Salas R, Galiano M, Rozet F, Ahallal Y, Gaya JM, Durant M, Mascle L, Giedelman C, Lunelli L, Validire P, Nesvadba M, Cathelineau X. *Prostate histoscanning in clinically localized biopsy proven prostate cancer: an accuracy study*. J Endourol. **2014**; 28(3):371-376.
222. Maftoum-Costa M, Naves KT, Oliveira AL, Tedesco AC, da Silva NS, Pacheco-Souares C. *Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells*. Cell Biol Int. **2007**; 32(8):1024-1028.
223. Mak G, Chin M, Nahar N, De Souza P. *Cutaneous metastasis of prostate carcinoma treated with radiotherapy: a case presentation*. BMC Res Notes. **2014**; 7:505.
224. Maltoni M, Caraceni A, Brunelli C, Broeckaert B, Christakis N, Eychmueller S, Glare P, Nabal M, Viganò A, Larkin P, De Conno F, Hanks G, Kaasa S, Steering Committee of the European Association for Palliative Care. *Prognostic factors in advanced cancer patients: evidence-based clinical recommendations – a study by the Steering Committee of the European Association for Palliative Care*. J Clin Oncol. **2005**; 23(25):6240-6248.
225. Marcus SL, McIntyre WR. *Photodynamic therapy systems and applications*. Expert Opin Emerg Drugs. **2002**; 7(2):321-334.
226. Mason MD. *Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer*. Rev Contemp Pharmacother. **1999**; 10(1):25-37.
227. McCaughan JS, Williams TE, Bethel BH. *Photodynamic therapy of endobronchial tumors*. Lasers Surg Med. **1986**; 6(3):336-345.
228. McCaw DL, Pope ER, Payne JT, West MK, Tompson RV, Tate D. *Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy*. Br J Cancer. **2000**; 82(7):1297-1299.
229. Melet A, Song K, Bucur O, Jagani Z, Grassian AR, Khosravi-Far R. *Apoptotic pathways in tumor progression and therapy*. In: Khosravi-Far R, White E. Programmed cell death in cancer progression and therapy. Advances in experimental medicine and biology, vol. 615. Heidelberg: Springer-Verlag, **2008**; 47-79. ISBN 978-1-4020-6554-5.
230. Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, Arun BK, Litton JK. *Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian*. Cancer. **2015**; 121(2):269-275.

231. Mikula P, Kalhotka L, Jančula D, Zezulka Š, Kořínková R, Černý J, Maršálek B, Toman P. *Evaluation of antibacterial properties of novel phthalocyanines against Escherichia coli – comparison of analytical methods*. J Photochem Photobiol B. **2014**; 138:230-239.
232. Milgrom L, MacRobert S. *Light years ahead*. Chem Brit. **1998**; 5:45-50.
233. Min JH, Park BK, Park JJ, Park SY, Kim CK. *Preoperative assessment of prostate cancer using prebiopsy MRI*. AJR Am J Roentgenol. **2014**; 203(2):341-346.
234. Minář L, Weinberger V, Jandáková E. *Histopatologická klasifikace karcinomu prsu a její vztah k využitelným modalitám systémové léčby*. Prakt Gyn. **2012**; 16(1):36-41.
235. Mistry K, Cable G. *Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma*. J Am Board Fam Pract. **2003**; 16(2):95-101.
236. Miškovský P, Jancura D, Uličný J, Fabřiciová G. *Fotodynamická terapie rakoviny v kontexte nových poznatků na molekulové úrovni*. Čs čas fyz. **2005**; 55(6):567-575.
237. Momiyama M, Suetsugu A, Kimura H, Kishimoto H, Aki R, Yamada A, Sakurada H, Chishima T, Bouvet M, Bulgakova NN, Endo I, Hoffman RM. *Fluorescent proteins enhance UVC PDT of cancer cells*. Anticancer Res. **2012**; 32(10):4327-4330.
238. Monteiro-Grillo I, Marques-Vidal P, Jorge M. *Psychosocial effect of mastectomy versus conservative surgery in patients with early breast cancer*. Clin Transl Oncol. **2005**; 7(11):499-503.
239. Montironi R, Schulman CC. *Pathological changes in prostate lesions after androgen manipulation*. J Clin Pathol. **1998**; 51(1):5-12.
240. Moore S. *Cutaneous metastatic breast cancer*. Clin J Oncol Nurs. **2002**; 6(5):255-260.
241. Mordenti C, Peris K, Fargnoli MC, Cerroni L, Chimenti S. *Cutaneous metastatic breast carcinoma: a study of 164 patients*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. **2000**; 9(4):143-148.
242. Mordon S, Cochrane C, Tylcz JB, Betrouni N, Mortier L, Koncar V. *Light emitting fabric technologies for photodynamic therapy*. Photodiagnosis Photodyn Ther. **2015**; 12(1):1-8.
243. Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M, Tokura Y. *Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin)*. Photodermatol Photoimmunol Photomed. **2001**; 17(5):241-243.
244. Morton G. *The best method for dose escalation: prostate brachytherapy*. Can Urol Assoc J. **2012**; 6(3):196-198.

