

M. Babjuk^{1,2}, H. Stepp², M. Jirsa³,
A. Hofstetter², J. Dvořáček¹

¹Urologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice a
1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Katedra urologie
IPVZ, Praha, ČR

přednosta: Prof. MUDr. Jan Dvořáček, DrSc.

²Laserforschungslabor an der Urologischen Klinik,
Klinikum Grosshadern, LMU, München, SRN

přednosta: Prof. Dr.med. Alfons Hofstetter

³1. Interní klinika Všeobecné fakultní nemocnice a

1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha, ČR

přednosta: Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

HODNOCENÍ FOTODYNAMICKÉHO ÚČINKU SYNTETICKÉHO PORFYRINU TPPS₄ [MESO- TETRA (4-SULFONATOPHENYL) PORPHINE] NA BUŇKY LIDSKÉHO NÁDORU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE IN VITRO

KLÍČOVÁ SLOVA:

Fotodynamická terapie
TPPS₄
Nádory močového měchýře
Buněčné linie J82 a UROtsa

SOUHRN:

Princip fotodynamické terapie (PDT) spočívá v interakci mezi světlem určité vlnové délky a molekulou fotosenzibilizující látky, selektivně vychytávanou nádorovými buňkami. Výsledkem této interakce je tvorba singletního kyslíku a jiných toxických radikálů, které způsobují destrukci nádorových buněk. Zásadní roli hraje volba optimálního fotosenzibilizátoru. V naší práci hodnotíme fototoxický účinek syntetického porfyriu TPPS₄ [meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine] na buňky lidského uroteliálního nádoru (J82) a na benigní uroteliální buňky (UROtsa) in vitro. Fototoxicita stoupala u buněk J82 se zvyšující se koncentrací TPPS₄ až do 50 µg/ml, přičemž inkubace s 50 µg/ml TPPS₄ následovaná ozářením dávkou 100 J/cm² měla za následek redukci počtu živých buněk na 6 % hodnoty kontroly. Nejvyššího účinku PDT bylo dosaženo ozářením vlnovou délkou 645 nm, která byla při dávce záření 50 J/cm² o 36 % účinnější (P < 0,001) než 635 nm a o 32 % než 655 nm (P < 0,001). Při použití koncentrace TPPS₄ 50 µg/ml a dávky záření 50 J/cm² byla PDT o 33,9 % účinnější u maligních buněk J82 než u benigních buněk UROtsa (P < 0,001).

KEY WORDS:

Photodynamic therapy
TPPS₄
Bladder tumours
Cell lines J82 and UROtsa

SUMMARY:

EVALUATION OF PHOTODYNAMIC EFFECT OF SYNTHETIC PORPHINE TPPS₄
[MESO-TETRA (4-SULFONATOPHENYL) PORPHINE] ON THE HUMAN BLADDER
TUMOUR CELLS IN VITRO

The principle of photodynamic therapy (PDT) is an interaction between the light of certain wave length and the molecule of the photosensibilizing substance which is selectively uptaken by tumour cells. The result of this interaction are singlet oxygen and other toxic radicals causing destruction of tumour cells. Choice of optimal photosensibilizing substance plays the basic role. In vitro phototoxic effect of synthetic porphine TPPS₄ [meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine] on the human urothelial tumour cells (J82) and benign urothelial cells (UROtsa) is evaluated in our study. Reduction of number of living cells to 6% of control value was a result of the incubation with 50mg/ml of TPPS₄ followed by irradiation dose 100 J/cm² and the higher concentration of TPPS₄ up to 50mg/ml, the higher phototoxicity on J82 cells. The best effect of PDT was obtained by irradiation of 645 nm wave length, which was with dose of 50mg/ml 36% more effective (P<0,001) than 635 nm and 32% more effective than 655 nm (P<0,001). PDT using TPPS₄ concentration 50mg/ml and irradiation dose 50 J/cm² was 33,9% more effective on malignant cells J82 than on benign cells UROtsa (P<0,001).

ÚVOD:

Cílem onkologické léčby je toxické poškození nádorových buněk při současném minimálním poškození zdravých tkání. Nedostatečná selektivita standardních druhů léčby, chemoterapie a aktinoterapie, nás často nutí k redukci dávek, což má za následek snížení protinádorového účinku. Jednou z metod, která slibuje větší selektivitu účinku a která si postupně hledá cestu do rutinní praxe, je fotodynamická terapie (PDT). Princip spočívá v interakci mezi světlem určité vlnové délky a molekulou fotosenzibilizující látky selektivně vychytávanou nádorovými buňkami. Výsledkem této interakce je tvorba singletního kyslíku a jiných toxických radikálů, které způsobují destrukci nádorových buněk [1].

