

4. FOTOSENSIBILIZATORIAI

Fotosensibilizatoriai – junginiai, padidinantys kitų medžiagų jautrumą šviesai. Biologiniuose objektuose fotosensibilizatoriai ląstelėms ar jų sudedamosioms dalims suteikia jautrumą šviesai. Sensibilizatoriais dažniausiai būna heterociklinių žiedų struktūros medžiagos, kurios sugertų šviesos fotonų energiją perduoda kitoms molekulėms. Šio vyksmo metu sužadintos į aukštesnes energetines būsenas molekulės inicijuoja fotochemines reakcijas, sukeldamos ląstelių ar jų organelių pažeidimus. Pažeidimų vieta priklauso nuo to, kur susikaupęs sensibilizatorius, nes sužadintos molekulės gyvuoja labai trumpai ir negali toli nukeliauti. Taigi pirminis FNT aktas vyksta sensibilizatoriaus susikaupimo vietoje jo molekulei sugėrus šviesos kvantą. Šio vyksmo efektyvumą lemia sensibilizatorių spektrinės savybės, kurios bus plačiau aptartos šiame skyriuje.

4.1. Kokie fotosensibilizatoriai tinkamiausi FNT?

Nuo sensibilizatoriaus fotofizikinių ir fotocheminių savybių priklauso sensibilizavimo efektyvumas. Fotosensibilizacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių yra daug, tačiau ne visi jie tinka FNT. Kad būtų tinkamas naudoti FNT, fotosensibilizatorius turi turėti tam tikras savybes.

Sukaupta patirtis suformavo kriterijus “idealiam” fotosensibilizatoriui:

1. netoksiškas tamsoje ir nesukelia pašalinio poveikio;
2. farmakokinetinės savybės tokios, kad:
 - a) daug geriau kaupiasi navikiniame audinyje nei sveikame;
 - b) gana greitai pašalinama iš organizmo;
 - c) silpnai kaupiasi odoje;
 - d) kaupiasi arti gyvybiškai svarbių arba jautrių pažeidoms ląstelės vietų;
3. yra vienalytės cheminės sudėties;
4. gerai sugeria šviesą audinių skaidrumo ruože – raudonojoje spektro srityje (600–900 nm);
5. turi didelį sužadinimo į tripletinę būseną kvantinį našumą;
6. turi didelį singuletinio deguonies generavimo kvantinį našumą;
7. yra optimaliai fotostabilus.

Realūs fotosensibilizatoriai visų reikiamų savybių neturi. Kartais vienos savybės gali kompensuoti kitas, pavyzdžiui, geras kaupimasis navikiniame audinyje kompensuoja mažesnę tripleto kvantinį našumą ir atvirkščiai. Kadangi piktybinių susirgimų spektras

labai platus, suprantama, kad vienas sensibilizatorius negali patenkinti visų poreikių. Kiekvienam atvejui gali būti tinkamesnis, turintis ryškesnes tam tikras savybes, fotosensibilizatorius.

Netoksiškas tamsoje ir nesukelia pašalinio poveikio. Viena iš pagrindinių pageidaujamų bet kurio vaisto savybių yra jo minimalus pašalinis poveikis visam organizmui išlaikant gydomąsias savybes.

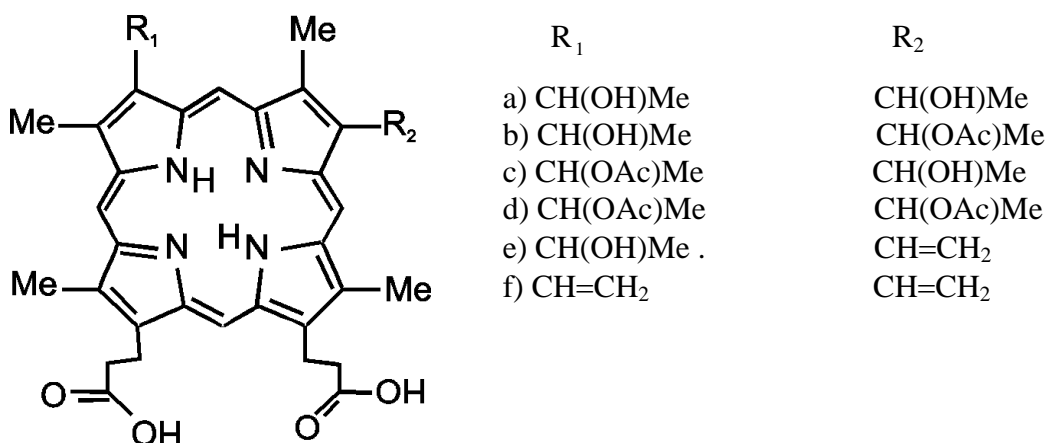
Farmakokinetinės savybės, užtikrinančios geresnę sensibilizatorius kaupimąsi navikiniame audinyje nei sveikame ir gana greitas pasišalinimas iš organizmo. Palyginti su kitais navikinių susirgimų gydymo metodais, svarbiausias FNT privalumas yra selektyvumas, kurį užtikrina geresnis fotosensibilizatoriaus kaupimasis navikiniuose audiniuose. Kai fotosensibilizatoriaus koncentracijų skirtumas navikiniame ir sveikame audinyje yra pakankamas, švitinimo metu ardomi tik navikiniai audiniai, o aplinkiniai sveiki audiniai lieka nepažeisti. Organizme susikaupęs sensibilizatorius padidina jo jautrumą šviesai, todėl greitai jam pasišalinus organizmas bus apsaugotas nuo galimų šalutinių šviesos efektų.