245. Moša M, Zitko M, Poučková P. *Distribution and photodynamic effect of zinc phthalocyanine disulfonate in nude mice bearing mammary carcinoma*. Neoplasma. **1997**; 44(3):178-183.
246. Møller KI, Kongshoj B, Philipsen PA, Thomsen VO, Wulf HC. *How Finsen's light cured lupus vulgaris*. Photodermatol Photoimmunol Photomed. **2005**; 21(3):118-124.
247. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N, Hamblin MR. *Stimulation of antitumor immunity by photodynamic therapy*. Expert Rev Clin Immunol. **2011**; 7:75-91.
248. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. *Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer*. Cancers (Basel). **2011**; 3(2):2516-2539.
249. Muehlmann LA, Longo JPF, de Azevedo RB. *Nanostructured third generation photosensitizers for anticancer photodynamic therapy*. In: Elsaie ML. Photodynamic therapy: new research. Hauppauge: Nova Science Publishers, **2013**; 39-50. ISBN 978-1-62417-635-7.
250. Mueller TJ, Wu H, Greenberg RE, Hudes G, Topham N, Lessin SR, Uzzo RG. *Cutaneous metastases from genitourinary malignancies*. Urology. **2004**; 63(6):1021-1026.
251. Naiki T, Kawai N, Okamura T, Nagata D, Kojima Y, Akita H, Yasui T, Tozawa K, Kohri K. *Neoadjuvant hormonal therapy is a feasible option in laparoscopic radical prostatectomy*. BMC Urol. **2012**; 12:36-41.
252. Narod SA. *Hereditary breast carcinoma syndromes*. Cancer. **1997**; 80(3):537-542.
253. Nekvasil M, Zadinová M, Tahotná L, Žáčková M, Poučková P, Ježek P. *Optimum modality for photodynamic therapy of tumors: gels containing liposomes with hydrophobic photosensitizers*. Drug Dev Res. **2007**; 68(5):235-252.
254. Nezbeda P. *Markery*. In: Klinická biochemie, Creative Education – Vital Application (CEVA) [online]. **2012** [cit. 25. 6. 2014]. Dostupné z URL: <[http://ceva-edu.cz/pluginfile.php/2338/mod\\_resource/content/0/120504Markery\\_v4.pdf](http://ceva-edu.cz/pluginfile.php/2338/mod_resource/content/0/120504Markery_v4.pdf)>.
255. Nishimura Y. *Intensity modulated radiation therapy*. Gan To Kagaku Ryoho. **2014**; 41(13):2539-2542.
256. Novotný J, Pecen L, Petruželka L. *Identifikace žen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu*. Mod Gynekol Porod. **2004**; 13(3):439-444.
257. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. *Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy*. Acta Biochim Pol. **2005**; 52(2):339-352.
258. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL. *Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles*. Cancer Lett. **2004**; 209(2):171-176.

259. Oesterling JE. *Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate*. J Urol. **1991**; 145(5):907-923.
260. Ogawa K, Kobuke Y. *Recent advances in two-photon photodynamic therapy*. Anticancer Agents Med Chem. **2008**; 8(3):269-279.
261. Ogunmola AO, Shittu OB, Olapade-Olaopa EO. *Cutaneous metastasis from prostate cancer in a nigerian: a case report and literature review*. Afr J Med Med Sci. **2013**; 42(3):283-286.
262. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how*. Photochem Photobiol Sci. **2002**; 1(1):1-21.
263. Orringer JS, Sachs DL, Bailey E, Kang S, Hamilton T, Voorhees JJ. *Photodynamic therapy for acne vulgaris: a randomized, controlled, split-face clinical trial of topical aminolevulinic acid and pulsed dye laser therapy*. J Cosmet Dermatol. **2010**; 9(1):28-34.
264. Pantelouris EM. *Absence of thymus in a mouse mutant*. Nature. **1968**; 217(5126):370-371.
265. Panzarini E, Inguscio V, Fimia GM, Dini L. *Rose bengal acetate photodynamic therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human HeLa cells*. PLoS One. **2014**; 9(8):e105778.
266. Perrin P, Maquet JH, Bringeon G, Devonec M. *Screening for prostate cancer. Comparison of transrectal ultrasound, prostate specific antigen and rectal examination*. Br J Urol. **1991**; 68(3):263-265.
267. Pervaiz S, Olivo M. *Art and science of photodynamic therapy*. Clin Exp Pharmacol Physiol. **2006**; 33(5-6):551-556.
268. Petrelli F, Coinu A, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, Barni S. *Five or more years of adjuvant endocrine therapy in breast cancer: a meta-analysis of published randomised trials*. Breast Cancer Res Treat. **2013**; 140(2):233-240.
269. Petruželka L. *Multigenový test přispívá k individualizaci léčbě karcinomu prsu*. Med Trib. **2014**; 10(11):B6-8.
270. Phan J, Swanson DA, Levy LB, Kudchadker RJ, Bruno TL, Frank SJ. *Late rectal complications after prostate brachytherapy for localized prostate cancer: incidence and management*. Cancer. **2009**; 115(9):1827-1839.
271. Pizinger K. *Kožní metastázy*. Onkologie. **2010**; 4(4):237-240.



272. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*. Lasers Med Sci. **2009**; 24(2):259-268.
273. Policard R. *Studies of experimental tumours under Wood's light*. Comp Rend Soc Biol. **1924**; 91:1423-1428.
274. Pontén J, Holmberg L, Trichopoulos D, Kallioniemi OP, Kvåle G, Wallgren A, Papadimitriou JT. *Biology and natural history of breast cancer*. Int J Cancer. **1990**; 46(5):5-21.
275. Poučková P. *Fotodynamická terapie maligních nádorů*. In: Navrátil L. Moderní fototerapie a laseroterapie. Praha: Manus, **2000**; 176-182. ISBN 978-80-902318-3-7.
276. Poyer F, Thomas CD, Garcia G, Croisy A, Carrez D, Maillard P, Lupu M, Mispelter J. *PDT induced bystander effect on human xenografted colorectal tumors as evidenced by sodium MRI*. Photodiagnosis Photodyn Ther. **2012**; 9(4):303-309.
277. Procházková-Študentová H, Študent V. *Karcinom prostaty*. Postgrad Med. **2012**; 17(6):105-111.
278. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exp Cell Res. **2003**; 283(1):1-16.
279. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, Chandrashekar TK. *Porphyrins in photodynamic therapy – a search for ideal photosensitizers*. Curr Med Chem Anticancer Agents. **2002**; 2(2):187-207.
280. Qian J, Wang D, Cai F, Zhan Q, Wang Y, He S. *Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and in vivo functional imaging*. Biomaterials. **2012**; 33(19):4851-4860.
281. Quintela ML, Mateos LL, Estévez SV, Calvo OF, Herranz UA, Afonso FJ, Santomé L, Aparicio LA. *Enzalutamide: a new prostate cancer targeted therapy against the androgen receptor*. Cancer Treat Rev. **2015**; 41(3):247-253.
282. Raab O. *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*. Z Biol. **1900**; 39:524-546.
283. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. *Antimicrobial photodynamic therapy: an overview*. J Indian Soc Periodontol. **2011**; 15(4):323-327.
284. Rattanasirivilai A, Kurban A, Lenzy YM, Yaar R. *Cutaneous metastasis of prostatic adenocarcinoma: a cautionary tale*. J Cutan Pathol. **2011**; 38(6):521-524.
285. Reddi E. *Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours*. J Photochem Photobiol B. **1997**; 37(3):189-195.

286. Regehly M, Greish K, Rancan F, Maeda H, Böhm F, Röder B. *Water-soluble polymer conjugates of ZnPP for photodynamic tumor therapy*. *Bioconjug Chem*. **2007**; 18(2):494-499.
287. Rendon A, Weersink R, Lilge L. *Towards conformal light delivery using tailored cylindrical diffusers: attainable light dose distributions*. *Phys Med Biol*. **2006**; 51(23):5967-5975.
288. Retief FP, Cilliers L. *Breast cancer in antiquity*. *S Afr Med J*. **2011**; 101(8):513-515.
289. Richards GM, Mehta MP. *Motexafin gadolinium in the treatment of brain metastases*. *Expert Opin Pharmacother*. **2007**; 8(3):351-359.
290. Richter AM, Cerrutisola S, Sternberg ED, Dolphin D, Levy JG. *Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (H-3-Bpd-Ma), a new potent photosensitizer, in normal and tumor-bearing mice*. *J Photochem Photobiol B*. **1990**; 5(2):231-244.
291. Ris HB, Altermatt HJ, Inderbitzi R, Hess RA, Nachbur B, Stewart JC, Wang Q, Lim CK, Bonnett R, Berenbaum MC. *Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results*. *Br J Cancer*. **1991**; 64(6):1116-1120.
292. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. *Breast and prostate cancer: more similar than different*. *Nat Rev Cancer*. **2010**; 10(3):205-212.
293. Roche JVE, Whitehurst C, Watt P, Moore JV, Krasner N. *Photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumours: a new light delivery system*. *Lasers Med Sci*. **1998**; 13(2):137-142.
294. Ronn AM, Nouri M, Lofgren LA, Steinberg BM, Westerborn A, Windahl T, Shikowitz MJ, Abramson AL. *Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of temoporfin (Foscan<sup>®</sup>, mTHPC)*. *Lasers Med Sci*. **1996**; 11: 267-272.
295. Rosai J. *Breast*. In: Rosai J. *Ackerman's surgical pathology*. Vol. 2, 7<sup>th</sup> edition. St. Louis: C. V. Mosby, **1989**; 12411-1255. ISBN 978-0-8016-4176-3.
296. Rossi R, Lotti T, Cappugi P, Sala R, Calzavara-Pinton PG, Di Nuzzo S, Gifde P. *Guidelines for photodynamic therapy in dermatology*. *G Ital Dermatol Venereol*. **2005**; 140:637-644.
297. Rygaard J, Povlsen CO. *Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. **1969**; 77(4):758-760.
298. Rychtáriková R, Kuncová G. *Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy*. *Chem Listy*. **2009**; 103(10):800-813.
299. Sakamoto K, Ohno-Okumura E. *Syntheses and functional properties of phthalocyanines*. *Materials*. **2009**; 2(3):1127-1179.

