

Emilia Krajewska, Maria Bryszewska

TERAPIA FOTODYNAMICZNA

Artykuł stanowi przegląd podstaw fizycznych terapii fotodynamicznej nowotworów oraz podstawowych fotouczulaczy stosowanych w tej terapii.

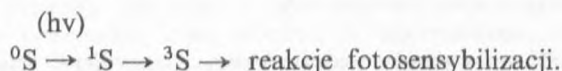
REAKCJE FOTOSENSYBILIZACJI

Pojęcie „terapia fotodynamiczna” (PDT – ang. *photodynamic therapy*) wprowadził von Tappeiner, który zastosował zjawisko fotosensybilizacji do leczenia nowotworów skóry. Używał on 5% barwnika eozyнового, którym kilkakrotnie w ciągu dwóch miesięcy smarował zaatakowane miejsca i wystawiał na działanie promieniowania słonecznego lub naświetlał lampami. Rezultatem była regresja nowotworu [1]. Później okazało się, że zarówno barwnik eozyновый, jak i oranż akrydynowy są związkami toksycznymi i rakotwórczymi i nie używano już ich więcej w PDT.

Fotosensybilizacją (światłouwrażliwieniem) nazywamy zdolność pochłaniania energii promieniowania świetlnego i przekazywania jej innym substancjom biorącym udział w reakcji świetlnej. Fotouczulacz, znajdujący się w stanie podstawowym, służy jako chromofor. W wyniku absorpcji światła sensybilizator ulega wzbudzeniu do wyższego poziomu energetycznego. Wzbudzona cząsteczka fotosensybilizatora może reagować bezpośrednio z substratem lub z innymi cząsteczkami (najczęściej z tlenem), znajdującymi się w mieszaninie reakcyjnej, dając produkty mogące ponownie reagować z substratami. Tak więc proces fotosensybilizacji inicjowany jest przez światło, lecz dalsze etapy reakcji zachodzą już w ciemności.

Nieaktywna cząsteczka fotouczulacza znajduje się w stanie singletowym, 0S , w którym nie posiada niesparowanych spinów elektronowych. Absorpcja fotonów ($h\nu$) powoduje przejście elektronu na wyższy orbital molekularny bez zmiany jego spinu. Pierwszy stan wzbudzony jest również stanem singletowym, 1S . Jednak niewiele reakcji fotosensybilizacji przebiega za

pośrednictwem tego stanu z powodu jego krótkiego czasu życia (1–100 ns). Wzbudzony stan singletowy może przechodzić do stanu podstawowego emitując ciepło lub kwant światła (fluorescencja). W przypadku efektywnego fotosensybilizatora zachodzi szybka inwersja spinu wysokoenergetycznego elektronu, czego efektem jest metastabilny stan trypletowy, 3S , który posiada dwa niesparowane elektrony i dłuższy czas życia (1–1000 μ s). Podczas swojego życia wzbudzony sensybilizator w stanie trypletowym może doznawać wielu zderzeń z innymi cząsteczkami i w rezultacie pośredniczyć w reakcjach fotosensybilizacji. Procesy te można przedstawić następująco:



Reakcje fotodynamiczne

W większości reakcji fotosensybilizacji fotouczulacz w stanie trypletowym wraca ostatecznie do stanu podstawowego i może absorbować kolejny foton. W kilku przypadkach sensybilizator jest zużywany stechiometrycznie w reakcji. Wiele reakcji fotosensybilizacji przebiega z udziałem tlenu, nazywane są wtedy fotodynamicznymi. Reakcje z tlenem mogą przebiegać dwoma drogami; mówimy wtedy o reakcjach typu I i typu II.

Reakcje typu I

W reakcjach tego typu wzbudzony sensybilizator znajdujący się w stanie trypletowym reaguje na początku z cząsteczkami ze swojego bezpośredniego sąsiedztwa poprzez transfer elektronów lub protonów. W rezultacie powstaje semizredukowany sensybilizator, $S^{\cdot-}$ lub SH^{\cdot} i semiutleniony substrat. Te wolne rodniki są reaktywne chemicznie. W większości przypadków powstający wolnorodnikowy substrat reaguje z tlenem, dając utlenione produkty różnego typu (np. nadtlenki), które później mogą reagować inicjując wolnorodnikowy proces autooksydacji. Semizredukowany sensybilizator może reagować z tlenem w stanie podstawowym, 3O_2 . Wraca wtedy do stanu podstawowego i generuje anionorodnik ponadtlenkowy:



który wtórnie może reagować z biomolekułami lub ulegać dysmutacji, dając H_2O_2 . Dalsze reakcje katalizowane są przez enzym, dysmutazę ponadtlenkową (SOD). Anionorodnik ponadtlenkowy może również powstawać, choć jest to reakcja mało wydajna, w wyniku transferu elektronu ze wzbudzonego sensybilizatora, znajdującego się w stanie trypletowym, na tlen:

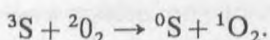


Powstający semiutleniony sensybilizator może reagować ze zredukowanym substratem, dając sensybilizator w stanie podstawowym i semiutleniony substrat, mogący uczestniczyć w dalszych reakcjach.

Reakcje typu I przeważają przy wysokim stężeniu substratu i niskim stężeniu tlenu, ponieważ tlen współzawodniczy z substratem o sensybilizator. Również powstanie połączonych niekowalencyjnie kompleksów substrat – sensybilizator przed naświetleniem podnosi prawdopodobieństwo zachodzenia reakcji typu I.

Reakcje typu II

W reakcjach tych uczestniczy sensybilizator znajdujący się w stanie trypletowym, który wchodzi, poprzez transfer energii, w interakcję z tlenem znajdującym się w stanie podstawowym. Sensybilizator powraca wtedy do stanu podstawowego, zaś tlen przechodzi do wzbudzonego stanu singletowego, $^1\text{O}_2$:



Ponieważ oba składniki, sensybilizator i tlen w stanie podstawowym, są trypletami, ich interakcja nie wymaga zmiany spinu elektronu i przez to jest skuteczna. Tlen może istnieć w dwóch wzbudzonych stanach singletowych; forma dłużej żyjąca, $^1\Delta_g$ z nadwyżką energii 23 kcal/mol jest formą podstawową, biorącą udział w reakcjach fotodynamicznych. Jego czas życia w wodzie wynosi 4 μs . Jednakże w obecności cząsteczek biologicznych, z którymi może reagować, czas ten znacznie się skraca. Reakcja tlenu singletowego z komponentami organicznymi nie jest już spinowo zabronioną, jak ma to miejsce w przypadku tlenu w stanie podstawowym. Co więcej, tlen singletowy jest bardziej elektrofilowy niż $^3\text{O}_2$ i może reagować szybciej z bogatymi w elektrony wieloma biomolekułami, dając utlenione pochodne. Możliwe są następujące reakcje:

1) addycja $^1\text{O}_2$ do węglowodorów etylenowych z allelicznymi atomami wodoru (tak jak np. nienasycone kwasy tłuszczowe i cholesterol), czego efektem są hydroksynadtlenki;

2) addycja $^1\text{O}_2$ do systemu dienów w związkach heterocyklicznych (jak np. histydyna), co daje endonadtlenki;

3) reakcja $^1\text{O}_2$ z organicznymi siarczanami (np. metionina) i powstawanie sulfotlenków.