FNT efektyvumas priklauso nuo įvairių fiziologinių ir fizikinių bei cheminių parametrų. Kaip į veną suleistas fotosensibilizatorius pasiskirsto ir yra pernešamas organizme, priklauso ir nuo sensibilizatoriaus savybių: lipofilinės prigimties sensibilizatoriai jungiasi su didelio ir mažo tankio lipoproteinais, o hidrofilinės prigimties sensibilizatoriai – su albuminais ir kitais kraujo serumo baltymais. Nuo sensibilizatoriaus lipofiliškumo ar hidrofiliskumo priklauso jų lokalizacija ir galimi taikiniai navikinėse ląstelėse (žr. 3.3 pav.). Sensibilizatoriai, kurie kaupiasi jautriausiose pažaidoms vietose ar arti gyvybiškai svarbių ląstelės taškų, efektyviausiai veiks navikines ląsteles.

Šiuo metu laikomasi nuomonės, kad lipofilinės prigimties sensibilizatoriai selektyviau kaupiasi navikuose (Berg ir kt., 1989). Kitos savybės, tokios kaip asimetrinis krūvio pasiskirstymas, anijoninės–katijoninės formos, polinkis sudaryti agregatus, taip pat turi įtakos optimaliai fotosensibilizatoriaus lokalizacijai (Paquette ir kt., 1988). Lipofiliniai sensibilizatoriai lengviau praeina pro membranas ir kaupiasi tose vietose, kurių pažaidos labiau žalingos ląstelei (Winkelman ir Kimel, 1990). Hidrofilinių sensibilizatorių efektyvumas, palyginti su panašų singuletinio deguonies generavimo našumą turinčių lipofilinių sensibilizatorių efektyvumu, yra mažesnis (Moan, 1990).

Silpnas kaupimasis odoje. Oda yra labiausiai šviesos veikiamą kūno dalis, tad pašalinis fotosensibilizatorių poveikis pirmiausia pasireiškia joje. Todėl viena iš būtinų sensibilizatoriaus savybių – kuo silpnesnis kaupimasis odoje.

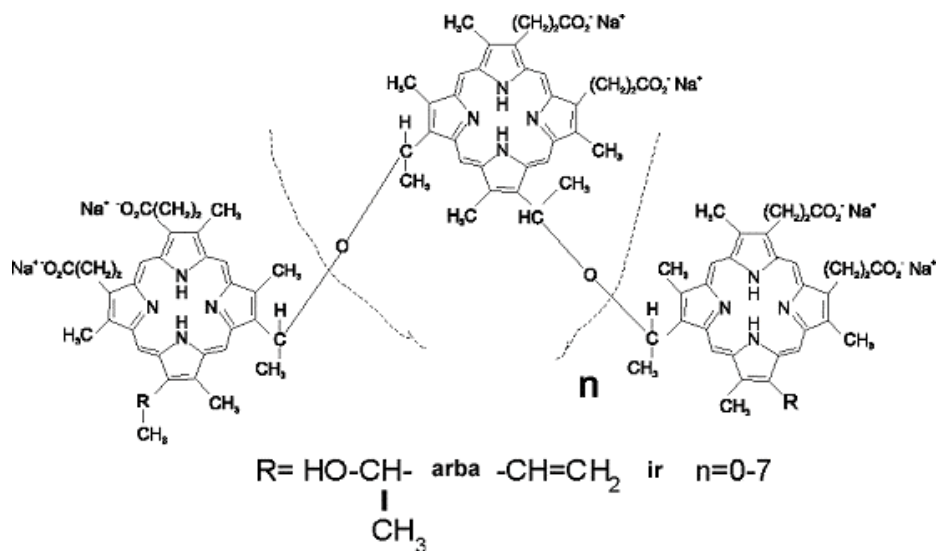
Vienalytė cheminė sudėtis. Šis reikalavimas nėra tiesiogiai susijęs su FNT efektyvumo didinimu ar optimizavimu, tačiau vienalytės sudėties medžiagos užtikrina sukeltų fotoefektų vienalytiškumą ir tikslią numatomų FNT vyksmų eigą. Toliau pateikti duomenys apie porfirininės prigimties fotosensibilizatorių nevienalytiškumo tyrimus ir jų įtaką fotosensibilizacijos procesui aiškiai rodo, kokias problemas tenka spręsti diegiant medicininėje praktikoje nevienalytės cheminės sudėties fotosensibilizatorių.