Fotodynamická terapie je zatím metodou experimentální s řadou nedorozuměných problémů. Jedním z nich je identifikace optimálního fotosenzibilizátoru. Taková látka musí být sama o sobě netoxická, musí být selektivně vychytávána nádorovými buňkami a po ozáření světlem způsobovat dostatečný toxický efekt. K těmto zásadním požadavkům přistupují i další, mezi které patří v neposlední řadě i snadná příprava a finanční dostupnost.

V experimentech i klinické praxi je v současné době k PDT používán převážně preparát Photofrin IIR (Johnson and Johnson, USA). Jedná se o směs derivátů hematoporfyrinu získaných izolací z biologických materiálů. Nevýhodou tohoto preparátu je nepřesně definovaná chemická struktura, vysoká cena a hlavně neúplná selektivita jeho akumulace v nádorové tkáni [2].

Meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine (TPPS₄) je syntetický porfyrin, jehož využití k PDT bylo poprvé uvažováno Winkelmanem již v roce 1962 [3]. Jde o látku, kterou lze vyrobit synteticky v libovolném množství s podstatně menšími finančními náklady, než jsou nutné k přípravě Photofrinu IIR [1]. Výhodou TPPS₄ je jeho chemicky přesně definovaná struktura a výborná rozpustnost ve vodě teoreticky umožňující parenterální aplikaci. Winkelman ve své práci prokázal vysokou koncentraci této látky v tkáni tumoru u krys s Walkerovým sarkomem [3], přičemž tyto nadějně výsledky byly později potvrzeny i jinými autory [4, 5]. Rozpaky přinesly práce poukazující na možnou neurotoxicitu TPPS₄, které vedly ke snížení zájmu o jeho studium [6, 7]. V naší studii jsme použili TPPS₄ připravovaný postupem dle Busbyho [8], ovšem v modifikaci popsanou Jirsou a Kakáčem [9]. Tato modifikace je na rozdíl od klasického postupu na závěr doplněna o chromatografii na Sephadexu, což umožňuje dosažení větší čistoty výsledné substance. S tímto čistěným preparátem byly provedeny toxikologické studie, které prokázaly minimální neurotoxicitu [10]. Vzhledem k těmto skutečnostem a k příznivým výsledkům PDT pomocí TPPS₄ u kožních malignit [11] se domníváme, že je třeba této substanci nadále věnovat pozornost.

V naší práci jsme použili *in vitro* model umožňující studium PDT u buněk uroteliálního nádoru močového měchýře za přesně definovaných a reprodukovatelných podmínek. Cílem bylo posoudit toxicitu samotné substance, stanovit nejúčinnější koncentraci TPPS₄, vlnovou délku a dávku použitého záření při PDT a v neposlední řadě zhodnotit rozdíl účinku PDT na maligní a benigní buněčnou linii.

METODIKA:

Buněčné linie a příprava experimentu

Ke studiu účinku syntetického porfyriu TPPS₄ jsme zvolili dvě lidské buněčné linie. Zatímco buněčná linie J82 byla odvozena od

špatně diferencovaného uroteliálního nádoru [12], byly buňky UROtsa připraveny z normální uroteliální výstelky lidského ureteru a svými vlastnostmi se proto blíží benigní tkáni [13]. Jako kulturační médium jsme u obou buněčných kmenů použili roztok RPMI 1640 bez fenolové červeně (Biochrom, Berlin, BRD), který byl obohacen tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem (50 ml do 500 ml média), 1 mM pyruvátu sodného, 4 mM L-glutaminu, 100 µg/ml streptomycinu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 0,25 µg/ml amphotericinu B (vše Gibco/BRL, Eggenstein, BRD).

Buňky byly během experimentu uchovávány v inkubátoru v atmosféře vzniklé kombinací CO₂ a vzduchu v poměru 5 %/95 %, při teplotě 37 °C a téměř 100% vlhkosti.

K pokusům jsme použili mikrotitrační destičky s 96 jamkami (Microtiterplate). Buňky byly pipetovány do příslušných jamek destičky tak, aby v každé jamce bylo na počátku experimentu 10.000 živých buněk. Po přidání média do každé jamky jsme umístili destičku na 24 hodin do inkubátoru. Po skončení tohoto intervalu, který umožnil buňkám adherovat ke spodině, byly ploténky připraveny k zahájení experimentu.