Anaerobowe reakcje fotosensybilizacji

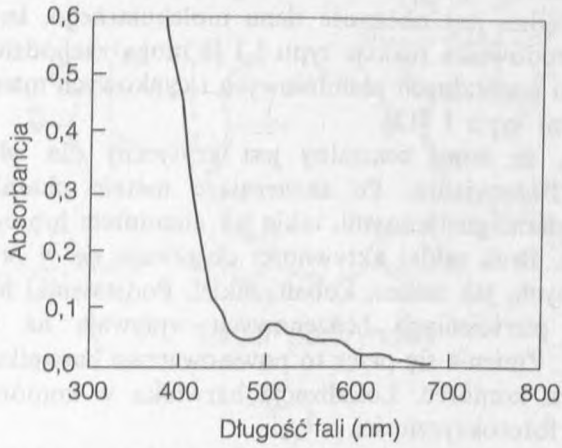
Istnieją związki, które indukują przekształcanie biomolekuł na skutek reakcji fotosensybilizacji pod nieobecność tlenu. Najważniejszą grupą takich

sensybilizatorów są psoraleny, atakujące kwasy nukleinowe. Innymi związkami są ketony, jak np. aceton, którego wzbudzenie do stanu trypletowego można generować światłem w zakresie 300–360 nm. W ciemności ketony mogą być przekształcane do stanu trypletowego za pośrednictwem pewnych enzymów na drodze reakcji oksydacji lub w wyniku dekompozycji nadtlenu lipidowych. Energia stanów trypletowych wielu ketonów jest wyższa niż energia wiązań pomiędzy zasadami DNA; w rezultacie może nastąpić jego uszkodzenie (np. na skutek formowania pirymidynowych dimerów o strukturze cyklobutanu) [2].

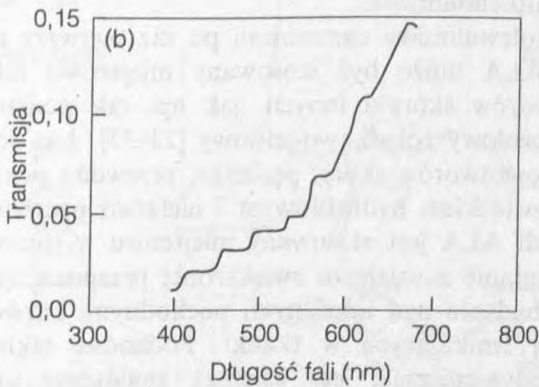
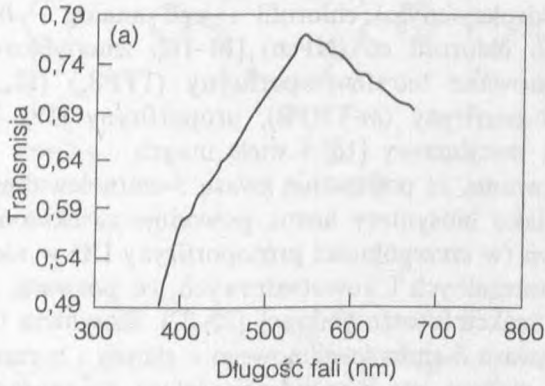
Fotosensybilizatory

W 1913 roku zaobserwowano selektywne gromadzenie w tkankach nowotworowych porfiryn, w tym pochodnych hematoporfirynowych (HPD – *haematoporphyrin derivative*) i zaczęto ich używać jako sensybilizatorów [3]. HPD jest mieszaniną zawierającą hematoporfiryny i produkty ich dehydratacji oraz dimery i wyższe oligomery porfiryn połączone wiązaniami estrowymi. Oprócz HPD wymienić należy Fotofrin II, fotosan oraz protoporfirynę IX. Fotofrin II i fotosan są oczyszczonymi preparatami aktywnej frakcji HPD; preparaty komercyjne (85% czystości) zawierają protoporfirynę IX (PP), hydroksyetylo-winylo-deutero-porfirynę IX (HVD) i zanieczyszczenia w postaci wysoce zagregowanych komponentów [4, 5]. Badania wskazują, że fotosensybilizacja za pośrednictwem porfiryn zachodzi według reakcji typu II (generowany jest tlen singletowy) [6, 7]. Niestety, główne pasmo absorpcji HPD przypada na długość fali ok. 400 nm (rys. 1). Światło czerwone (630 nm), używane w fototerapii z powodu wzrastającej przenikalności tkanek wraz ze wzrostem długości fali, jest przez nie słabo pochłaniane. Ponadto skóra pacjenta staje się bardzo wrażliwa na światło (na skutek powolnego uwalniania HPD) [2].

Rozpoczęto poszukiwania alternatywnych sensybilizatorów w fototerapii nowotworów. Zwrócono wtedy uwagę na ftalocyjaniny (Pc), wcześniej stosowane jako katalizatory, barwniki i pigmenty [9]. Metaloftalocyjaniny są związkami porfirynopodobnymi, trwałymi i łatwymi do zsyntetyzowania. Silnie pochłaniają światło czerwone z zakresu 600–700 nm; dla $\lambda = 680 \text{ nm}$ $\epsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ (HPD: $\epsilon = 1200$, $\lambda = 624 \text{ nm}$). Używając ftalocyjanin uzyskano dodatkowe przesunięcie ku czerwieni, umożliwiające lepszą penetrację tkanek: o 20% głębiej dla skóry i 50% dla tkanki mózgowej dorosłego człowieka. Na przykład: po naświetleniu tkanek promieniowaniem o długości fali 630 nm światło dociera na głębokość od 1 do 3 mm. Jeżeli jednak użyjemy światła z zakresu 700–850 nm, to wniknie ono na głębokość 6 mm [10] (rys. 2).



Rys. 1. Przykładowe widmo absorpcyjne porfiryn [8]



Rys. 2. Transmisja optyczna skóry na głębokości (a) 0,05 mm [11]
i (b) 2,0 mm [11]

Fotosensybilizacja przy udziale Pc jest procesem fotodynamicznym, w którym niezbędna jest obecność tlenu molekularnego, lecz w zależności od polarności środowiska reakcje typu I i II mogą zachodzić równocześnie, zaś w przypadku pochodnych aluminium i cynkowych mamy do czynienia tylko z reakcjami typu I [12].

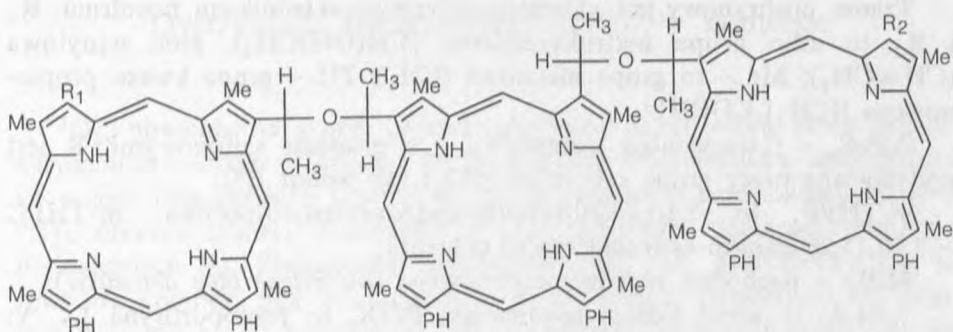
Stwierdzono, że atom centralny jest krytyczny dla właściwości fotodynamicznych ftalocyjanin. Pc zawierające metale charakteryzujące się właściwościami diamagnetycznymi, takie jak aluminium lub cynk, są aktywne fotobiologicznie. Brak takiej aktywności obserwuje się w przypadku metali paramagnetycznych, jak żelazo, kobalt, nikiel. Podstawniki lokujące się przy peryferycznych pierścieniach benzenowych wpływają na rozpuszczalność ftalocyjanin [13]. Zmienia się przez to powinowactwo barwnika do biomolekuł występujących w komórce. Lokalizacja barwnika w komórce będzie decydowała o jego fototoksyczności.

Barwniki ftalocyjaninowe zaliczane są do fotosensybilizatorów drugiej generacji. Oprócz nich należy wymienić: chlorofile i ich pochodne, takie jak: tetra (*m*-hydroksyfenylo) chlorofil i jego analog – bakteriochlorofil, mono-*L*-aspartylo chlorofil e6 (NPe6) [14–16]; zmodyfikowane porfiryny, takie jak: sulfonowane tetrafenyloporfiryny (TPPS_n) [17, 18], tetra (*m*-hydroksyfenylo) porfiryny (*m*-THPP), uroporfiryny [19], psoralen i jego pochodne, błękit metylenowy [16] i wiele innych.