4.1 pav. Hematoporfirino acetilavimo produktai

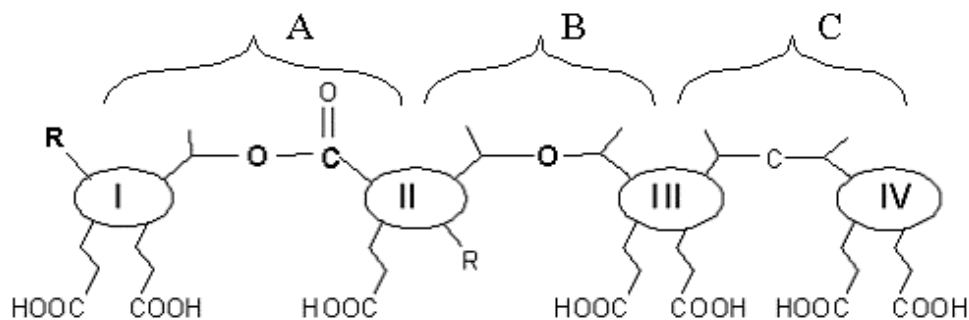
Porfirinai, kurių selektyvus kaupimasis navikiniuose audiniuose buvo pastebėtas dar 1942 metais (Auler ir Banzer, 1942) ir kurie, nors ir gana silpnai, sugeria ir raudoną šviesą, buvo pirmieji FNT panaudoti fotosensibilizatoriai. Tiesa, pirminė jų paskirtis buvo navikų diagnozavimas (Peck ir kt., 1955; Rassmussen–Taxdal ir kt., 1955). Iš pradžių buvo naudojamas hematoporfirinas (Hp) (iš tikrųjų – neišgrynintas įvairių porfirinų mišinys). Vėliau paaiškėjo, kad būtent priemaišos geriau už hematoporfiriną kaupiasi navikiniame audinyje (Schwartz ir kt., 1955). Po kelerių metų Lipsonas su bendraautorais pasiūlė metodą, kaip iš hematoporfirino, naudoto iki tol, gauti daug efektyvesnį fotosensibilizatorių (Lipson ir kt., 1961). Porfirinas buvo veikiamas acto ir sieros rūgščių mišinio, o susidaręs produktas hidrolizuojamas natrio šarmu. Išanalizavus gautą mišinį nustatyta, kad pagrindiniai komponentai yra: hematoporfirino (4.1 pav., a) hidrochloridas, hematoporfirino monoacetato izomerai (4.1 pav., b ir c), hematoporfirino diacetatas (4.1 pav., d). Mišinyje taip pat rasta hidroksietilvinildeuteroporfirino (4.1 pav., e) ir protoporfirino (4.1 pav., f). Šis mišinys buvo pavadintas hematoporfirino dariniu (HpD). Pasirodė, kad jis kur kas geriau negu Hp kaupiasi navikiniame audinyje. Atlikus HpD gelfiltraciją paaiškėjo, kad aktyviausios medžiagos yra makromolekulinėje

frakcijoje (Dougherty ir kt., 1984). Apdorojimas šarmu yra labai svarbus, nes taip susidaro polimerai, kovalentiškai sujungti tarp savęs eterinėmis ir esterinėmis jungtimis (Boyle ir kt.,1987; Kessel ir kt.,1985). Šito mišinio, vadinamo polihematoporfirino eteriu/esteriu, oligomerai vandeniniame tirpale jungiasi į dar didesnius agregatus, kurie sudaro aktyviają HpD dalį. Kol kas vienintelis vaistinę formą turintis fotosensibilizatorius fotofrinas II (Quadra Logic Technologies, Inc., Kanada) yra išvalyto HpD frakcija, praturtinta oligomeriniais asociatais (jie sudaro apie 80%) (4.2 pav.). Likusią dalį (apie 15–20%) sudaro monomeriniai porfirinai – hematoporfirinas, hidroksietilvinildeuteroporfirinas (HVD) ir protoporfirinas (Pp). Kai kurios šalys gamina savo pirmos kartos fotosensibilizatorius, kurie yra atitinkamai apdoroti hematoporfirino dariniai – tai fotosanas (Vokietija), fotohemas (Rusija), fotokarcinorinas (Kinija), hematodreksas (Bulgarija).



4.2 pav. Fotofrino[®] struktūra

Po gausių ir išsamių HpD agreguotosios frakcijos sudėties tyrimų padaryta išvada, kad ją sudaro hematoporfiriniai, eterinėmis ir/ar esterinėmis jungtimis arba C–C ryšiu susijungę į dimerus ar didesnius agregatus (4.3 pav.) (Dougherty ir kt., 1984; Boyle ir kt.,1987; Kessel ir kt.,1985; Land ir kt., 1986).



4.3 pav. Galima HpD tetramero struktūra

Ši frakcija geriausiai kaupiasi navikiniuose audiniuose ir turi geras sensibilizacines savybes (Dougherty ir Mang, 1987; Kessel, 1986). Vandeniniuose tirpaluose šie kovalentiniais ryšiais sujungti dariniai dėl nekovalentinių sąveikų jungiasi į didesnius agregatus, kurių molinės masės siekia 20000–30000 (Swincer ir kt., 1985). Fotofrino sudėtyje esantys porfirinų monomerai (Hp, HVD, Pp) taip pat sudaro nekovalentinius agregatus, kurie skiedžiant tirpalą disocijuoja. Kovalentiniais ryšiais sujungti agregatai skiedžiant nedisocijuoja ir gali tokio pat pavidalo egzistuoti sistemose *in vivo* (Moan ir kt., 1985).

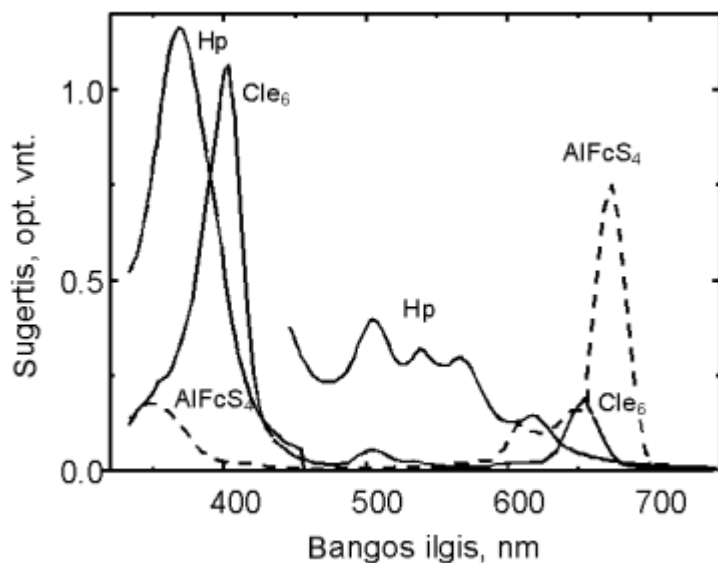
Jau seniai žinoma, kad vandeniniuose porfirinų tirpaluose egzistuoja monomerų ir agregatų mišiniai (Brown ir kt., 1976). Porfirinų agregacija yra aktualus klausimas, nes FNT efektyvumas priklauso nuo sensibilizatorių agregacinių savybių. Porfirinų agregacija susijusi su aplinkos sąlygomis: agregacijos laipsnis kinta priklausomai nuo sensibilizatoriaus koncentracijos (Brown ir kt., 1976; Pottier ir kt., 1985), tirpiklio poliškumo (Redmond ir kt., 1985), temperatūros (Bottiroli ir kt., 1984). Porfirinų agregotų būsenų tyrimai padeda suprasti fizikines, chemines ir biologines savybes, nulemiančias jų elgseną FNT metu, nes agregacijos pokyčiai veikia tripletinės būsenos (Redmond ir kt., 1985; Smith, 1985; Truscott, 1986) ir singuletinio deguonies generavimo kvantinius našumus (Moan, 1984), fluorescencijos gyvavimo trukmes (Yamashita ir kt., 1984), sąveiką su biomolekulėmis (Grossweiner ir Goyal, 1984) ir sensibilizacinį efektyvumą (Moan ir Sommer, 1984).