Příprava roztoku TPPS₄ a provedení inkubace

K přípravě TPPS₄ byl použit postup dle Busbyho [8], ovšem v modifikaci popsanou Jirsou a Kakáčem [9]. K experimentům byl TPPS₄ rozpuštěn přímo v kulturačním médiu. Takto připravený základní roztok o vysoké koncentraci byl rozdělen na menší části a uskladněn v tmavém prostředí při -20 °C. Jeho jednotlivé části byly rozmrazeny těsně před zahájením každého pokusu a zředěny médiem na příslušnou koncentraci.

Inkubaci s TPPS₄ jsme zahájili 24 hodin po umístění buněk do příslušných jamek destičky. Odsáli jsme stávající médium tak, aby nebyla poškozena buněčná vrstva na spodině, a okamžitě pipetovali 100 µl média s příslušnou koncentrací TPPS₄. Destičky byly na dobu inkubace umístěny zpět do inkubátoru.

Ozáření

Jako zdroj laserových paprsků byl použit argonovým laserem stimulovaný barvivový laser (Ag-dye laser - Lambda Plus, Coherent, Dieburg, SRN) emitující paprsky o volitelné vlnové délce v oblasti 610 až 675 nm. Vlastní ozáření buněčných linií rostoucích v jamkách mikrotitrační destičky proběhlo ve speciálním ozařovací boxu vytvořeném k těmto účelům ve výzkumném centru Urologické kliniky LMU v Mnichově [14]. Pro všechny pokusy jsme zvolili konstantní hustotu výkonu 80 mW/cm², vlnovou délku a dávku záření jsme měnili dle typu experimentu.

Na dobu ozařování bylo kulturační médium v jamkách obsahujících buňky nahrazeno Hankovým pufrům, který je bezbarvý, fotodynamicky inertní a nebrání tak průniku laserových paprsků.

Po ukončení inkubace jsme odsáli médium s TPPS₄, buňky dvakrát promyli Hankovým pufrům a ihned zahájili ozařování. Po vyjmutí ploténky z ozařovacího boxu jsme pufr odsáli a do každé jamky obsahující buňky pipetovali přesně 200 µl kulturačního média (tento objem je nutný pro následné provedení MTT testu).

V pokusech, kdy jsme hodnotili toxický efekt TPPS₄ bez následného ozáření (tzv. „dark toxicity“), jsme odsáli po ukončení inkubace médium s TPPS₄, jamky obsahující buňky propláchli médiem a do každé z nich pipetovali přesně 200 µl kulturačního média.

Vyhodnocení výsledku, MTT esej

K posouzení fototoxického účinku, respektive toxického účinku samotného TPPS₄ nebo samotného záření, byla použita kolorimetrická MTT esej [15]. Princip metody spočívá v enzymatické redukci 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromidu (MTT, Sigma, Deisenhofen, SRN), který je ve vodě rozpustný, na nerozpustný a tmavě fialově zbarvený farmazan. Tato reakce vzniká působením mitochondriálních dehydrogenáz a dochází k ní pouze v žijících, metabolicky aktivních buňkách. Intenzita fialového zbarvení je přímo úměrná počtu živých buněk a její hodnota je objektivizována stanovením absorpce ve vlnové délce 540 nm (měřeno pomocí „Emax microplate reader“, Molecular Devices, Menlo Park, USA).

Vitalitu buněk jsme hodnotili 24 hodin po ozáření (u fototoxických experimentů) nebo 24 hodin po ukončení inkubace u pokusů hodnotících toxicitu samotného TPPS₄.

Vyjádření výsledku fototoxických experimentů

Vzhledem k tomu, že ozařovací box je schopen současně ozářit 6 jamek destičky, je možné na jedné destičce volit 6 situací, z nichž každá je 6krát opakována. Čtyři pole po 6 jamkách představují různé srovnávané experimentální podmínky, například různé koncentrace hodnoceného fotosenzibilizátoru, různé dávky záření a podobně. Další 6 jamek slouží jako kontrola (buňky inkubované s TPPS₄, ale neozařované) a posledních 6 jako slepé pole (neléčené buňky v kultivačním médiu, ke kterým bylo přidáno MTT těsně před měřením). Optická hustota (tedy výše absorpce) každé jamky s experimentální situací (OH_{exp}) je vyjádřena ve vztahu k optické hustotě kontroly (OH_{kontr}). Při každém měření je odečtena absorpce pozadí (OH_{poz}) způsobená buněčným materiálem a přidávanými substancemi, k čemuž slouží již dříve zmíněné slepé pole.