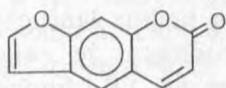
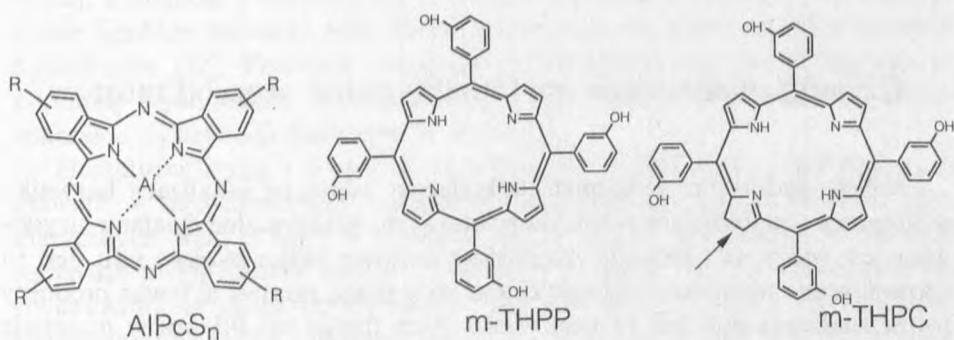
Ostatnio wykazano, że podawanie kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA), prekursora w szlaku biosyntezy hemu, powoduje zwiększoną syntezę i gromadzenie porfiryn (w szczególności protoporfiryny IX) w niektórych komórkach/tkankach normalnych i nowotworowych, co pozwala, po naświetleniu, na zainicjowanie reakcji fotosensybilizacji [20–22]. Biosynteza hemu rozpoczyna się powstaniem kwasu 5-aminolewulinowego z glicyny i bursztynylo koenzymu A. Ostatnim jej etapem jest inkorporacja żelaza do protoporfiryny IX, co ma miejsce w mitochondriach.

Kwas 5-aminolewulinowy zastosowali po raz pierwszy w 1990 r. Kennedy i wsp. ALA może być stosowany miejscowo lub ustrojowo do leczenia nowotworów skóry i innych, jak np. rak podstawnocomórkowy skóry i rak gruczołowy żołądkowo-jelitowy [23–25]. Jest również skuteczny w diagnostyce nowotworów skóry, pęcherza, przewodu pokarmowego i płuc [26]. ALA jest związkiem hydrofilowym i niełatwo penetruje skórę i błony biologiczne. Jeżeli ALA jest stosowany miejscowo w leczeniu nowotworów skóry, swoje działanie zawdzięcza zwiększonej przepuszczalności zmienionej tkanki. Trwają badania nad lipofilnymi pochodnymi estrów kwasu 5-ALA, łatwiej i głębiej wnikających w tkanki. Pochodne takie są co prawda nieaktywne fotodynamicznie, lecz esterazy znajdujące się w komórkach mogą odcinać cząsteczkę kwasu od części estrowej [27].

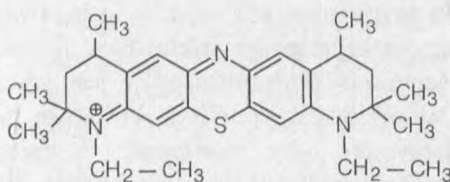
Na rysunku 3 przedstawiono wzory chemiczne niektórych fotouczulaczy.



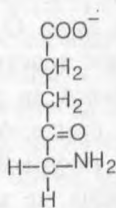
Trimer porfiryowy



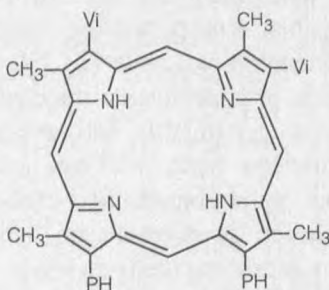
Psoralen



MBD



5-ALA



PPIX

Rys. 3. Wzory chemiczne niektórych fotosensybilizatorów

Trimer porfirynowy jest głównym aktywnym składnikiem Fotofrinu. R_1 i R_2 to albo grupa hydroksyetylowa [$\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$], albo winylowa ($\text{CH}=\text{CH}_2$); Me – to grupa metylowa (CH_3); PH – grupa kwasu propionowego [$(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$];

AlPcS_n – ftalocyjanina aluminiowa z n grupami sulfonowymi; R jest podstawiane przez grupę sulfonową (SO_3) lub wodór (H);

m-THPP, to 5,10,15,20-tetra(m-hydroksyfenylo)porfina, m-THPC – 5,10,15,20-tetra(m-hydroksyfenylo) chlorofil;

MBD – pochodna błękitu metylenowego (*methylene blue derivative*);

5-ALA, to kwas 5-aminolewulinowy; PPIX, to protoporfiryna IX, Vi – grupa winylowa ($\text{CH}=\text{CH}_2$), PH – grupa kwasu propionowego [$(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$].

Czynniki wpływające na fotoaktywność sensybilizatorów

Należy podkreślić, że stopień uszkodzenia zależy od lokalizacji barwnika w komórce i przedziałach międzykomórkowych. Maksymalne działanie uzyskiwane jest wtedy, gdy barwnik znajduje się możliwie blisko swojego celu. Jest to spowodowane niewielkimi odległościami, jakie mogą przebyć aktywne produkty fotowzbudzenia podczas swojego czasu życia (mniej niż $0,1 \mu\text{m}$ w materiale biologicznym) [6, 28]. Lokalizacja barwnika w komórce jest uzależniona od wielu czynników, włączając w to jego właściwości fizykochemiczne, charakterystykę otaczającego go środowiska, nośnika, czasu inkubacji [29]. Bardzo ważną właściwością sensybilizatorów jest ich rozpuszczalność.

W przypadku porfiryn kluczowe znaczenie mają boczne łańcuchy jako podstawniki przy pierścieniu tetrapirolowym powodujące, że związki te mogą być cząsteczkami albo bardzo lipofilowymi, jak np. PP i fotoaktywne wobec molekuł o właściwościach hydrofobowych lub zasocjowanych z błoną, albo bardzo hydrofilowymi, jak uroporfiryny, których działanie jest bardziej skuteczne wobec komponentów rozpuszczalnych w wodzie z enzymami cytoplazmatycznymi włącznie [7, 29]. Ponieważ czas życia O_2 ($^1\Delta_g$) w rozpuszczalnikach organicznych i micelach (20–25 μs) jest znacznie dłuższy niż w wodzie (3–4 μs) [6, 30], fotouszkodzenia zachodzące za pośrednictwem tlenu singletowego będą większe, jeśli porfiryny i cząsteczki – tarcze są zlokalizowane w regionach hydrofobowych [7]. W przypadku barwników ftalocyjaninowych zwiększenie ich hydrofilowości będzie się wiązało z przyłączeniem do pierścieni benzenowych reszt kwasu siarkowego.

Rozmiar uszkodzeń jest też silnie determinowany przez stopień agregacji sensybilizatora; tylko formy monomeryczne są aktywne fotodynamicznie. Agregaty wykazują niską wydajność formowania tlenu singletowego.

Dystrybucja fotosensybilizatorów w komórce

$^1\text{O}_2$, powstały na skutek wzbudzenia fotosensybilizatora przez światło, natychmiast wchodzi w reakcję z przypadkowymi biomolekułami znajdującymi się w jego bezpośrednim sąsiedztwie (są to najczęściej komponenty błonowe [31]), chociaż istnieją doniesienia o jego zdolności penetracji membran biologicznych [6]. Stwierdzono jednak, że jeżeli $^1\text{O}_2$ generowany jest na zewnątrz komórki (jak ma to miejsce w przypadku uroporfiryn lub przyłączonych do białek hematoporfiryn), to proces fotodestrukcji nie jest tak skuteczny jak w przypadku $^1\text{O}_2$ generowanego wewnątrz komórki. Co więcej, wydajność kwantowa dla procesu inaktywacji komórek przez Fotofrin i inne lipofilne barwniki była 10-krotnie wyższa niż przez niektóre barwniki hydrofilowe [32]. Ponieważ wszystkie te sensybilizatory charakteryzują się podobną wydajnością tworzenia $^1\text{O}_2$ [33], dane te wskazują na istotne znaczenie dystrybucji barwnika w komórce.