Pastebėjus, kad FNT efektyvumas susijęs su sensibilizatorių agregacija, porfirinų agregatinių būsenų tyrimui skirta nemažai dėmesio (Brown ir kt., 1976; Pottier ir Truscott, 1986). Reikia pabrėžti, kad tiriant porfirinų agregatines būsenas kalbama apie dviejų rūšių agregatus: sąlyginai juos galima pavadinti cheminiais ir fizikiniais. Pirmuoju atveju nagrinėjamos cheminiais ryšiais sujungtos struktūros, daugiausia jau minėti

polihematoporfirinų eteriai ir esteriai. Svarbiausias tokių tyrimų metodas – chromatografinė analizė. Kitos rūšies agregatai, susidarantys dėl fizikinės prigimties sąveikų tarp porfirinų molekulių, dažniausiai tiriami spektroskopiniais metodais. Kurie agregatai – cheminiai ar fizikiniai – yra aktyvesni FNT, nėra iki galo aišku, tačiau yra žinoma, kad agreguotos struktūros veikia efektyviau.

Nustatyta, kad di- ar polihematoporfirinų eteriai/esteriai – vienintelė fotosensibilizatorių HpD ir fotofrino II frakcija, kuri gerai kaupiasi ląstelėse (Moan ir Sommer, 1983) ir, matyt, yra atsakinga už fotosensibilizuotus vyksmus (Moan ir kt., 1982). HpD ir fotofrinas II yra sudėtingi mišiniai, kuriuose minėti polieteriai/esteriai sudaro tik vieną frakciją. Tai, kad šie junginiai nehomogeniški, yra rimta kliūtis jų struktūrų, agreguotų būsenų, fotosensibilizacinių savybių tyrimui. Todėl buvo sintetinami homogeninės sudėties hematoporfirinais, kurie savo savybėmis būtų panašūs į HpD. Iš jų geriausiomis fotosensibilizuojančiomis savybėmis pasižymi hematoporfirino mono- ir diacetatai ir kai kurie hematoporfirinų alkileteriai (Sommer ir kt., 1987).

Gera šviesos sugertis audinių skaidrumo ruože – raudonojoje spektro srityje (600–900 nm). FNT efektyvumas tiesiogiai priklauso nuo sensibilizatoriaus sugertų šviesos fotonų, kurie gali inicijuoti navikinių ląstelių pažaidas, kiekio. Įvairūs fotosensibilizatoriai turi savitą sugerties spektrą ir skirtingą šviesos fotonų sugerties tikimybę. Fotosensibilizatoriaus sugertų šviesos fotonų kiekis priklauso nuo jo ekstinkcijos koeficiento ties švitinimo bangos ilgiu. Fotosensibilizatorių efektyvumas FNT gali būti skirtingas tik dėl to, kad jų ekstinkcijos koeficientai, sąlygojantys švitinimo šviesos fotonų sugertį, yra skirtingi (4.4 pav.).



4.4 pav. Hematoporfirino, chlorino e₆ ir aliuminio ftalocianino tetrasulfonato sugerties spektrai

Esant vienodoms kitoms FNT efektyvumą lemiančioms sąlygoms, Hp sensibilizacinis efektyvumas bus mažesnis nei chlorino e₆, o jų abiejų – mažesnis negu aliuminio ftalocianino. Pastarojo ekstinkcijos koeficientas ties švitinimo bangos ilgiu, lemiantis šviesos fono sugerties tikimybę, yra didžiausias (4.4 pav.). Šviesos kvanto sugertis – tai tik pirmasis fotosensibilizacinio vyksmo žingsnis, pradedantis visą seką pirminių fotofizikinių procesų, kurių efektyvumas priklauso ir nuo sensibilizatoriaus fotofizikinių bei fotocheminių savybių, ir nuo aplinkinės terpės savybių.

Didelis sužadinimo pernašos į tripletinę būseną kvantinis našumas yra labai svarbus fotosensibilizatoriaus parametras, nuo kurio priklauso FNT proceso efektyvumas. Sužadinta singuletinė sensibilizatoriaus būseną gyvuoja trumpai, todėl FNT reikšmingų pirminių fotocheminių vyksmų tikimybė šioje būsenoje nedidelė. Tripletinė sensibilizatoriaus būseną gyvuoja daug ilgiau, tad ir pirminių fotocheminių vyksmų našumas daug didesnis.