Průměrná optická hustota ze šesti měření v každém experimentálním poli odpovídá mitochondriální aktivitě a vitalitě buněk a je vyjádřena v procentech optické hustoty kontroly:

$$OH (\%) = \frac{OH_{exp} - OH_{poz}}{OH_{kontr} - OH_{poz}} \times 100.$$

Cíl práce a hodnocené parametry

Hlavním cílem práce bylo definovat situaci, při které dosahuje fotodynamická terapie pomocí TPPS₄ nejlepších výsledků. Postupně jsme proto měnili jednotlivé sledované parametry tak, abychom našli nejúčinnější vlnovou délku laserových paprsků, nejúčinnější dávku záření, optimální koncentraci TPPS₄ a optimální délku inkubace s touto substancí.

Srovnání fototoxického účinku na maligní (J82) a benigní (UROtsa) buněčnou linii bylo hodnoceno při různých koncentracích TPPS₄ (10 - 75 µg/ml) a stoupající dávce záření (15 - 100 J/cm²). V těchto experimentech byla zvolena konstantní a nejúčinnější vlnová délka (645 nm) a doba inkubace s TPPS₄ (18 hodin).

Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků

Každý jednotlivý experiment byl opakován nejméně dvakrát a prezentované výsledky jsou tedy výsledné hodnoty nejméně dvou nezávislých experimentů (každý v 6 kopiích).

Statistická významnost rozdílu výsledných optických hustot v jednotlivých experimentech byla hodnocena pomocí Kruskalova - Wallisova H testu (SPSS 8.0, SPSS, Chicago, I11). v situacích, kdy bylo třeba srovnat výsledky více než dvou experimentů. K porovnání výsledků u dvou rozdílně léčených buněčných kultur byl použit Mann - Whitney U test ze stejného souboru. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hodnotách $P < 0,05$.

VÝSLEDKY:

Toxicita TPPS₄ bez následného ozáření (tzv. „dark toxicity“)

K posouzení toxicity TPPS₄ bez následné expozice světla jsme hodnotili procentuální přežití buněk UROtsa i J82 inkubovaných 18 hodin se stoupajícími koncentracemi TPPS₄. Ani u jedné buněčné linie jsme nezaznamenali signifikantní toxicitu v koncentracích používaných k fototoxickým experimentům (obr. 1). V případě kmene J82 byla LD10 (koncentrace vedoucí k usmrcení 10 % buněk) dosažena při koncentraci 136 µg/ml a i maximální koncentrace 2 000 µg/ml redukovala počet živých buněk pouze na 55 % hodnoty kontroly.

Hodnoty LD10 pro UROtsa buňky bylo dosaženo při koncentraci 306 µg/ml a maximální koncentrace vedla k redukci mitochondriální aktivity na 24 % kontroly.

Toxický účinek samotného světla

K vyloučení toxického účinku samotného laseru jsme hodnotili vitalitu buněk 24 hodin po ozáření dávkami použitými při fototoxických experimentech (15, 25, 50 a 100 J/cm²) při vlnové délce 645 nm bez předchozí inkubace s TPPS₄. U žádného z buněčných kmenů jsme nezaznamenali toxický účinek samotného záření (konkrétní data nejsou uvedena).

Optimální vlnová délka

K definici optimální vlnové délky jsme použili buňky J82, které jsme inkubovali 18 hodin s TPPS₄ v koncentraci 50 µg/ml a následně ozařovali barvivovým laserem při vlnových délkách mezi 625 a 665 nm.

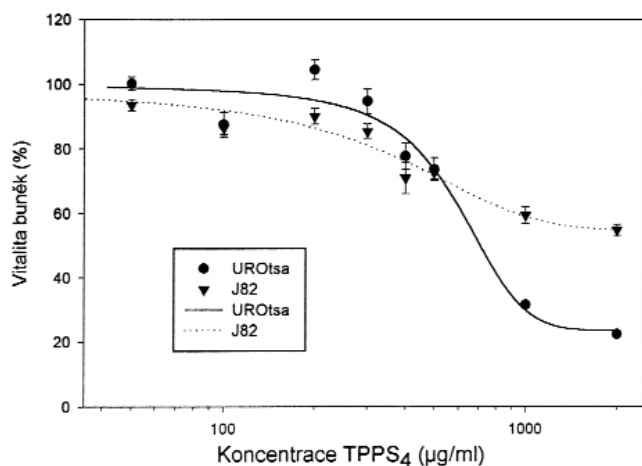
Na základě hodnocení pomocí MTT esej 24 hodin po ukončení ozáření bylo dosaženo nejvyšší fototoxicity účinkem iradiace ve vlnové délce 645 nm. Vlnová délka 645 nm byla při dávce záření 50 J/cm² o 36 % účinnější ($P < 0,001$) než 635 nm a o 32 % než 655 nm ($P < 0,001$) (obr. 2).