300. Salvo N, Barnes E, van Draanen J, Stacey E, Mitera G, Breen D, Giotis A, Czarnota G, Pang J, De Angelis C. *Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review of the literature*. *Curr Oncol*. **2010**; 17(4):94-112.
301. Sandell JL, Zhu TC. *A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT*. *J Biophotonics*. **2011**; 4(11-12):773-787.
302. Santana SM, Liu H, Bander NH, Gleghorn JP, Kirby BJ. *Immunocapture of prostate cancer cells by use of anti-PSMA antibodies in microdevices*. *Biomed Microdevices*. **2012**; 14(2):401-407.
303. Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, Heitmann H, Ruck P, Hoffman RM, Fuchs J, Wessels JT. *In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma*. *Int J Oncol*. **2007**; 30(3):615-620.
304. Sharkey FE, Fogh J. *Metastasis of human tumors in athymic nude mice*. *Int J Cancer*. **1979**; 24(6):733-738.
305. Sharma R, Chandra M. *Cutaneous metastases from carcinoma of the prostate: a case report*. *Dermatol Online J*. **2005**; 11(1):24.
306. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. *Drug Discov Today*. **1999**; 4(11):507-517.
307. Sheng C, Pogue BW, Wang E, Hutchins JE, Hoopes PJ. *Assessment of photosensitizer dosimetry and tissue damage assay for photodynamic therapy in advanced-stage tumors*. *Photochem Photobiol*. **2004**; 79(6):520-525.
308. Shi MJ, Yang J, Meng XY, Li S, Liu T, Fang ZH, Cao R, Wang XH. *Comparison of functional outcomes after retropubic, laparoscopic and robot-assisted radical prostatectomy: a meta-analysis*. *World J Meta-Anal*. **2014**; 2(3): 107-126.
309. Shopova M, Woehrle D, Mantareva V, Mueller S. *Naphthalocyanine complexes as potential photosensitizers for photodynamic therapy of tumors*. *J Biomed Opt*. **1999**; 4(3):276-85.
310. Shore ND. *PROSTVAC targeted immunotherapy candidate for prostate cancer*. *Immunotherapy*. **2014**; 6(3):235-247.
311. Schalken JA, van Leenders G. *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology*. *Urology*. **2003**; 62(5):11-20.
312. Schlag PM, Liebeskind U, Bembenek A. *Nádory prsní žlázy*. In: Becker HD, Hohenberger W, Junginger T, Schlag PM. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada Publishing, **2005**; 115-164. ISBN 978-80-247-0720-9.
313. Schneble EJ, Berry JS, Trappey FA, Clifton GT, Ponniah S, Mittendorf E, Peoples GE. *The HER2 peptide nelipepimut-S (E75) vaccine (NeuVax™) in breast cancer*

- patients at risk for recurrence: correlation of immunologic data with clinical response.* Immunotherapy. **2014**; 6(5):519-531.
314. Schneider M, Anastasiadou L, Barinoff J, Khandan F, Thill M. *Einfluss des OncotypeDX-Tests auf die Therapieentscheidung beim frühen, Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom.* Senologie. **2014**; 11(2):A112M2-DA.
315. Schoenlaub P, Sarraux A, Grosshans E, Heid E, Cribier B. *Survival after cutaneous metastasis: a study of 200 cases.* Ann Dermatol Venereol. **2001**; 128(12):1310-1315.
316. Schröder FH, Hermanek P, Denis L, Fair WR, Gospodarowicz MK, Pavone-Macaluso M. *The TNM classification of prostate cancer.* Prostate Suppl. **1992**; 4: 129–138.
317. Schröder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, Kranse R. *Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer.* J Natl Cancer Inst. **1998**; 90(23):1817-1823.
318. Singh V, Saunders C, Wylie L, Bourke A. *New diagnostic techniques for breast cancer detection.* Future Oncol. **2008**; 4(4):501-513.
319. Skálová A, Michal M, Zámečník M, Kinkor Z. *Nádory prsu.* In: Oficiální stránka Registru nádorů prsu, Biopstická laboratoř [online]. **2012** [cit. 2. 6. 2014]. Dostupné z URL: <<http://www.mamma.cz>>.
320. Smalley PJ. *Laser safety: risks, hazards, and control measures.* Laser Ther. **2011**; 20(2):95-106.
321. Smith MR, Klotz L, van der Meulen E, Colli E, Tankó LB. *Gonadotropin-releasing hormone blockers and cardiovascular disease risk: analysis of prospective clinical trials of degarelix.* J Urol. **2011**; 186(5):1835-1842.
322. So-Rosillo R, Small EJ. *Sipuleucel-T (APC8015) for prostate cancer.* Expert Rev Anticancer Ther. **2006**; 6(9):1163-1167.
323. Sobin LH, Wittekind C, International Union Against Cancer (UICC). *TNM classification of malignant tumours, sixth edition.* New York: Wiley-Liss, **2002**. ISBN 978-0-471-22288-7.
324. Sogani PC, Israel A, Lieberman PH, Lesser ML, Whitmore WF Jr. *Gleason grading of prostate cancer: a predictor of survival.* Urology. **1985**; 25(3):223-227.
325. Souchon R, Wenz F, Sedlmayer F, Budach W, Dunst J, Feyer P, Haase W, Harms W, Sautter-Bihl ML, Sauer R. *DEGRO practice guidelines for palliative radiotherapy of metastatic breast cancer.* Strahlenther Onkol. **2009**; 185(7):417-424.