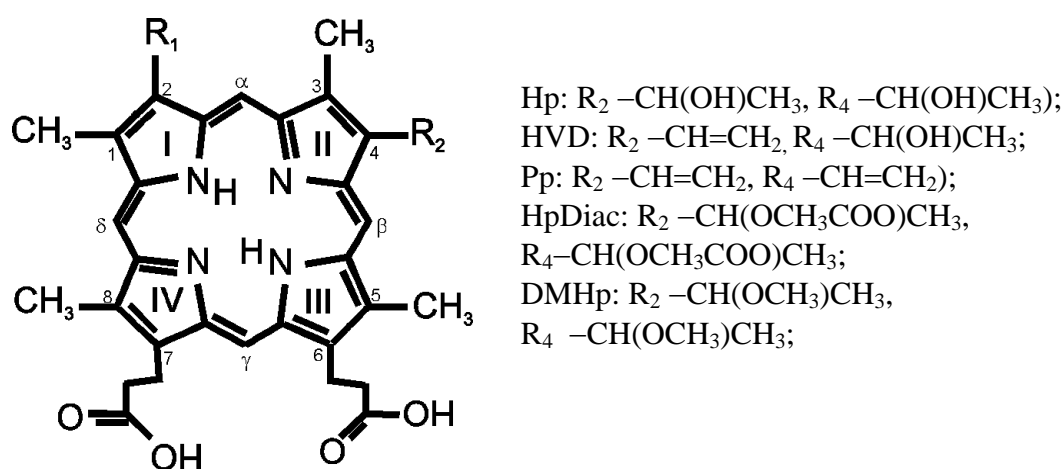
Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad sensibilizatoriaus *didelis singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas* yra vienas iš pagrindinių veiksnių sėkmingam FNT rezultatui pasiekti. Sensibilizuotų reakcijų metu susidaręs singuletinis deguonis yra bene svarbiausias tarpininkas, trikdamas ląstelės veiklą.

Ne mažiau svarbus veiksnys yra paties *sensibilizatoriaus fotostabilumas*. Sensibilizatoriui esant nestabiliam, tai švitinimo metu jis gali suirti greičiau negu įvyks

navikinės ląstelės destrukcija. Kita vertus, jo suirimas FNT metu mažina koncentraciją ir drauge sušvelnina neigiamą poveikį po švitinimo.

4.2. Pirmosios kartos sensibilizatorių nuostovioji sugerties spektroskopija

Nuostoviosios sugerties spektroskopijos ir nenuostoviosios sugerties spektroskopijos su laiko skyra (4.3 sk.) metodais ištirtos spektrinės ir pirminės fotofizikinės pirmos kartos sensibilizatorių savybės ir jų priklausomybė nuo įvairių aplinkos parametrų. Šių tyrimų rezultatai leidžia optimizuoti FNT vyksmą ir prognozuoti naujų fotosensibilizatorių paieškos kryptis.

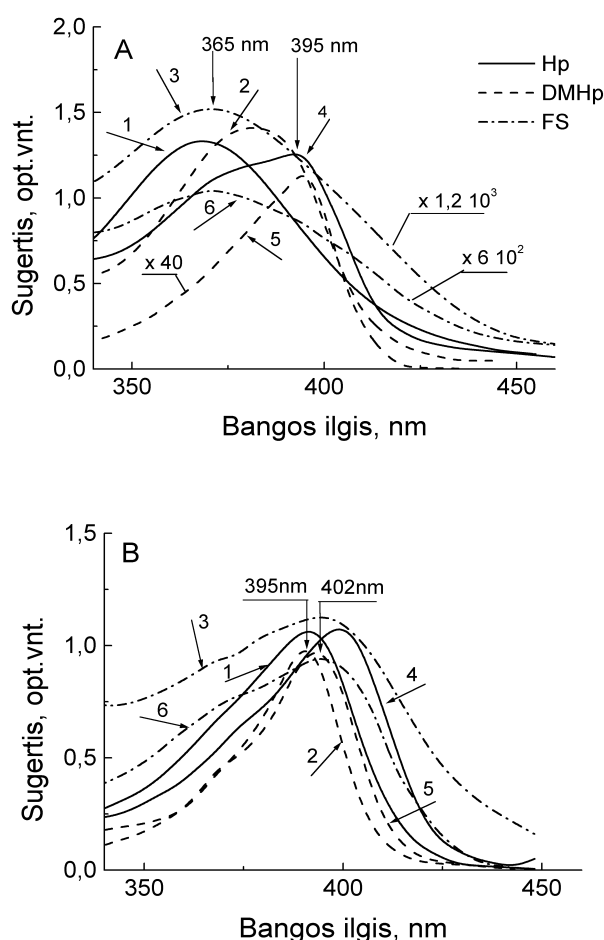


4.5 pav. Porfirinai

Porfirinų cheminės struktūros pagrindą sudaro porfino ciklas, susidedantis iš 4 pirolo žiedų, sujungtų tarp savęs metino ($-CH=$) tilteliais. Porfirinai yra labai įvairūs, nes H atomai pirolo žieduose ir metino tilteliuose gali būti pakeisti įvairiais pakaitais (4.5 pav.). Šiuo metu yra žinoma per 1000 porfirinų, gamtinių ir sintetinių, ir jų skaičius nuolat didėja. Kaip matyti iš molekulinės struktūros ir pakaitų įvairumo, porfirinai pasižymi tiek rūgštinėmis, tiek bazinėmis savybėmis ir, priklausomai nuo terpės pH, azoto atomai ir pakaitų funkcinės grupės gali protonuotis arba jonizuotis. Vidumolekulinę porfirinų energetiką bei struktūrą geriausiai atspindi jų sugerties ir fluorescencijos spektrai. Visiems porfirinams būdinga intensyvi sugerties juosta su smaile maždaug ties 400 nm, vadinama Sore (Soret) juosta (SJ), ir keturios mažiau intensyvios ($\cong 1/10$ SJ) juostos matomoje spektro srityje, vadinamos Q juostomis. Q juostų skaičius priklauso nuo pirolo žiedų azoto atomų protonavimo ir nuo to, ar porfirinas yra laisva bazė, ar chelatinis junginys. Porfirinų laisvų bazių spektrai skirstomi į keturis spektrų tipus (Smith, 1975). Ši

klasifikacija pagrįsta keturių Q juostų intensyvumų santykiu, kuris savo ruožtu priklauso nuo šoninių grupių pakaitų kiekio ir padėties.