Závislost fototoxického účinku na koncentraci TPPS₄

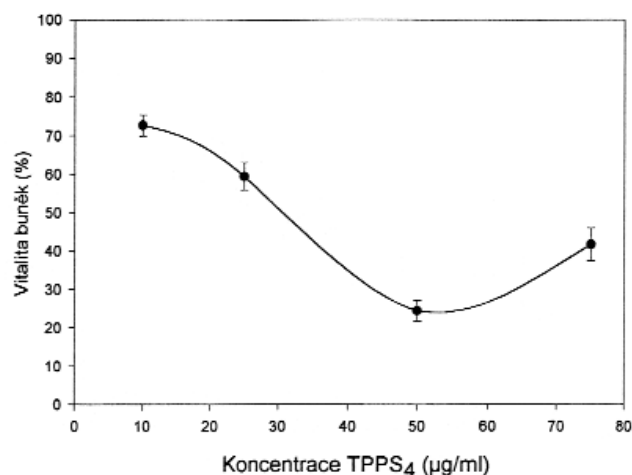
K rozpoznání závislosti koncentrace TPPS₄ a intenzity výsledného fototoxického účinku jsme inkubovali buňky J82 po dobu 18 hodin postupně s 10, 25, 50 a 75 µg/ml TPPS₄. Po ukončení inkubace byly buňky ozařovány dávkami 15-100 J/cm² při vlnové délce 645 nm.

Fotodynamická účinnost stoupala se zvyšující se koncentrací TPPS₄ až do 50 µg/ml (obr. 3, 4). Další zvýšení koncentrace na 75 µg/ml vedlo dokonce ke snížení efektivity. Koncentrace 50 µg/ml byla při ozáření 50 J/cm² o 35 % účinnější než 25 µg/ml ($P < 0,001$) a o 48 % než 10 µg/ml ($P < 0,001$) (obr. 4).

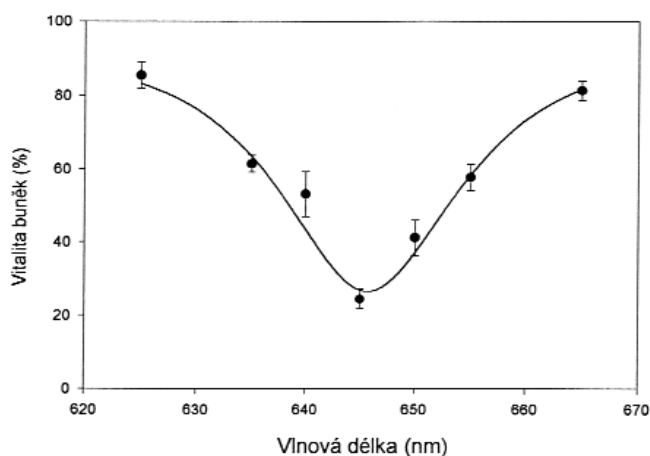
K redukci počtu živých buněk pod 50 % kontroly bylo nutné použít koncentraci 50 µg/ml a ozáření dávkou 25 J/cm², zatímco při nižší koncentraci 25 µg/ml musela k dosažení stejného účinku



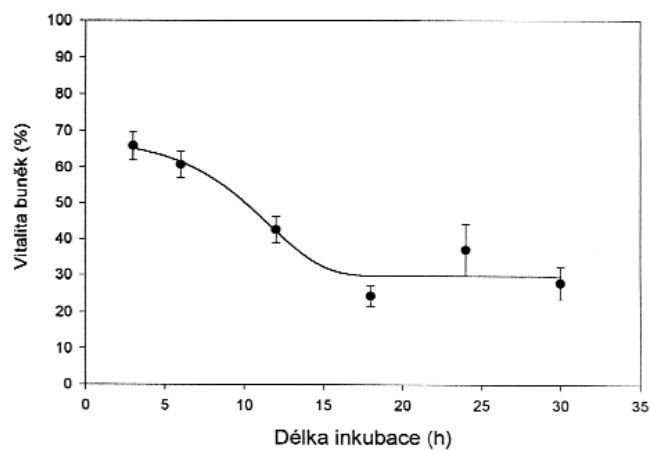
Obr. 1: Toxicita TPPS₄ bez následného ozáření. Linie jsou matematicky odvozeny z hodnot jednotlivých měření dle vzorce $f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$.