326. Stadlbauer V, Stiegler P, Müller S, Schweiger M, Sereingg M, Tscheliessnigg KH, Freidl W. *Attitude toward xenotransplantation of patients prior and after human organ transplantation*. Clin Transplant. **2011**; 25(3):495-503.
327. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. *Family history and the risk of prostate cancer*. Prostate. **1990**; 17(4):337-347.
328. Steiner R. *Laser-tissue interactions*. In: Raulin C, Karsai S. Laser and IPL technology in dermatology and aesthetic medicine. Heidelberg: Springer-Verlag, **2011**; 23-36. ISBN 978-3-642-03438-1.
329. Stephenson AJ, Eastham JA. *Role of salvage radical prostatectomy for recurrent prostate cancer after radiation therapy*. J Clin Oncol. **2005**; 23(32):8198-8203.
330. Stern SJ, Craig J, Flock S, Montague D, Waner M, Jacques S. *Tumor specific response to photodynamic therapy*. Lasers Surg Med. **1993**; 13(4):434-439.
331. Stewart F, Baas P, Star W. *What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)?* Radiother Oncol. **1998**; 48(3):233-248.
332. Strnad P. *Hormonální léčba a riziko karcinomu prsu*. Klimakt Med. **2006**; 11(3):5-11.
333. Strnad P. *Karcinom prsu*. Postgrad Med. **2001**; 6(3):668-682.
334. Strnad P. *Nádory prsu*. In: Šimša J. Sentinelová uzlina – lymfadenektomie u solidních nádorů. Praha: Maxdorf, **2010**; 142-163. ISBN 978-80-7345-213-1.
335. Strnad P. *Rizikové faktory karcinomu prsu*. In: Rob L, Martan A, Citterbart K. Gynekologie. Praha: Galén, **2008**; 251-267. ISBN 978-80-7262-501-7.
336. Succo G, Rosso S, Fadda GL, Fantini M, Crosetti E. *Salvage photodynamic therapy for recurrent nasopharyngeal carcinoma*. Photodiagnosis Photodyn Ther. **2014**; 11(2):63-70.
337. Sugden JK. *Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications*. Biotech Histochem. **2004**; 79(2):71-90.
338. Svanberg K, Bendsoe N, Axelsson J, Andersson-Engels S, Svanberg S. *Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination*. J Biomed Opt. **2010**; 15(4):041502.
339. Szeimies RM, Karrer S, Abels C, Steinbach P, Fickweiler S, Messmann H, Bäuml W, Landthaler M. *9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization*. J Photochem Photobiol B. **1996**; 34(1):67-72.
340. Šlampa P, Růžičková J, Ondrová B, Tichá H, Doleželová H. *Sole conformal perioperative interstitial brachytherapy of early stage breast carcinoma using high-*

- dose rate afterloading: longer-term results and toxicity. *Rep Prac Oncol Radiother.* **2008**; 13(2):62-68.
341. Šmucler R, Mazánek J. *Effect of the combination of laser excision and interstitial hyperthermia in palliative therapy of head and neck tumours in the advanced stage of the disease.* *Lasers Surg Med.* **2004**; 34(1):12-17.
342. Štefflová K, Chen J, Zheng G. *Using molecular beacons for cancer imaging and treatment.* *Front Biosci.* **2007**; 12(12):4709-4721.
343. Štukavec J, Ducháč V, Horák L, Poučková P. *Photodynamic therapy of human colorectal carcinoma cell line.* *Photomed Laser Surg.* **2009**; 27(1):107-110.
344. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ. *Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study.* *Clin Cancer Res.* **1998**; 4(11):2741-2746.
345. Taquet JP, Frochet C, Manneville V, Barberi-Heyob M. *Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy.* *Curr Med Chem.* **2007**; 14(15):1673-1687.
346. Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LH, Baptista MS. *New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma.* *Photomed Laser Surg.* **2006**; 24(4):528-531.
347. Tatar O, Kaiserling E, Adam A, Gelisken F, Shinoda K, Völker M, Lafaut BA, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S. *Consequences of verteporfin photodynamic therapy on choroidal neovascular membranes.* *Arch Ophthalmol.* **2006**; 124(6):815-823.
348. Taub AF. *A comparison of intense pulsed light, combination radiofrequency and intense pulsed light, and blue light in photodynamic therapy for acne vulgaris.* *J Drugs Dermatol.* **2007**; 6(10):1010-1016.
349. Tobisu K. *Clinical and pathological staging of prostate cancer.* *Nihon Rinsho.* **2005**; 63(2):225-230.
350. Tombal B. *New treatment paradigm for prostate cancer: abarelix initiation therapy for immediate testosterone suppression followed by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist.* *BJU Int.* **2012**; 109(6):E16.
351. Torchilin VP. *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.* *Nat Rev Drug Discov.* **2005**; 4(2):145-160.
352. Tran Cao HS, Kaushal S, Snyder CS, Ongkeko WM, Hoffman RM, Bouvet M. *Real-time imaging of tumor progression in a fluorescent orthotopic mouse model of thyroid cancer.* *Anticancer Res.* **2010**; 30(11):4415-4422.

353. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. *Photodynamic therapy in oncology*. *Oncologist*. **2006**; 11(9):1034-1044.
354. Trock BJ, Guo CC, Gonzalgo ML, Magheli A, Loeb S, Epstein JI. *Tertiary Gleason patterns and biochemical recurrence after prostatectomy: proposal for a modified Gleason scoring system*. *J Urol*. **2009**; 182(4):1364-1370.
355. Tykvart J, Navrátil V, Sedlák F, Corey E, Colombatti M, Fracasso G, Koukolík F, Bařinka C, Sáčha P, Konvalinka J. *Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA)*. *Prostate*. **2014**; 74(16):1674-1690.
356. ÚZIS ČR, NOR ČR (Vanková E, Zvolský M, Pařingerová R, Noland D, Typltová J). *Novotvary 2010*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, **2013**; 26-28. ISBN 978-80-7472-034-5.
357. Vakulovskaya EG, Shental VV, Kondratjeva TT. *Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of head and neck tumors with Photosense*. *Int. J Cancer*. **2002**; 13:262.
358. Van Goethem M, Schelfout K, Dijckmans L, Van Der Auwera JC, Weyler J, Verslegers I, Biltjes I, De Schepper A. *MR mammography in the pre-operative staging of breast cancer in patients with dense breast tissue: comparison with mammography and ultrasound*. *Eur Radiol*. **2004**; 14(5):809-816.
359. Van Zaane F, Subbaiyan D, van der Ploeg-van den Heuvel A, de Bruijn HS, Balbas EM, Pandraud G, Sterenborg HJ, French PJ, Robinson DJ. *A telemetric light delivery system for metronomic photodynamic therapy (mPDT) in rats*. *J Biophotonics*. **2010**; 3(5-6):347-355.
360. Vargas A, Eid M, Fanchaouy M, Gurny R, Delie F. *In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome*. *Eur J Pharm Biopharm*. **2008**; 69(1):43-53.
361. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrída S, Luini A, Galimberti V, Veronesi P, Intra M, Maisonneuve P, Zucca F, Gatti G, Mazzarol G, De Cicco C, Vezzoli D. *Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study*. *Ann Surg*. **2010**; 251(4):595-600.
362. Větvička D, Hovorka O, Kovář L, Řihová B. *Establishment of imageable model of T-cell lymphoma growing in syngenic mice*. *Anticancer Res*. **2009**; 29(11):4513-4517.

363. Vis AN, van der Sluis TM, Al-Itejawi HH, van Moorselaar RJ, Meuleman EJ. *Risk of disease flare with LHRH agonist therapy in men with prostate cancer: myth or fact?* Urol Oncol. **2015**; 33(1):7-15.
364. Von Tappeiner H, Jesionek H. *Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen.* Muench Med Wschr. **1903**; 50:2042-2044.
365. Wainwright M, Mohr H, Walker WH. *Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products.* J Photochem Photobiol B. **2007**; 86(1):45-58.
366. Wald M, Váchová H. *Lymfatické otoky a jejich léčba.* In: Kolář P. Rehabilitace v klinické praxi. Praha: Galén, **2009**; 597-600. ISBN 978-80-7262-657-1.
367. Warnat P, Eils R, Brors B. *Cross-platform analysis of cancer microarray data improves gene expression based classification of phenotypes.* BMC Bioinformatics. **2005**; 6:265.
368. Waser M, Falk H. *Towards second generation hypericin based photosensitizers for photodynamic therapy.* Curr Org Chem. **2007**; 11(6):547-558.
369. Weber A. *Legislativní normy pro práci s pokusnými zvířaty.* In: Baláž P., Mergental H. Transplantace v experimentu. Praha: Galén, **2006**; 63-66. ISBN 978-80-7262-366-4.
370. Welz S, Nyazi M, Belka C, Ganswindt U. *Surgery vs. radiotherapy in localized prostate cancer. Which is best?* Radiat Oncol. **2008**; 3:23-25.
371. Whitmore WF Jr. *Natural history and staging of prostate cancer.* Urol Clin North Am. **1984**; 11(2):205-220.
372. Winkelman JW. *The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat.* Cancer Res. **1962**; 22:589-596.
373. Winkelman JW, Collins GH. *Neurotoxicity of tetraphenylporphinesulfonate TPPS4 and its relation to photodynamic therapy.* Photochem Photobiol. **1987**; 46(5):801-807.
374. Wirtz DC, Wolff JM, Ittel TH, Jakse G, Niethard FU. *Ist die Skelettalkalische Phosphatase ein valider Stagingmarker zum Nachweis osteoblastischer Skelettmetastasen des Prostatakarzinoms?* Z Orthop Ihre Grenzgeb. **1998**; 136(3):255-259.
375. Wollin M, Fitzgerald TJ, Santucci MA, Menon M, Longcope C, Reale F, Carlson J, Sakakeeny MA, Greenberger JS. *Radiosensitivity of human prostate cancer and malignant melanoma cell lines.* Radiother Oncol. **1989**; 15(3):285-293.
376. Wong CY, Helm MA, Helm TN, Zeitouni N. *Patterns of skin metastases: a review of 25 years' experience at a single cancer center.* Int J Dermatol. **2014**; 53(1):56-60.
377. Woodburn K, Sykes E, Kessel D. *Interactions of Solutol HS 15 and Cremophor EL with plasma lipoproteins.* Int J Biochem Cell Biol. **1995**; 27(7):693-699.