FNT naudojamų porfirinų spektras yra etio tipo. Šiems spektrams būdingas sugerties juostų intensyvumo mažėjimas didėjant bangos ilgiui (4.4 pav.). Tokie yra visų gamtinių porfirinų (proto-, kopro-, uro-, deuterio-, hemato-, piroporfirinų) neutralių vandeninių tirpalų sugerties spektrai. Visi mūsų tirtieji porfirinai – hematoporfirinas (Hp), hematoporfirino darinys (HpD), hematoporfirino diacetatas (Hp-Diac), hematoporfirino dimetilo eteris (DMHp), fotosanas (FS) ir fotofirinas (FF) yra etio tipo porfirinai.



4.6 pav. Porfirinų sugerties spektrai. A. Fosfatiniame buferyje (pH 7,2) 1,2,3–10⁻³ M, 4,5,6–10⁻⁶ M; B. 1,2,3 – etanolyje ir 4,5,6 – vandeniniame tirpale, į kurį įdėta detergento tritono X-100

Porfirinų sugerties spektrai yra labai jautrūs įvairioms sąveikoms, kurios gali pasireikšti tiek molekulės centre, tiek periferijoje. Sugertis kinta porfirino molekulei sudarant kompleksus, agreguojant, jonizuojantis, protonuojantis ir t. t., todėl sugerties

spektrai gali suteikti daug informacijos apie molekulės struktūrą, agregatinę būseną, sąveiką su kitomis molekulėmis.

Tirtųjų pirmos kartos sensibilizatorių – Hp, DMHp, HpD, FS – sugerties spektrai turi porfirinams būdingą intensyvią SJ 360–400 nm intervale ir keturias mažiau intensyvias sugerties juostas matomoje spektro srityje. Agreguotų būsenų pokyčius geriausiai atspindi SJ poslinkiai, todėl minėtų junginių agregacinės savybės buvo tiriamos matuojant jų įvairių koncentracijų vandeninių ir kitokių terpių tirpalų sugerties spektrus 250–450 nm intervale. Matavimų rezultatai pateikti 4.1 lentelėje ir 4.6 paveiksle (Strečkytė ir Rotomskis, 1993 a; Strečkytė ir Rotomskis, 1993 b).

4.1 lentelė. Porfirinų tirpalų spektrinės charakteristikos

Tirpalas	C, M	SJ λ_{maks} , nm	SJ $\Delta\nu/2 \cdot 10^3$ cm^{-1}	I Q λ_{maks} , nm	I Q $\Delta\nu/2 \cdot 10^3$ cm^{-1}	IV Q λ_{maks} , nm	IV Q $\Delta\nu/2 \cdot 10^3$ cm^{-1}
Hp/FB	10^{-3}	365	4,1	617	–	506	–
	10^{-4}	369	4,2	617	–	505	–
	10^{-5}	373	4,1	615	–	505	–
	10^{-6}	395	4,0	612	–	503	–
	10^{-7}	394	4,0	–	–	–	–
/EtOH	10^{-4}	396	3,2	623	0,9	501	0,4
/T 1%	10^{-4}	402	3,3	619	1,1	501	0,45
DMHp/FB	10^{-3}	382	3,6	619	0,6	506	1,4
	10^{-4}	384	3,4	617	0,6	504	1,2
	10^{-5}	393	3,4	617	0,6	505	1,2
	10^{-6}	395	2,4	613	0,55	503	0,9
	10^{-7}	396	2,0	611	0,45	502	0,9
	10^{-8}	397	1,7	607	–	497	–
/EtOH	10^{-4}	396	2,1	617	0,4	498	0,9
/T 1%	10^{-4}	401	2,1	621	0,25	498	0,95
HpD/FB	10^{-3}	367	4,6	619	–	507	–
	10^{-4}	368	4,2	620	–	506	–
	10^{-5}	370	4,3	–	–	505	–
	10^{-6}	372	3,2	–	–	503	–
	/EtOH	10^{-4}	396	3,85	621	–	501
/T 1%	10^{-4}	400	3,4	622	0,4	501	1,2
FS/FB	$5,5 \cdot 10^{-3}$	367	5,4	621	–	509	–
	10^{-5}	368	5,3	619	–	508	–
	10^{-6}	370	6,0	615	–	507	–
	10^{-7}	372	6,1	–	–	–	–
	/EtOH	10^{-4}	396	3,7	625	–	505
/T 1%	10^{-4}	402	4,2	621	–	502	–