Hematoporfiryny i Fotofrin są związkami lipofilnymi i gromadzą się głównie w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, błonach plazmatycznych oraz, *in vitro*, w obszarze perijądrowym cytoplazmy. W niższych stężeniach mogą również wnikać do lizosomów i jądra [34, 35]. Po naświetleniu stwierdzono, że głównym miejscem ataku jest układ błonowy komórki [35]. Ftalocyjaniny AlPcS_n , badane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, lokują się w komórce w zależności od swojej polarności: bardziej polarne AlPcS_3 i AlPcS_4 dają tylko punktową fluorescencję w cytoplazmie. Rozkład tych barwników podobny jest do rozmieszczenia oranżu akrydynowego (AO) w tych samych komórkach, co wskazuje, że lokalizują się one głównie w lizosomach. Gdy badano mniej polarne AlPcS_1 i AlPcS_2 , otrzymano bardziej zróżnicowany wzór subkomórkowej lokalizacji barwnika [36], co może być spowodowane ich amfipatycznymi właściwościami [37]. Ftalocyjaniny te okazały się jednak bardziej skuteczne, niż AlPcS_3 i AlPcS_4 , jeśli chodzi o fotodestrukcję komórek. Wskazuje to, że inaktywacja komórek przez PDT jest o wiele skuteczniejsza, jeżeli powodowana jest przez barwniki lokujące się w błonach, a nie w lizosomach. Stwierdzono też, że AlPcS_2 są bardziej skuteczne w fotodestrukcji komórki niż AlPcS_1 , mimo że barwniki monosulfonowane są bardziej hydrofobowe niż dwusulfonowane. Tłumaczy się to większą możliwością agregacji AlPcS_1 .

Właściwa tarcza ataku indukowanej przez ftalocyjaniny PDT nie jest jeszcze do końca znana, choć często obserwuje się uszkodzenia mitochondriów [37]. Użycie transmisyjnego mikroskopu elektronowego pozwoliło stwierdzić, że AlPcS_2 i AlPcS_1 powodują uszkodzenia układu błonowego komórki, jak np. częściową utratę błony cytoplazmatycznej, pęcznienie mitochondriów i zniszczenie retikulum endoplazmatycznego. Dzięki użyciu elektronowego

mikroskopu skaningowego stwierdzono w błonach plazmatycznych komórek inkubowanych z AlPcS_2 i AlPcS_1 , oprócz zniknięcia mikrorzęsek, pojawienie się licznych dziur, przez które następował wyciek cytozolu i innych składników komórkowych do środowiska zewnętrznego. Może to być spowodowane sieciowaniem białek błonowych [38]. AlPcS_4 i AlPcS_3 powodują zaś powstawanie dużych „bąbli” na powierzchni błony komórkowej, która w końcu pęka. Tak więc AlPcS_n w różny sposób działają na błonę komórkową komórki, lecz żadna z nich nie powoduje uszkodzeń jądra.

Zarówno błony biologiczne, jak i biocząsteczki mogą być modyfikowane przez ftalocyjaniny. Fotosensybilizacja przez ftalocyjaniny cynkowe prowadzi do utlenienia niektórych aminokwasów, takich jak: cysteina, histydyna, metionina, tryptofan i tyrozyna, jak i również uszkodzeń niektórych enzymów, jak np. lizozymu [39]. Innym efektem jest pojawienie się wiązań krzyżowych pomiędzy białkami błonowymi. Ponadto w roztworach wodnych sulfonowane pochodne ftalocyjanin powodują utlenianie cholesterolu do pochodnych 5α -hydroksynadtlenkowych (5α -OOH), będących specyficznym produktem reakcji z $^1\text{O}_2$ [40]. AlPcS_4 powodują również peroksydację lipidów błon erytrocytarnych [41]. Wszystkie chemiczne modyfikacje mogą prowadzić do zmiany przepuszczalności błony, zmniejszenia jej płynności, inhibicji bądź inaktywacji enzymów błonowych lub receptorów, a w konsekwencji – do lizy komórki. Pc mogą również powodować niszczenie jądra komórkowego, lecz nie w wyniku przyłączenia się do chromatyny, lecz do błony jądrowej [42].

Lokalizacja sensybilizatorów w tkankach nowotworowych

Pomimo wielu lat intensywnych badań, mechanizm transportu i lokalizacji sensybilizatorów w komórkach tkanek nowotworowych nie został do końca poznany. Guzy nowotworowe zawierają, oprócz komórek zmienionych nowotworowo, własny układ naczyniowy (stanowiący ok. 10% tkanki) i tkankę śródmiąższową (zdrowe tkanki również zawierają śródmiąższ, lecz w guzach jest go zwykle znacznie więcej). Do komórek nowotworowych mogą się dostać jedynie te cząsteczki, które są niesione przez krew. Układ naczyniowy powstaje na bazie układu gospodarza, lecz jego organizacja i tempo wzrostu, w zależności od rodzaju guza, może być zupełnie odmienna. Badania morfologiczne naczyń nowotworowych ludzi i zwierząt ujawniły występowanie szerokich połączeń, okienek i kanałów pomiędzy śródbłonkiem, powstałych na skutek braku ciągłości lub niewystępowania błony podstawnej śródbłonka. Ponadto układ naczyniowy charakteryzuje się nierównomiernym rozgałęzieniem i komórki znajdujące się w głębszych warstwach guza nie mają z nim kontaktu (komórki rakowe z obszarów pozbawionych krążenia

mogą na pierwszy rzut oka okazać się martwe, ale często ożywają z chwilą, gdy dotrą do nich substancje odżywcze) [43, 44]. Taka budowa morfologiczna może oznaczać, że przepuszczalność komórek nowotworowych jest inna niż tkanek prawidłowych; substancje dostarczane z zewnątrz (w tym również leki) mają więc utrudniony dostęp do komórek guza. Tkanka śródmiąższowa składa się z różnych komponentów: makrocząsteczek (glikoaminoglikany, glikoproteiny, węglowodany, lipidy i woda), włókien (kolagen) i normalnych komórek gospodarza (fibroblasty, makrofagi, mastocyty itp.) [45].

Stwierdzono, że pH wielu komórek nowotworowych jest niższe niż komórek normalnych [46, 47]. Główną różnicą pomiędzy guzami litymi a otaczającymi je normalnymi komórkami jest ich zapotrzebowanie na składniki odżywcze. Również ilość tlenu jest raczej niedostateczna. Spalanie glukozy zachodzi więc częściowo na drodze anaerobowej, w wyniku czego powstaje kwas mlekowy. Nadmiar kwasu powstającego wewnątrz komórki jest transportowany do środowiska zewnętrznego. pH cytozolu komórek nowotworowych może się różnić nawet o połowę jednostki. Jest to istotny czynnik przyczyniający się do obserwowanej preferencyjnej akumulacji fotouczulaczy w nowotworach. Znajdując się już wewnątrz komórki, w pH ok. 6,9, obojętny do tej pory sensybilizator zyskuje jeden bądź dwa ładunki; z takim „bagażem” nie może już przejść przez błonę.

Coraz większa liczba danych wskazuje na to, że na zdolność przenikania do komórek nowotworowych mają wpływ chemiczne właściwości cząsteczki transportowanej, a w szczególności zdolność przyłączania się do białek osocza [48,49]. Sugeruje się, że barwniki hydrofilowe transportowane są głównie przez albuminy i globuliny i lokują się w zřębie naczyń krwionośnych guza. Bardziej hydrofobowe barwniki przyłączają się do lipoprotein i w ten sposób wnikają do komórek nowotworowych [50]. Stwierdzono, że ilość barwnika w komórkach zwiększa się, jeżeli był on wcześniej inkubowany z LDL lub liposomami. Spośród barwników wnikających do wnętrza komórki należy wymienić AlPcS₁, AlPcS₂, Fotofrin, m-THPC i m-THPP. Największe stężenia obserwowano po 24 godz. od iniekcji. Sposób rozmieszczenia w komórce jest uzależniony od ilości podanego barwnika i od rodzaju guza [51]. Tabela 1 przedstawia lokalizację fotouczulaczy w komórkach i tkankach nowotworowych.