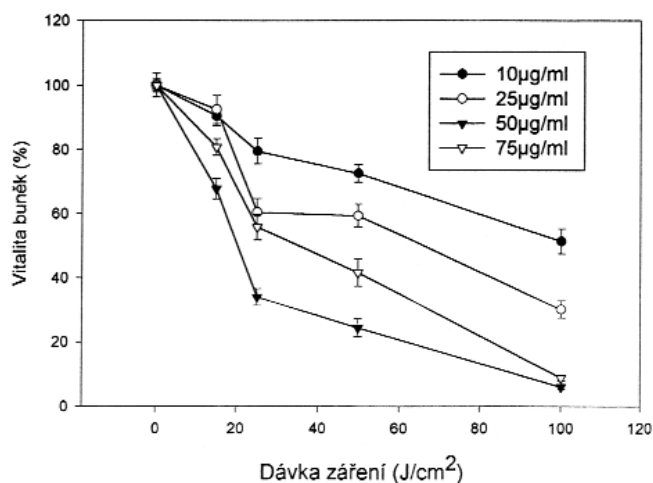
Obr. 4: Vitalita buněk J82 v závislosti na koncentraci TPPS₄ při ozáření dávkou 50 J/cm².



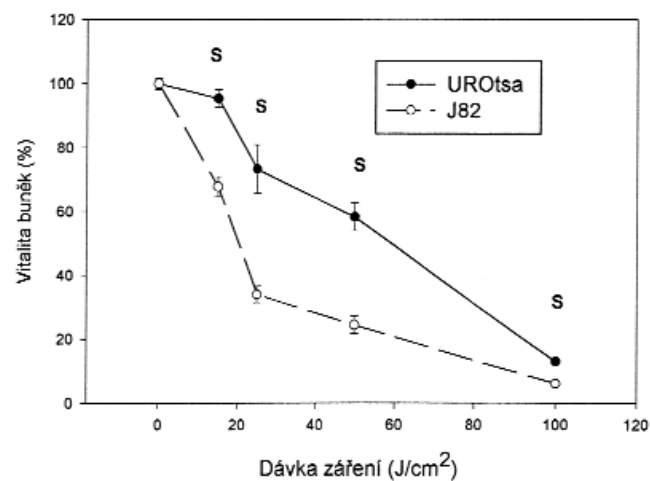
Obr. 2: Vitalita buněk J82 v závislosti na vlnové délce použitého světla. Plná čára je matematicky odvozena dle Voigtova vzorce a vychází z hodnot jednotlivých měření.



Obr. 5: Vitalita buněk J82 v závislosti na délce inkubace s 50 µg/ml TPPS₄ při dávce záření 50 J/cm². Plná čára je matematicky odvozená dle vzorce $(f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))^c)$.



Obr. 3: Vitalita buněk J82 v závislosti na koncentraci TPPS₄ a dávce záření.



Obr. 6: Srovnání mitochondriální aktivity buněk J82 a UROtsa inkubovaných s 50 µg/ml TPPS₄ a ozářených barvivovým laserem v dávce 15-100 J/cm². S = signifikantní rozdíl.

následovat maximální dávka záření 100 J/cm². Inkubace s TPPS₄ o koncentraci 50 µg/ml následovaná ozářením dávkou 100 J/cm² měla za následek redukcí počtu živých buněk J82 na 6 % hodnoty kontroly.

Závislost fototoxického účinku na dávce záření

Zvýšení dávky záření vedlo k téměř lineárnímu vzestupu fototoxického účinku při všech použitých koncentracích TPPS₄ (obr. 3). Ozáření dávkou 100 J/cm² po předchozí inkubaci s 50 µg/ml TPPS₄ bylo o 62 % účinnější než ozáření 15 J/cm² (P < 0,001) a o 18 % účinnější než ozáření 50 J/cm² (P < 0,001).

Závislost fototoxického účinku na délce inkubace

Buňky byly proto před ozářením inkubovány po dobu 3 až 30 hodin s TPPS₄. V těchto experimentech jsme zvolili konstatní koncentraci 50 µg/ml TPPS₄ a vlnovou délku ozáření 645 nm. Výsledky byly hodnoceny na základě MTT eseje provedené 24 hodin po ukončení iradiace. Prodlužující se inkubace vedla až do 18 hodin k zvýšení fototoxického poškození, zatímco její další prodloužení nemá za následek další vzestup fototoxicity. Například při dávce záření 50 J/cm² byla osmnáctihodinová inkubace signifikantně účinnější než dvanáctihodinová (P = 0,002). Její prodloužení na 24 hodin (P = 0,156) a na 30 hodin (P = 0,579) již nevedlo k signifikantnímu zvýšení účinku (obr. 5).

Srovnání fototoxického účinku na nádorové (J82) a benigní (UROtsa) buňky

Obrázek číslo 6 ukazuje srovnání fototoxického účinku ozáření laserovým světlem vlnové délky 645 nm po předchozí inkubaci s 50 µg/ml TPPS₄. Při použití dávky záření 50 J/cm² byla PDT o 33,9 % účinnější u maligních buněk J82 než u benigních buněk UROtsa (P < 0,001).