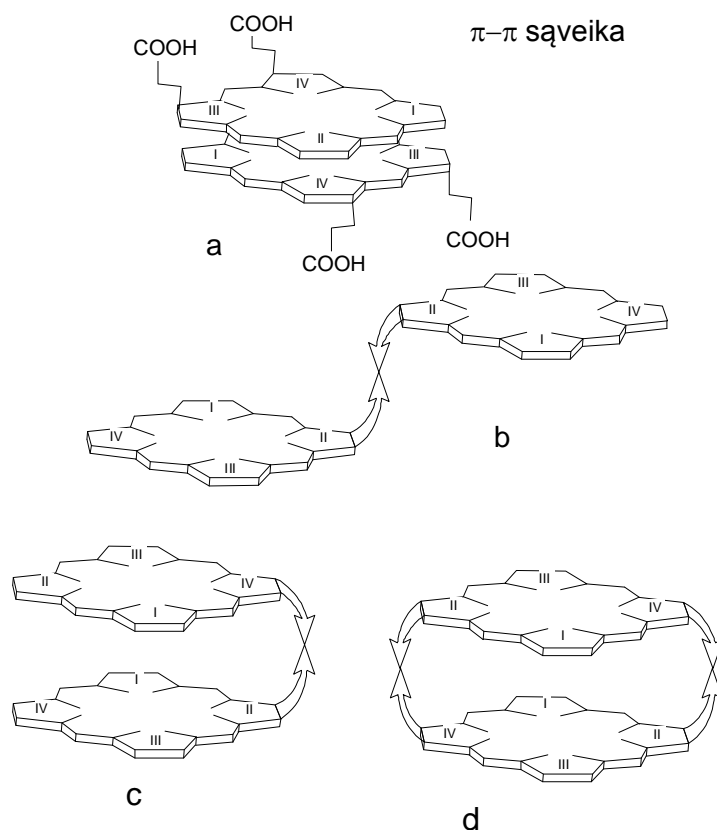
$\Delta\nu/2$ – sugerties juostos pusplotis; FB – fosfatinis buferis, pH 7,2; EtOH – etanolinis tirpalas; T 1%– į tirpalą įdėta detergento tritono X–100 (agregatus ardančios medžiagos)

Didelės koncentracijos vandeninių Hp, HpD ir FS tirpalų SJ sugerties smailė yra ties 365 nm (DMHp – ties 382 nm) ir atspindi agregatinių darinių sugertį. Nežymus petys SJ ilgabangėje pusėje yra monomerų sugerties indėlis. Spiritas ir kiti organiniai tirpikliai išardo fizikinius (pusiausvirovius) agregatus, tad spiritiniuose porfirinų tirpaluose egzistuoja tik monomerai ir kovalentiniais ryšiais sujungtos struktūros. Skiedžiant vandeninius tirtųjų porfirinų tirpalus vyksta SJ intensyvumo persiskirstymas (4.1 lentelė, 4.6 pav.). Esant mažoms koncentracijoms vandeninių Hp ir DMHp tirpalų spektrai panašūs į spiritinių tirpalų spektrus. Labai praskiestuose tirpaluose pusiausvirieji agregatai suyra ir tirpale egzistuoja tik monomerai ir kovalentiškai surištos struktūros. Tokių tirpalų sugerties maksimumas yra ties 396 nm. Nedidelės koncentracijos tirpaluose pirmiausia, matyt, susidaro dimerai (Karns ir kt., 1979). Siūlomą tokio pusiausviro dimero, dar vadinamo “sendvičio” tipo, struktūrą sudaro du porfirino žiedai, persiklojantys taip, kad 2– ir 4–os padėčių pakaitai patenka į persiklojančius paviršius. Pakaitai dalyvauja π – π sąveikoje tarp dviejų aromatinių žiedų ir iš dalies dėl to tokie dimerai yra patvarūs. Neigiamą krūvį turinčios propioninės rūgšties liekanos išsidėsto taip, kad atsidurtų kuo toliau vienos nuo kitų (4.7 pav., a).

Iš atliktų gausių spektroskopinių tyrimų paaiškėjo, kad susiformuojant pusiausviriams dimerams (4.7 pav., a) SJ pasislenka į trumpabangę spektro pusę (800–1800 cm^{-1}), $\Delta\nu$ didėja, o Q juostos neženkliai (100–300 cm^{-1}) pasislenka į raudonąją spektro pusę (Kuzmitskij ir kt., 1987; Rotomskis, 1989). Susidarant linijiniams dimerams (4.7 pav., b) SJ išplatėja ir kartais neženkliai pasislenka į raudonąją spektro pusę – kitaip negu pusiausvirųjų agregatų atveju (Selensky ir kt., 1981; Rotomskis, 1991).

Iš Hp, DMHp, HpD ir FS spektrinių charakteristikų priklausomybės nuo koncentracijos (4.1 lentelė, 4.6 A pav.) buvo nustatyta, kad šie porfirinai vandeniniuose tirpaluose egzistuoja pusiausvirųjų “sendvičio” tipo agregatų pavidalu (4.7 pav., a) (Strečkytė ir Rotomskis, 1993 b; Rotomskis ir kt., 1995 a). Hp SJ yra beveik dvigubai platesnė už DMHp SJ (4.1 lentelė), matyt, dėl to, kad Hp sudėtyje visada yra kovalentiniais ryšiais sujungtų linijinių agregatų (4.7 pav., b). Mažos koncentracijos FS tirpalų SJ maksimumas ties 370 nm ir gana didelis juostos plotis rodo, kad tirpale yra daug nemonomerinių darinių. Šie nemonomeriniai dariniai gali būti kelių rūšių. FS sudėtyje esančios kovalentiniais ryšiais sujungtos struktūros, nepriklausomai nuo tirpalo koncentracijos, gali sudaryti dimerus (Kohler ir Getoff, 1989) (4.7 pav., c), kurie kartu su linijiniais agregatais (4.7 pav., b) sugeria šviesą šioje spektro srityje. Tirpaluose taip pat

gali egzistuoti ir kovalentiškai surišti “sendvičio” tipo agregatai (4.7 pav., d). Remdamiesi nuostoviosios sugerties spektroskopijos rezultatais (4.1 lentelė, 4.6 pav.) darome išvadą, kad vandeniniuose tirpaluose Hp, DMHp, HpD, FS sudaro pusiausvirus “sendvičio” tipo agregatus (4.7 pav., a). Šių agregatų buvimą rodo SJ intensyvumo ties 365 nm pokyčiai keičiantis tirpalų koncentracijai (4.6 A pav.).