MECHANIZMY NISZCZENIA NOWOTWORÓW

Biorąc pod uwagę dane dotyczące lokalizacji fotosensybilizatorów w guzie nowotworowym i miejsca akcji fotodynamicznej, zaproponowano dwa mechanizmy destrukcji nowotworów przez PDT: 1) pośredni, gdzie wynikiem

zniszczenia układu naczyniowego nowotworu (śródbłonka lub innych komponentów ściany naczynia) jest hipoksja¹ (i/lub anoksja²), co w efekcie prowadzi do śmierci komórek nowotworowych; 2) bezpośredni, kiedy komórki nowotworowe są niszczone na skutek bezpośredniej akcji fotodynamicznej (uszkodzenia mitochondriów lub komórkowego systemu błonowego). Mechanizm destrukcji komórki jest uzależniony od takich czynników, jak: właściwości chemiczne barwnika (hydrofilowość, która determinuje sposób transportu i rozmieszczenie w komórce), stężenie tlenu w tkance oraz czas od zaaplikowania do wzbudzenia barwnika przez światło [52, 53].

Pośredni mechanizm fotodestrukcji

Początkowo uważano, że terapia fotodynamiczna nowotworów zawdzięcza swoją efektywność selektywnej lokalizacji barwnika w komórkach nowotworowych i bezpośredniemu ich niszczeniu przez $^1\text{O}_2$ powstający na skutek fotoaktywacji sensybilizatora. Jednak ostatnie prace sugerują, że w większości przypadków uszkodzenie komórek nowotworowych jest powodowane niszczeniem układu naczyniowego guza, co indukuje hipoksję/anoksję komórek, a w końcu – nekrozę [54]. Reakcja ta zachodzi wtedy, gdy naświetlanie tkanek prowadzi się krótko po podaniu barwnika i powoduje zwężenie/rozszerzenie naczyń krwionośnych, agregację erytrocytów i płytek krwi, wreszcie zatrzymanie krążenia [55]. Dodatkowo PDT może indukować odpowiedź immunologiczną, co objawia się powstawaniem endogennych wazoaktywnych mediatorów. Na skutek uszkodzenia komórek endotelialnych uwalniane są czynniki krzepnięcia krwi [56, 57], jak na przykład czynnik von Willebranda (vWF), który pośredniczy w adhezji płytek do ścian naczyń [58], zakrzepicy [59] i uszkodzeniach naczyń krwionośnych [60]. Uszkodzenia błon lipidowych prowadzą do aktywacji fosfolipazy A_2 katalizującej uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych [61]. Na skutek działania cyklooksygenazy na kwas arachidonowy mogą powstawać prostaglandyny, zaś z endoperoksynadtlenków prostaglandyn – rozszerzające naczynia tromboksany A_2 [62]. PDT powoduje degranulację mastocytów i uwalnianie mediatorów takich jak histamina, prostaglandyna D_2 i czynnik aktywujący płytki krwi [63], co zachodzi w dwóch fazach: wczesnej (do 2 godz.) i późnej (od 2 do 24 godz.). Opisane zmiany obserwuje się zarówno dla fotouczulaczy o właściwościach hydrofilowych (AlPcS_4) jak i hydrofobowych (Fotofrin, m-THPC i m-THPP).

¹ Nieznaczne niedotlenienie tkanek.

² Niedobór tlenu w tkankach uniemożliwiający procesy życiowe komórek.

Mechanizmy prowadzące do opisanych zmian patofizjologicznych nie są do końca znane. Autorzy w swych doniesieniach są jednak zgodni, że początkowe zmiany zachodzą głównie w obrębie śródbłonna [19, 55]. Stwierdzono na przykład, że pochodne hematoporfiryn oraz Fotofrin lokalizują się głównie wokół naczyń krwionośnych [64]. Jest to zgodne z doniesieniami o dużym powinowactwie niektórych porfiryn do kolagenu, elastyny i fibryny [65] oraz AlPcS₄ i Fotofrinu do miejsc występowania białek kolagenowych [22]; białka te i inne elementy łączące tkanki są pierwszym obiektem ataku [66]. Do regresji guza może przyczyniać się również odpowiedź immunologiczna, a w szczególności uwalnianie przez makrofagi czynnika martwicy nowotworów (TNF). Używając jako układu modelowego tkanek myszy stwierdzono, że jednoczesne podanie zrekombinowanego ludzkiego TNF i Fotofrinu nasila skuteczność PDT [67]. Co więcej, fototerapia nowotworów może prowadzić do miejscowych reakcji immunologicznych, manifestujących się dużą ilością komórek zapalnych: limfocytów, komórek plazmatycznych i makrofagów [68].

Bezpośredni mechanizm fotodestrukcji

Uszkodzenia układu naczyniowego (włączając bezpośrednio zniszczenie komórek śródbłonna) nie zawsze jest bezpośrednią przyczyną zniszczenia nowotworu. Wczesne doświadczenia wykazały, że pochodne hematoporfirynowe preferencyjnie akumulują się w tkankach nowotworowych zwierząt oraz człowieka i powodują ich nekrozę [69]. Odpowiedź bezpośrednia zachodzi wtedy, gdy czas od iniekcji barwnika do naświetlenia jest dostatecznie długi i jeżeli użyte zostaną specjalne nośniki, np. LDL lub liposomy, ułatwiające wniknięcie barwnika do komórki [70]. Wykazano inaktywację wielu istotnych dla życia komórki enzymów, takich jak np. enzymy mitochondrialne i transbłonowe (ATPaza i oksydaza cytochromu c) [71, 72, 73]. Następuje również zauważalny spadek poziomu ATP, jako bezpośrednia odpowiedź tkanki nowotworowej na PDT, który jest najprawdopodobniej spowodowany zachwianiem funkcji mitochondriów [74]. Działanie fotosensybilizatorów jest uzależnione od lokalizacji barwnika w komórce i od typu komórek nowotworowych. Co więcej, oba mechanizmy destrukcji nowotworów, pośredni i bezpośredni, zachodzą gdy barwnik jest umiejscowiony wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. W niektórych przypadkach, gdy naświetlanie prowadzi się 4 godz. po podaniu barwnika, zachodzi właśnie ten typ fotodestrukcji [60], bowiem w tych warunkach barwnik lokalizuje się jednocześnie na zewnątrz i wewnątrz komórki.

W ostatnich doniesieniach dowiedziono, że we wczesnych etapach PDT indukowana jest apoptoza komórek oraz stwierdzono udział jonów wapnia w aktywacji tego procesu [75, 76]. Pozostało jednak jeszcze wiele nie wyjaśnionych kwestii, takich jak relacja pomiędzy apoptozą a obserwowaną przy PDT cytotoksycznością, sposób wyzwalania apoptozy oraz pośrednie i bezpośrednie działanie PDT na komórki nowotworowe *in vivo*.

Tabela 1

Lokalizacja fotosensybilizatorów w komórce i tkance nowotworowej [77]

Fotosensybilizator	Cel komórkowy	Lokalizacja w nowotworze
Oranz akrydynowy	System błon komórkowych	Komórki nowotworowe
5-ALA	Mitochondria/jądro komórkowe	Komórki nowotworowe, śródbłonek
AlPcS	System błon komórkowych (apoptoza)	Układ naczyniowy
AlPcS ₂	System błon komórkowych	Komórki nowotworowe
AlPcS ₃	Lizosomy	
AlPcS ₄	Lizosomy	Układ naczyniowy
Hemina	Błona komórkowa	
Bakteriochlorofil a		Komórki nowotworowe układ naczyniowy
Hp	Mitochondria	Układ naczyniowy
Hp + liposomy lub LDL		Komórki nowotworowe
HpD	Mitochondria, błona komórkowa, aparat Golgiego, jądro komórkowe	Komórki nowotworowe układ naczyniowy
Błękit metylenowy	Błony, mitochondria	
Fotofrin	Mitochondria (apoptoza)	Układ naczyniowy
Fotosan	Mitochondria	
THPC		Komórki nowotworowe, układ naczyniowy
THPP		Komórki nowotworowe
ZnPc + liposomy		Komórki nowotworowe

DZIAŁANIE PDT NA KRWINKĘ CZERWONĄ

W 1987 r. Chopp i wsp. [78] stwierdzili, że PDT powoduje destrukcję układu naczyniowego. Po podaniu Fotofrinu II i 30 min ekspozycji na światło erythrocyty zbijały się w zwarte agregaty. Zaobserwowali oni, że uszkodzenie komórek endotelialnych powodowało uwalnianie czynników krzepnięcia. Formowanie skrzepu w naświetlanym miejscu nasilało ekspozycję erythrocytów na światło, co prowadziło do uszkodzeń błony i wyzwolenia

procesu hemolizy. W efekcie osmotycznie napęczniałe erythrocyty zupełnie zatykały naczynia krwionośne.