378. Woodburn KW, Fan Q, Kessel D, Luo Y, Young SW. *Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin*. *J Invest Dermatol*. **1998**; 110(5):746-751.
379. Woods VD, Montgomery SB, Belliard JC, Ramírez-Johnson J, Wilson CM. *Culture, black men, and prostate cancer: what is reality?* *Cancer Control*. **2004**; 11(6):388-396.
380. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW, Hankin J, Teh CZ, Dreon DM, Paffenbarger RS Jr. *Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **1995**; 4(7):735-741.
381. Wu J. *Statistical inference for tumor growth inhibition T/C ratio*. *J Biopharm Stat*. **2010**; 20(5):954-964.
382. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. *The role of autophagy in cancer: therapeutic implications*. *Mol Cancer Ther*. **2011**; 10(9):1533-1541.
383. Yoo JO, Ha KS. *New insights into the mechanisms for photodynamic therapy – induced cancer cell death*. *Int Rev Cell Mol Biol*. **2012**; 295:139-174.
384. Yslas EI, Durantini EN, Rivarola VA. *Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro*. *Bioorg Med Chem*. **2007**; 15(13):4651-4660.
385. Zeichner SB. *The failed Theratope vaccine: 10 years later*. *J Am Osteopath Assoc*. **2012**; 112(8):482-483.
386. Zhang Q, Fan H, Shen J, Hoffman RM, Xing HR. *Human breast cancer cell lines co-express neuronal, epithelial, and melanocytic differentiation markers in vitro and in vivo*. *PLoS One*. **2010**; 5(3):e9712.
387. Zhang X, Liu T, Li Z, Zhang X. *Progress of photodynamic therapy applications in the treatment of musculoskeletal sarcoma (review)*. *Oncol Lett*. **2014**; 8(4):1403-1408.
388. Zhang YY, Hu B, Chen L. *Imaging fusion in the diagnosis of prostate cancer*. *Zhonghua Nan Ke Xue*. **2015**; 21(1):78-81.
389. Zimčík P, Miletín M. *Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. I. Historie, základní princip*. *Ceska Slov Farm*. **2004**; 53:219-224.
390. Zoepf T, Jakobs R, Arnold JC, Apel D, Riemann JF. *Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy*. *Am J Gastroenterol*. **2005**; 100(11):2426-2430.
391. Zong WX, Thompson CB. *Necrotic death as a cell fate*. *Genes Dev*. **2006**; 20(1):1-15.

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### Obrázky

Obrázek 1. Gleasonův grade – 5 stupňů diferenciacie karcinomu prostaty .....	40
Obrázek 2. Exulcerovaný uzlovitý metastatický karcinom prsu .....	55
Obrázek 3. Infiltrativně rostoucí kožní metastáza karcinomu prsu (HE 100×).....	56
Obrázek 4. Papulonodulární metastázy karcinomu prostaty .....	58
Obrázek 5. Kožní metastáza adenokarcinomu prostaty ze žlázových lalůček (HE 140×).....	58
Obrázek 6. Postavení PDT v rámci metod onkologické terapie.....	59
Obrázek 7. Zjednodušené schéma fungování PDT .....	62
Obrázek 8. Fotofyzikální mechanismy navozené PDT .....	63
Obrázek 9. Protoporfyrin IX a hematoporfyrin .....	69
Obrázek 10. Verteporfin, ALA a temoporfin .....	71
Obrázek 11. Ftalocyaniny a naftalocyaniny .....	74
Obrázek 12. Propagace a tkáňová interakce světla o různých vlnových délkách .....	79
Obrázek 13. Nu/nu myš s narostlým xenoštěpem karcinomu prsu na počátku experimentu ...	93
Obrázek 14. Ftalocyanin hydroxyhlinitý .....	94
Obrázek 15. Poloprůmyslový mikrofluidizér M-110L.....	95
Obrázek 16. Xenonová lampa onkolight 051 použitá v experimentu .....	96
Obrázek 17. Působení ftalocyaninového gelu – okluzivní obvaz.....	98
Obrázek 18. Fluorescence tumoru v UV světle.....	98
Obrázek 19. Měření plochy nekrotického tumoru.....	99
Obrázek 20. Nekropsie myši s odběrem vzorků na histologické vyšetření.....	101
Obrázek 21. Experimentální PDT xenotransplantovaného lidského karcinomu prsu.....	105
Obrázek 22. Výsledek úspěšné PDT karcinomu prsu – klidná kožní jizva (30. den) .....	105
Obrázek 23. Čerstvá jizevnatá tkáň po PDT (HE 100×) .....	106
Obrázek 24. Neúspěšná PDT – ulcerovaný tumor prostaty s centrální nekrózou (30. den)...	106
Obrázek 25. Tumorozní nekrotická masa po neúspěšné PDT karcinomu prsu (HE 100×) ...	107

### Tabulky

Tabulka 1. Základní rizikové faktory karcinomu prsu .....	11
Tabulka 2. Charakteristiky DCIS a LCIS .....	13
Tabulka 3. Histopatologická variace invazivního karcinomu prsu .....	14
Tabulka 4. Klinická TNM klasifikace karcinomu prsu .....	20
Tabulka 5. Klinická stadia karcinomu prsu (včetně průměrného přežití) .....	21