DISKUSE:

Uroteliální nádory močového měchýře představují v České republice 6. nejčastější malignitu u mužů a 13. u žen, přičemž jejich incidence trvale stoupá [16]. Odhadujeme, že se na světě objeví každoročně 200.000 - 250.000 nových případů [17]. Zhruba 70 - 80 % z celkového počtu tvoří povrchové nádory, mezi které řadíme malignity klasifikované jako Ta, T1 a Tis dle TNM klasifikace [18]. Povrchové nádory je možné odstranit transuretrální resekci, nemocného však ohrožují vznikem recidiv, jež se při dlouhodobém sledování objevují až v 88 % [19].

Typickým rysem povrchových nádorů močového měchýře je nález mnohočetných tumorů, který zachytíme u více než 20 % pacientů [20]. Kromě makroskopicky mnohočetných nádorů se často setkáváme i s ložisky intraepiteliálních změn charakteru dysplázie nebo *carcinoma in situ* (Tis), která nejsou prostým okem viditelná a která vedou k časným recidivám onemocnění. Likvidace těchto ložisek je hlavním cílem intravezikální imunoterapie a chemoterapie, ani ty však nejsou ve všech případech účinné [21]. Velmi slibnou metodou se v této indikaci zdá být PDT. Její první výsledky po parenterální aplikaci Photofrinu IIR naznačují dobrý protinádorový účinek [22 - 24], jsou však provázeny kožní fotosenzibilizací a lokálními vedlejšími účinky [25 - 26].

Slibný princip PDT a rozporuplné první klinické výsledky jsou podnětem k intenzivnímu výzkumu v této oblasti. Předpokladem

budoucí klinické aplikace všech nových fotosenzibilizátorů jsou pokusy *in vitro* na buněčných kulturách, ačkoliv jsme si vědomi určitých nepřesností při extrapolaci výsledků *in vitro* do podmínek *in vivo*. V případě tumoru *in situ* močového měchýře však mohou být pokusy na buňkách rostoucích v jedné vrstvě mnohem blíže praktické realitě než pokusy na vaskularizované tkáni s lokálními rozdíly v prokrvení.

V naší práci se nám podařilo prokázat nízkou toxicitu TPPS₄ bez následného ozáření a definovat optimální parametry PDT u maligních buněk J82.

Nejúčinnější vlnová délka použitého světla musí být stanovena pro každý fotosenzibilizátor individuálně, protože se její hodnota často významně liší. Závisí na schopnosti látky absorbovat světlo příslušné vlnové délky i na dalších faktorech, jako je její intracelulární distribuce nebo konfigurace při různých hodnotách pH.

Nejúčinnější vlnová délka dosáhla u TPPS₄ hodnoty 645 nm a byla tedy vyšší než u Photofrinu IIR, kde je používáno ozáření 630 nm. Vyšší vlnová délka použitého světla je z klinického pohledu příznivá a žádoucí, protože vede k hlubšímu průniku paprsků do tkáně.

Méně příznivé byly poměrně vysoké koncentrace TPPS₄ a dávky záření nutné k dosažení fototoxického účinku. Prokáže-li se tato skutečnost i u dalších buněčných linií a v pokusech na zvířatech, může se stát překážkou budoucího klinického využití.

Experimenty ukázaly, že PDT je signifikantně účinnější u maligních buněk J82 než u benigních buněk UROtsa. Toto „terapeutické okno“ bylo nejvýznamnější při ozáření dávkou 50 J/cm² při všech koncentracích TPPS₄ (konkrétní data uvádíme jen pro koncentraci 50 µg/ml), zatímco další zvýšení dávky vede naopak k jeho zmenšení. Význam této skutečnosti pro klinické využití musí přinést další práce.

Naše studie představuje pouze první krok k použití TPPS₄ v léčbě povrchových nádorů močového měchýře. Teprve podrobné hodnocení farmakokinetiky a fotodynamické účinnosti na zvířatech umožní uvažovat o jeho klinickém využití.

ZÁVĚR:

Studie prokázala fototoxický účinek TPPS₄ na buňky špatně diferencovaného nádoru močového měchýře *in vitro*. Tento účinek byl signifikantně větší než u benigních uroteliálních buněk. Podařilo se definovat optimální koncentraci fotosenzibilizátoru, délku inkubace, dávku záření i vlnovou délku použitého světla.