Erythrocyty są bardzo wrażliwe na działanie fotosensybilizatorów. Stwierdzono, że ftalocyjaniny i hematoporfiryny łączą się z błoną komórkową erythrocytu powodując lizę, jednak mechanizm działania tych dwóch sensybilizatorów jest inny.

Oba barwniki łączą się silnie z białkami osocza, jednak hematoporfiryny wydają się być wtedy bardziej efektywne niż ftalocyjaniny. W przypadku tych drugich następuje hamowanie reakcji hemolizy [79].

Stwierdzono również, że w przypadku ftalocyjanin dużą rolę gra struktura chemiczna barwnika, choć nie znaleziono żadnej korelacji pomiędzy rodzajem metalu w centrum pierścienia, liczbą reszt kwasu siarkowego i liczbą pierścieni benzenowych a zdolnością indukowania reakcji hemolizy. Wydaje się, że kombinacja tych wszystkich parametrów pozwala na przyłączenie się barwnika do swoistej tarczy (białka) na błonie erythrocytarnej i fotohemolizę [80]. Najskuteczniejszymi okazały się sulfonowane pochodne aluminiowe ($AlPcS_2$). Ponieważ mają charakter amfifilowy, łatwiej penetrują błonę komórkową i przemieszczają się pomiędzy różnymi komponentami komórkowymi.

Na podstawie badań ultrastrukturalnych stwierdzono, że fotohemoliza jest poprzedzona pęcznieniem komórki. Po działaniu barwnikami ftalocyjaninowymi erythrocyt zachowuje swój dwuwklęsły kształt nawet przy raptownym zwiększeniu swoich rozmiarów [81]. Hematoporfiryny powodują natomiast transformację dyskocytu do echinocyta z jednoczesnym zwiększeniem objętości komórki [80]. Potwierdzają to badania: hemina (Fe-protoporfiryna) powoduje dysocjację związanych z błoną erythrocytarną białek cytoszkieletu [82]. Każde osłabienie cytoszkieletu błonowego w wyniku jego chemicznej modyfikacji będzie prowadzić do zmian dwuwklęsłego kształtu i zwiększać wrażliwość kwinek na hemolizę [83]. Wydaje się więc prawdopodobne, że zmiany morfologiczne fotosensybilizowanych przez hematoporfiryny komórek są spowodowane zmianami w cytoszkielecie błonowym, zarówno w ciemności jak i po ekspozycji na światło [84]. Zmiany zachodzące na skutek fotosensybilizacji przez ftalocyjaniny mogą być spowodowane raczej wnikaniem wody niż działaniem na cytoszkielet. Stwierdzono, że fotohemolizie nie towarzyszy peroksydacja lipidów; analiza rozdziału białek błonowych na żelu poliakryloamidowym ukazała zniknięcie kilku pasm, w tym białka o masie 14 kDa, monomerów spektryny (220–260 kDa) i białek pasma 3 (110–120 kDa) z jednoczesnym pojawieniem się białka o masie 28 kDa w miejsce tropomiozyny, które mogło powstać na skutek wiązań krzyżowych pomiędzy różnymi białkami błonowymi [85].

Fotohemoliza jest zazwyczaj uważana za proces o podłożu koloidalno-osmotycznym, przejawiający się utratą selektywnej przepuszczalności,

uszkodzonej na skutek PDT, błony. Rozpuszczone w wodzie jony, do tej pory rozpoznawane i skutecznie zatrzymywane przez błonę, zaczynają wnikać do wnętrza, a wraz z nimi – woda. W wyniku tego następuje pęcznienie komórki, a w końcu jej zniszczenie, czyli liza. Taki proces jest najwyraźniej kontrolowany prawami dyfuzji i osmozy i powinien mieć jedną wartość energii aktywacji (E_a), a wykres Arrheniusa – charakter liniowy. Fotohemoliza indukowana przez ftalocyjaniny (AlPcS) nie jest jedynie prostą utratą selektywnej przepuszczalności błony plazmatycznej; jest procesem bardziej skomplikowanym. Dowodem na to są: brak linearności wykresu Arrheniusa i silne działanie kationów zewnątrzkomórkowych na poprzedzającą hemolizę szybkość zmian rozmiarów komórki. Wykreślony na podstawie danych doświadczalnych wykres Arrheniusa jest krzywą, co znaczy, że proces fotohemolizy musi być w tym przypadku wieloetapowy [86].

Kationy obecne w medium mają duży wpływ na szybkość hemolizy. Szybkość ta wzrasta w porządku: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ , jeżeli zaś chodzi o halogenki, to: F^- , Cl^- , Br^- , I^- i Br^- zachowują się w sposób, jak tego oczekiwano ze względu na ich rozmiar i Br^- jest najbardziej aktywny w indukcji reakcji hemolizy. Zaproponowano dwa wyjaśnienia tego zjawiska: możliwość powstawania porów w błonie o średnicy ok. 0,5–0,7 nm i otwieranie kanałów jonowych. Ładunek jonów może być przeszkodą w transporcie przez kanały. Wraz ze wzrostem rozmiaru jonu zmniejsza się gęstość ładunku na jego powierzchni, a tym samym nasila się jego transport. Drugi mechanizm wydaje się bardziej pasować do modelu reakcji wieloetapowej, wynikający z nieliniowego wykresu Arrheniusa.

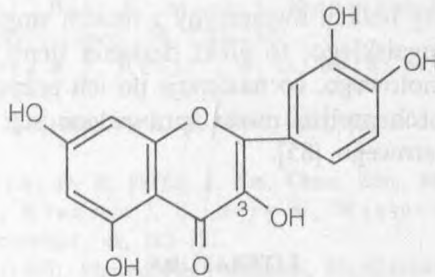
Najmniejszy halogenek F^- wykazuje zadziwiające działanie. W roztworach izotonicznych hamuje reakcję hemolizy przeszło dwukrotnie w stosunku do jonów Cl^- , i to już przy bardzo małych stężeniach (< 1 mM). Zmniejsza również prawdopodobieństwo powstawania wiązań krzyżowych pomiędzy strukturalnymi białkami błonowymi. Efekt ten był częściowo znoszony, jeśli fluorki były dodawane po naświetleniu.

Również dodanie przed naświetleniem deoksyglukozy, inhibitora glikolizy, procesu, który jest głównym źródłem ATP dla erytrocytów, nasila hemolizę i redukuje komórkowy poziom ATP o ok. 50% w porównaniu z erytrocytami kontrolnymi zawierającymi glukozę. Sugeruje to, że glikoliza i ATP są istotnymi czynnikami zapobiegającymi hemolizie [87].