Tabulka 6. Základní prognostické a prediktivní faktory u pacientek s karcinomem prsu.....	22
Tabulka 7. Histopatologická variace karcinomu prostaty .....	38
Tabulka 8. Klinická TNM klasifikace karcinomu prostaty .....	43
Tabulka 9. Klinická stadia karcinomu prostaty (včetně průměrného přežití) .....	45
Tabulka 10. Rizikové skupiny pacientů s karcinomem prostaty .....	46
Tabulka 11. Poločasy života volných radikálů – ROS .....	64
Tabulka 12. Dělení fotosenzitizérů.....	70
Tabulka 13. Fyzikální veličiny záření – parametry světelného zdroje .....	81
Tabulka 14. Experimentální skupiny – uspořádání pokusu.....	97
Tabulka 15. Výsledky PDT v experimentu .....	115
Tabulka 16. Optimální aplikační schéma pro lokotopické použití AIOH-Pc gelu.....	120

## **Grafy**

Graf 1. Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na karcinom prsu u žen v ČR.....	7
Graf 2. Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na karcinom prostaty u mužů v ČR ....	34
Graf 3. Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie MDA-MB-231 .....	103
Graf 4. Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie LNCaP.....	103
Graf 5. Homogenní rozptyl výchozích objemů tumorů linie PC-3 .....	103
Graf 6. Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie MDA-MB-231 .....	108
Graf 7. Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie LNCaP .....	109
Graf 8. Účinnost jednotlivých koncentrací AIOH-Pc gelu v PDT linie PC-3.....	110
Graf 9. Účinnost různých typů fotosenzitizérů v PDT linie MDA-MB-231 .....	111
Graf 10. Celkové zpomalení nádorového růstu po PDT v experimentu .....	113

## 10 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### Publikace – články

1. **Sutoris K**, Větvička D, Horák L, Beneš J, Nekvasil M, Ježek P, Zadinová M, Poučková P. *Evaluation of topical photodynamic therapy of mammary carcinoma with experimental gel containing liposomal hydroxyl-aluminium phthalocyanine*. Anticancer Res. **2012**; 32(9):3769-3774. **IF 1,713**
2. **Sutoris K**, Rakušan J, Karásková M, Mattová J, Beneš J, Nekvasil M, Ježek P, Zadinová M, Poučková P, Větvička D. *Novel topical photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes*. Anticancer Res. **2013**; 33(4):1563-1568. **IF 1,872**
3. **Sutoris K**. *Photodynamic therapy of a human breast carcinoma cell line – new experience*. Folia Medica Cassoviensia. **2009**; 64(1):438.
4. **Sutoris K**. *A new liposomal product containing phthalocyanine for topical application of malignant tumour*. Čes-slov Derm. **2009**; 84(4):221.
5. **Sutoris K**, Mráček M, Rohan Z, Bergmann P, Šimša J. *Ileocékálna aktinomykóza – kazuistika*. Rozhl Chir. **2013**; 92(7):395-399.
6. Levý M, Herdegen P, **Sutoris K**, Šimša J. *Divertikulární choroba tračníku – chirurgická léčba (Postgraduální vzdělávání)*. Rozhl Chir. **2013**; 92(7):408-413.

### Publikace – kapitoly v knize

1. **Sutoris K**. *Onemocnění sleziny*. In: Šimša J. Lexikon operačních výkonů. Praha: Maxdorf, **2015**; titul v přípravě.

### Přednášky

1. **Sutoris K**. *Photodynamic therapy of a human breast carcinoma cell line – new experience*. 1<sup>st</sup> International Student Medical Congress in Košice, Košice, Slovensko, 23. 6. **2009**.
2. **Sutoris K**, Herdegen P. *Perforovaná divertikulitida sigmatu – současné možnosti léčby*. Pracovní den Koloproktologické sekce ČCHS ČLS JEP, Praha, 7. 2. **2013**.
3. **Sutoris K**. *Fotodynamická terapia versus karcinóm prsníka – naše preklinické skúsenosti*. Oddelenský seminár s diskusiou – Chirurgické oddelenie NÚTPCHaHCH vo Vyšných Hágoch, Vysoké Tatry, Slovensko, 10. 8. **2009**.
4. **Sutoris K**, Šmejkal P. *Cholecystektomie – co nového?* Odborný nemocniční seminář pro lékaře – Nemocnice Říčany, Říčany, 18. 3. **2013**.

5. Šmejkal P, **Sutoris K**. *Benigní onemocnění jícnu*. Odborný nemocniční seminář pro lékaře – Nemocnice Říčany, Říčany, 18. 3. **2013**.
6. **Sutoris K**. *Mimicking the tumor of the small intestine*. Open Medical Institute Seminar – Trauma & Emergency Surgery, Salzburg, Rakousko, 13. 1. **2015**.

#### **Postery**

1. **Sutoris K**, Horák L, Zadinová M, Ježek P, Nekvasil M, Rakušan J, Karásková M, Hloušková D, Bennett RJ, Poučková P. *A new liposomal product containing phthalocyanine for topical application of malignant tumour PDT*. 10<sup>th</sup> International Congress of Dermatology in Prague, Praha, 20.–24. 5. **2009**.
2. **Sutoris K**, Prochoda V, Rosová B, Levý M, Šimša J. *Solitary fibrous tumor of the greater omentum – a rare experience*. 24<sup>th</sup> World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists in Vienna, Vídeň, Rakousko, 5.–7 . 12. **2014**.