LITERATURA:

1. Jirsa, M.: Fotodynamická léčba maligních nádorů. Sborník lékařský, 97, 1996, č.1, s.115-134.
2. Dougherty, J.T., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D. et al.: Photodynamic therapy. J.Natl.Cancer Inst., 90, 1998, č. 12, s.889-905.
3. Winkelman, J.: The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat. Cancer Res 22, 1962, s.589-596.
4. Musser, D.A., Wagner, J.M., Datta-Gupta, N.: Distribution of tetraphenylporphine sulfonate and tetracarboxyphenylporphine in tumor bearing mice. J Natl Canc Inst, 61, 1978, s.1397-1403.
5. Zanelli, G.D., Kaelin, A.C.: Synthetic porphyrins as tumor-localizing agents. Br J Radiol, 54, 1981, s.403-407.
6. Sima, A.A.F., Kennedy, J.C., Blakeslee, D., Robertson, D.M.: Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. Can J Neurol Sci, 8, 1981, s.105-114.
7. Winkelman, J.W., Collins, G.H.: Neurotoxicity of tetraphenylporphinesulfonate TPPS₄ and its relation to photodynamic therapy. Photochem Photobiol, 46, 1987, č.5, s.801-807.
8. Busby, C.A., Dinello, R.K., Dolphin, D.: A convenient preparation of mesotetra (4-sulfonatophenyl) porphine. Can J Chem 60, 1975, s.1554-1555.

9. Jirsa, M., Kakac, B.: The method of purification and desalting of meso-tetra-(p-sulphophenyl) porphine (in Czech), Czech Patent No. 07488-87 (1987).
10. Mandys, V., Jirsová, K., Jirsa, M., Vrana, J.: Neurotoxicity of tetraphenylporphine-sulfonate (TPPS4) and hematoporphyrin derivative (Photosan) in organotypic cultures of chick embryonic dorsal root ganglia. *J Photochem Photobiol B: Biol* 47, 1998, s.197-201
11. Sacchini, V., Melloni, E., Marche, S.I.N.I. et al.: Preliminary clinical studies with PDT by topical TPPS administration in neoplastic skin lesions. *Laser Surg. Med.* 7, 1987, s.6-11.
12. O'Toole, C., Price, Z.H., Ohnuki, Y., Unsgaard, B.: Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer* 1978, 38, s.64-76.
13. Petzoldt, J.L., Leigh, I.M., Duffy, P.G., Sexton, C., Masters, J.R.W.: Immortalisation of human urothelial cells. *Urol Res*, 1995, 23, s.377-380.
14. Knappe, A., Beyer, W., Riesenberger, R. et al.: Computer-assisted laser irradiation unit for the investigation of light-induced processes in cell cultures. *Biomed Technik* 40, 1995, s.272-275.
15. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983, 65, s.55-63.
16. Kolcová, V., Geryk, E., Jechová, M.: Zhoubné novotvary. Praha: Galén, 1999.
17. Droller, M.J.: Bladder cancer: State-of-the-art care. *CA Cancer J Clin* 48, 1998, s.269-284.
18. Lutzeyer, W., Rübber, H., Dahm, H.: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases. *J Urol*, 127, 1982, č.2, s.250-252.
19. Lamm, D.L.: Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 19, 1992, č.3, s.573-580.
20. Tumors of the bladder. In: Tanagho, E.A., McAninch, J.W.: *Smith's General Urology*, 12 Ed, Lange Medical Publications 1988, ISBN 0-8385-8605-8, s.355-360.
21. Pacík, D., Vít, V., Turjanica, M.: Intravezikální imunoterapie povrchového karcinomu močového měchýře BCG vakcínou. *Rozhl. Chir.*, 76, 1997, č.10, s.482-485.
22. Windahl, T., Lofgren, L.A.: Two years' experience with photodynamic therapy of bladder carcinoma. *Br. J. Urol.*, 71, 1993, 187-191.
23. Kriegmair, M., Waidehlich, R., Lumper, W. et al.: Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 154, 1995, č.4, 1339-1341.
24. D'Hallewin, M.-A., Baert, L.: Long-term results of whole bladder wall photodynamic therapy for carcinoma in situ of the bladder. *Urology*, 45, 1995, č.5, s.763-767.
25. Harty, J.L., Amin, M., Wieman, T.J. et al.: Complications of whole bladder dihematoporphyrin ether photodynamic therapy. *J. Urol.*, 141, 1989, č.6, s.1341-1346.
26. Walther, M.M., Eanes, E.D., Delaney, T.F., Travis, W.D.: Bladder calcifications after photodynamic therapy: analysis of a rare complication. *Urology*, 47, 1996, č.6, s.831-835.

MUDr. Marko Babjuk
Urologická klinika VFN a 1. LF UK
Ke Karlovu 6
128 08 PRAHA 2