Szybkość fotohemolizy erytrocytów ludzkich zwiększa się po dodaniu askorbinianu. Chociaż askorbinian jest biologicznym antyoksydantem, w obecności metali inicjujących reakcje redoks, takich jak żelazo, działa jako prooksydant. Po dodaniu do zawiesiny erytrocytów FeCl_3 i askorbinianu reakcja hemolizy przebiega 4-krotnie szybciej niż z samym sensybilizatorem. Również w obecności samego askorbinianu, bez udziału żelaza, reakcja hemolizy zachodzi dwukrotnie szybciej. Szybkość hemolizy i stężenie askor-

binianu w zakresie 0–1 mM były bezpośrednio skorelowane, co sugeruje, że askorbinian jest reagentem, nie katalizatorem. Wyższe stężenia (1–2 mM) miały tylko marginalny wpływ na szybkość reakcji. Wzmocnienie efektu obserwowano jedynie wtedy, gdy askorbinian był obecny podczas naświetlania; jego dodanie do zawiesiny komórek bezpośrednio po naświetleniu było nieefektywne. Proces ten również wymaga obecności tlenu – test z azydkiem i D_2O wykazał udział tlenu singletowego, chociaż w mniejszym stopniu niż przy braku askorbinianu. Z kinetyki reakcji wywnioskowano zachodzenie jednocześnie dwóch typów reakcji: pomiędzy wzbudzonym sensybilizatorem a askorbinianem i za pośrednictwem tlenu singletowego [88].

Wzrastająca w ostatnich latach groźba zarażenia chorobami bakteryjnymi i wirusowymi, jak wirusem żółtaczką zakaźną typu B i C oraz HIV podczas przetaczania krwi, skłoniła do poszukiwania nowych efektywnych metod sterylizacji preparatów krwiopochodnych. Przez ostatnie 7 lat wprowadzono wiele metod inaktywacji lub usuwania wirusów z erytrocytów i komponentów krwi. Najbardziej obiecujące wydaje się użycie ftalocyjanin aluminiowych i ich sulfonowanych pochodnych. Niestety ftalocyjaniny uszkadzają erytrocyty. Dlatego prowadzone są intensywne badania nad specyficznymi wygaszaczami, nie zmieniającymi fotodynamicznych właściwości barwnika, lecz chroniącymi erytrocyty przed zniszczeniem. Jednym z takich związków jest kwercetyna (rys. 4).



Rys. 4. Kwercetyna

Flawonoidy, do których należy kwercetyna, są nietoksycznymi naturalnymi polifenolami szeroko występującymi w tkankach roślin naczyniowych. Stwierdzono, że kwercetyna hamuje reakcje wolnorodnikowe, ponieważ jej struktura molekularna posiada cechy niezbędne do funkcjonowania w charakterze antyoksydanta, akceptora wolnych rodników i czynnika kompleksującego metale. Jest również zmiataczem rodnika ponadtlenkowego i hydroksylowego, inhibitorem indukowanej przez żelazo peroksydacji lipidów w mikrosomach wątroby szczura w niskich mikromolarnych stężeniach. Jednakże w wyższych

stężeniach działa jako prooksydant i przyspiesza generowanie rodnika hydroksylowego z nadtlenu wodoru w obecności Fe^{3+} – EDTA (kwasu etylenodiaminocząterosześciennego). Ben-Hur i wsp. [81] stwierdzili, że kwercetyna inhibuje reakcje typu I i II i wykazuje działanie ochronne wobec erytrocytów człowieka, co można tłumaczyć zdolnością do hamowania reakcji sieciowania białek błonowych.

Działanie fenoli jako antyoksydantów tłumaczy się zmiataniem rodników tlenowych biorących udział w procesie propagacji i jednoczesnym formowaniem utlenionych fenoli. Jeśli odpowiedni związek redukujący jest obecny w środowisku, może on reagować z utlenionym substratem i regenerować fenole, dzięki czemu nadal mogą działać jako antyoksydanty. Rzeczywiście, flawonoidy mogą wchodzić w interakcję z kwasem askorbinowym, który może zredukować utlenioną kwercetynę, która odzyskuje swoje właściwości antyoksydacyjne. Również w przypadku fotosensybilizacji indukowanej przez protoporfiryny, antyoksydacyjne działanie kwercetyny jest stymulowane przez kwas askorbinowy, nawet jeśli askorbinian występuje w stężeniach, w jakich działa już jako prooksydant.

Kwercetyna może również hamować reakcje, w których uczestniczy tlen singletowy, takie jak fotoliza krocyny pod wpływem różu bengalskiego. Kwercetyna jest również utleniana na skutek reakcji fotosensybilizacji indukowanych przez protoporfiryny; reakcja ta jest inhibowana przez NaN_3 pod warunkiem, że użyty jest w stężeniach, w których funkcjonuje jako wygaszacz tlenu singletowego, lecz nie stanu trypletowego fotouczulacza. Uważa się, że produkty reakcji kwercetyny z tlenem singletowym, powstające w obecności różu bengalskiego, to efekt dodania tlenu do 2,3 podwójnego wiązania pierścienia enolowego, co następuje po ich przemieszczeniu. Ochrona erytrocytów przed fotohemolizą może sprowadzać się do kompetycyjnego zmiatania tlenu singletowego [85].

LITERATURA

- [1] von Tappeiner H., Jodlbauer A. (1907), *FCW Vogel*, Leipzig.
- [2] Ben-Hur E., Moor A. C. E., Margolis Nunno H., Gottlieb P., Zuk M. M., Lustigman S., Horowitz B., Brand A., Van Steveninck J., Dubbelman T. M. A. R. (1996), *Transfusion Med. Rev.*, **1**, 15–22.
- [3] Kessel D., Dougherty T. J. (eds) (1982), *Advances in experimental medicine and biology*, 160, Plenum Press, New York.
- [4] Dougherty T. J. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 569–574.
- [5] Kessel D., Byrne C. J., Ward A. D. (1992), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **14**, 275–292.
- [6] Valenzano D. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 146–160.
- [7] Sandberg S., Romslo I. (1981), *Clin. Chim. Acta*, **109**, 193–201.

- [8] Ramponi R., Sacchi C. A., Cubeddu R. (1989), [w:] *Laser Applications in Medicine and Biology*, ed: M. L. Wolbarsht, 5, Plenum, New York, rozdz. 2.
- [9] Moser F. H., Thomas A. C. (1963), Reinhold, New York.
- [10] Ben-Hur E., Rosenthal I. (1986), *Lasers in Life Sci.*, **1**(1), 79-86.
- [11] Daniels F. (1969), [w:] *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation with Emphasis on the Skin*, ed. F. Urbach, Pergamon, Oxford, 151-157.
- [12] Rosenthal I., Ben-Hur E. (1995), *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**(1), 85-91.
- [13] Ben-Hur E., Rosenthal I., Lezonoff C. C. (1988), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2**, 243-252.
- [14] Spikes J. D. (1990), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**, 259-274.
- [15] Richter A. M., Kelly B., Chow J. (1987), *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 1327-1332.
- [16] Garbo M. G. (1996), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **34**, 109-116.
- [17] Winkelman J. (1962), *Cancer Res.*, **22**, 589-596.
- [18] Winkelman J., Slater G., Grossman J. (1967), *Cancer Res.*, **27**, 2060-2064.
- [19] Berenbaum M. C., Hall G. W., Hoyes A. D. (1986), *Br. J. Cancer*, **53**, 81-89.
- [20] Dietel W., Bolsen K., Dickson E., Fritsh C., Pottier R., Wendenburg R. (1996), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **33**, 225-231.
- [21] Sroka R., Beyer W., Grossner L., Sassy T., Stocker S., Baumgartner R. (1996), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **34**, 13-19.
- [22] Peng Q., Nesland J. M., Moan J., Evensen J. F., Kongshaug M., Rimington C. (1990), *Int. J. Cancer*, **45**, 972-979.
- [23] Kennedy J. C., Pottier R. H. (1992), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **14**, 143-148.
- [24] Wolf P., Rieger E., Kerl H. (1993), *J. Am. Acad. Dermatol.*, **28**, 17-21.
- [25] Cairnduff F., Stringer M. R., Hudson E. J., Ash D. V., Brown S. B. (1994), *Br. J. Cancer*, **69**, 605-608.
- [26] Kriegmair M., Baumgartner R., Knuechel R., Stepp H., Hofstadter F., Hofstetter A. (1996), *J. Urol.*, **155**, 105-110.
- [27] Peng Q., Warloe T., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Giercksky K., Neshland J. M. (1997), *Cancer*, **79**, 2282-2308.
- [28] Kimel S., Tromberg B. J., Roberts W. G., Berns M. W. (1989), *Photochem. Photobiol.*, **50**, 175-183.
- [29] Jori G., Spikes J. D. (1984), w: K. C. Smith (ed.), *Topisc in Photomedicine*, Plenum, New York, 183-318.
- [30] Merkel P. B., Kearns D. R. (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7244-7253.
- [31] Moan J., Peng Q., Evensen J. F., Berg K., Western A., Rimington C. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 713-721.
- [32] Moan J., Berg K. (1992), *Photochem. Photobiol.*, **55**, 931-948.
- [33] Moan J., Johannesen J. V., Christensen T., Espevik T., McGhie J. B. (1982), *Am. J. Pathol.*, **109**, 184-192.
- [34] Berns M. W., Dahlman A., Johnson F. (1982), *Cancer Res.*, **42**, 2325-2329.
- [35] Peng Q., Farrants G. W., Madslie K., Bommer J. C., Moan J., Danielson H. E., Neshland J. M. (1991), *Int. J. Cancer*, **49**, 290-295.
- [36] Paquette B., Ali H., Langlois R., van Lier J. (1988), *Photochem. Photobiol.*, **47**, 215-220.
- [37] Ben-Hur E., Green M., Prager A., Kol R., Rosenthal I. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 651-656.
- [38] Dubbelman T. M. A. R., de Bruijne A. W., van Steveninck J. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 811-817.
- [39] Spikes J. D., Bommer J. C. (1986), *Int. J. Radiat. Biol.*, **50**, 41-45.

- [40] Langlois R., Ali H., Brasseur N., Wagner J. R., van der Lier J. E. (1986), *Photochem. Photobiol.*, **44**, 117-123.
- [41] Deuticke B., Henseleit U., Haest C. W. M., Heller K. B., Dubbelman T. M. A. R. (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, **982**, 53-61.
- [42] Kvam E., Stokke T., Moan J. (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 33-37.
- [43] Jain R. K. (1987), *Cancer Metastasis Rev.*, **6**, 559-594.
- [44] Dvorak H. F., Nagy J. A., Dvokar J. T., Dvorak A. M. (1988), *Am. J. Pathol.*, **133**, 95-109.
- [45] Dvorak H. F. (1986), *New Engl. J. Med.*, **314**, 165-1659.
- [46] Brault D., Vever-Bizet C., Kuzelova K. (1993), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **20**, 191-195.
- [47] Barrett A. J., Kennedy J. C., Jones R. A., Nadeau P. (1990), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**, 309-321.
- [48] Kongshaug M. (1992), *Int. J. Biochem.*, **24**, 1239-1265.
- [49] Kessel D., Woodburn K. (1993), *Int. J. Biochem.*, **25**, 1377-1383.
- [50] Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nantwi K. D. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **45**, 787-790.
- [51] Jain R. K. (1987), *Cancer Res.*, **47**, 3039-3051.
- [52] Dougherty T. J. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **45**, 879-890.
- [53] Zhou C. (1989), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **3**, 299-318.
- [54] Selman S. H., Kreimer-Birnaum M., Klaunig J. E., Goldblatt P. J., Keck R. W., Britton S. L. (1984), *Cancer Res.*, **44**, 1924-1927.
- [55] Chandhuri K., Keck R. W., Selman S. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 823-827.
- [56] Ben-Hur E. (1990), *Spectrum*, **3**, 3-4.
- [57] Yonuschot G. (1991), *Free Rad. Biol. Med.*, **11**, 307-317.
- [58] Foster T. H., Primavera M. C., Marder V. J., Hilf R., Sporn L. (1991), *Cancer Res.*, **51**, 3261-3266.
- [59] Ris H. B., Altermatt H. J., Indebitzi R. (1991), *Br. J. Cancer*, **64**, 1116-1120.
- [60] Peng Q., Moan J., Neshland J. M., Rimington C. (1990), *Int. J. Cancer*, **46**, 719-726.
- [61] Reed M. W. R., Wieman T. J., Doak K. W., Pietsch K., Schuschke D. A. (1989), *Photochem. Photobiol.*, **50**, 419-423.
- [62] Fingar F. H., Wieman T. J., Wiehle S. A., Cerrito P. B. (1992), *Caner. Res.*, **52**, 4914-4921.
- [63] Kerdel F. A., Soter N. A., Lim H. W. (1987), *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 277-280.
- [64] Carpenter R. J., Ryan R. J., Neel H. B., Sanderson D. R. (1977), *Ann. Otol.*, **86**, 661-666.
- [65] Musser D. A., Wagner J. M., Datta-Gupta N. (1982), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **2**, 251-259.
- [66] Nelson J. S., Liaw L. H., Orenstein A., Roberts W. G., Berns M. W. (1988), *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 1599-1605.
- [67] Evans S., Matthews W., Perry R., Frankel D., Norton J. (1990), *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 34-39.
- [68] Schumaker B. P., Hetzel F. W. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 899-901.
- [69] Winkleman J. (1961), *J. Natl. Cancer Inst.*, **27**, 1369-1377.
- [70] Zhou C., Milanese C., Jori G. (1988), *Photochem. Photobiol.*, **48**, 487-492.
- [71] Dubbelman T. M. A. R., van Steveninck J. (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 201-207.
- [72] Hilf R., Smail D. B., Murant R. S., Leake P. B., Gimson S. L. (1984), *Cancer Res.*, **44**, 1483-1488.

- [73] Gibson S. L., Hilf R. (1983), *Cancer Res.*, **43**, 4191-4197.
- [74] Ceckler T. L., Bryant R. G., Penny D. P., Gibson S. L., Hilf R. (1986), **140**(1), 273-279.
- [75] Zaidi S. I. A., Oleinick N. L., Tarif-Zaim M., Mukhtar H. (1993), *Photochem. Photobiol.*, **58**, 771-776.
- [76] McConcey D. J., Orrenius S. (1994), *Trends Cell Biol.*, **4**, 370-374.
- [77] Peng Q., Moan J., Neshland J. M. (1996), *Ultrastr. Pathol.*, **20**, 109-129.
- [78] Chopp M., Glasberg M. R., Riddle J. M., Hetzel F. W., Welch K. M. A. (1987), *Photochem. Photobiol.*, **46**, 103-108.
- [79] Ben-Hur E., Rosenthal I. (1986), *Cancer Letters*, **30**, 321-327.
- [80] Senge M. O. (1992), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **16**, 3-36.
- [81] Ben-Hur E., Malik Z., Dubbelman T. M. A. R., Margaron P., Ali H., van Lier J. E. (1993), *Photochem. Photobiol.*, **58**(3), 351-355.
- [82] Malik Z., Lev B. (1991), *Blood Cells*, **17**, 570-574.
- [83] Solar I., Mullereberhard U., Shivro Y., Shaklai N. (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 51-58.
- [84] Miller F. N., Tangelder G. J., Slaaf D. W., Reneman R. S. (1991), *Blood Cells*, **17**, 555-556.
- [85] Ben-Hur E., Rosenthal I., Granot (Graziani) Y. (1993), *Photochem. Photobiol.*, **57**(6), 984-988.
- [86] Ben-Hur E., Orestein A. (1991), *Int. J. Radiat. Biol.*, **60**(1/2), 293-301.
- [87] Ben-Hur E., Nagelkerke J. F., Dubbelman T. M. A. R., Van Stevenincks J. (1992), *Int. J. Radiat. Biol.*, **6**, 767-772.
- [88] Rosenthal I., Ben-Hur E. (1992), *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**(4), 481-486.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Uniwersytet Łódzki
Katedra Biofizyki Ogólnej

Emilia Krajewska, Maria Bryszewska

PHOTODYNAMIC THERAPY

This article describes the term of photodynamic therapy, a relatively new way of cancer treatment and gives the review of the commonly used photosensitizers, especially the phthalocyanines and their way of action. The last part is devoted to the action of PDT on human erythrocytes.