4.7 pav. Agreguotų porfirininės kilmės molekulių struktūros: a – pusiausvirieji “sendvičio” tipo dimerai, b – kovalentiškai sujungti linijiniai dimerai, c ir d – kovalentiškai sujungti “sendvičio” tipo dimerai

Spiritiniuose ir labai praskiestuose vandeniniuose FS tirpaluose egzistuoja kovalentiškai sujungtų linijinių (4.7 pav., b), tarpmolekulinių (4.7 pav., c) ir “sendvičio” tipo (4.7 pav., d) agregatų mišiniai; Hp tirpaluose vyrauja kovalentiškai sujungti linijiniai agregatai (4.7 pav., b), DMHp – tik monomerai.

Šias išvadas patvirtina ir porfirinų spektrai, kai į tirpalus pridėta monomerizuojančios medžiagos – detergento tritono X-100 (T) (4.6 B pav.). Detergentas išardo pusiausvirose agregatus, įjungdamas porfirinų monomerus į micles (išnyksta SJ maksimumas ties 365 nm). DMHp spektre atsiranda siaura SJ, kurios maksimumas yra

ties 402 nm (sąveika su detergentu pastumia monomerų SJ į raudonąją spektro pusę). Platesnė Hp SJ liudija linijinių struktūrų priemaišas. Plati FS SJ ir petys ties 365 nm priklauso tarpmolekuliniams kovalentiškai sujungtų struktūrų dariniams (4.7 pav., c ir d), kurių detergentas neišardo.

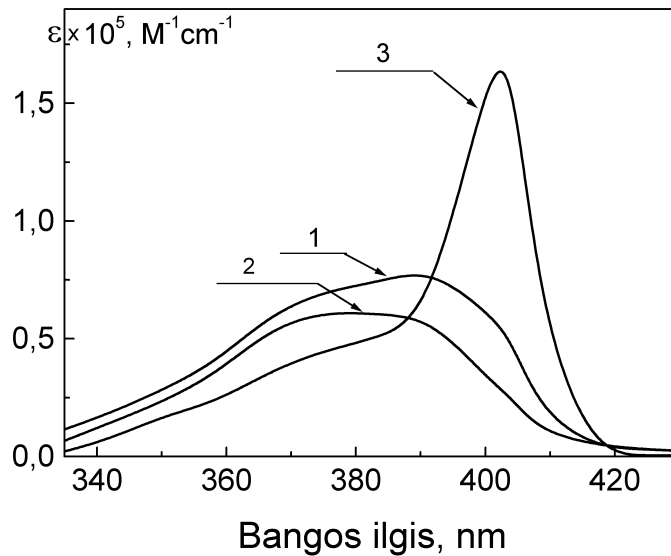
HpD, FS ir panašūs agreguoti porfirinų dariniai yra daug efektyvesni FNT negu grynas Hp. Kadangi HpD ir FS sudėtyje yra daug "sendvičio" tipo agregatų, galima manyti, kad didesnis tokių struktūrų sensibilizacinis pajėgumas susijęs su specifine šių agregatų struktūra: juose makrociklą šoninės grupės įjungtos į agregatą ir visas darinys yra hidrofobiškesnis, dėl to mažiau sąveikauja su aplinka. Tokie dariniai geriau prasiskverbia pro ląstelių membranas, lengviau juda kraujo induose ir daugiau kaupiasi navikiniame audinyje.

Spektrinių savybių pokyčiai kintant tirpalų koncentracijai rodo, kad Hp–Diac tirpaluose, nelygu koncentracija, susiformuoja įvairaus agreguotumo laipsnio dariniai (Kapočiūtė ir kt., 1989). Pagal spektrinių parametrų (λ_{maks} , $\Delta\nu$, ϵ , agregatų ir monomerų sugerties juostų intensyvumų santykis) pokyčius visa tirtųjų koncentracijų skalė gali būti padalyta į tris intervalus: 1. $> 2 \cdot 10^{-6}\text{M}$; 2. nuo $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$ iki $2 \cdot 10^{-8}\text{M}$; 3. $< 2 \cdot 10^{-8}\text{M}$. Koncentracijai artėjant prie pirmojo intervalo ribos Hp–Diac SJ maksimumas pasislenka nuo 370 nm iki 393 nm. Pirmųjų dviejų intervalų ribose mažėjant koncentracijai didėja ϵ ties 395 nm (nuo 0,86 iki $1,22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mažėja $\Delta\nu$ (nuo 4,4 iki $2,7 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$) ir santykis tarp monomerų ir agregatų SJ sugerties intensyvumų (nuo 1,04 iki 0,64). Esant $2,3 \cdot 10^{-8}\text{M}$ koncentracijai SJ sugerties maksimumas yra ties 395 nm; toliau skiedžiant tirpalą didėja ϵ_{395} (iki $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), $\Delta\nu$ stabilizuojasi ir yra $\cong 2,4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Esant mažiausioms koncentracijoms ϵ_{395} ir $\Delta\nu$ vertės yra labai artimos vertėms spiritiniame tirpale (kur egzistuoja tik Hp–Diac monomerai). Remiantis gautais rezultatais (Kapočiūtė ir kt., 1989) siūlomas trijų pakopų deagregacijos procesas. Esant didelėms koncentracijoms Hp–Diac yra stipriai agreguotas ir tokio tirpalo SJ maksimumas yra ties 370 nm. Nedideli agregatai (oligomerai) gali susijungti į didesnius darinius – konglomeratus, kurie yra gana stabilūs, nes skiedžiant tirpalus nuo 10^{-4} iki $4 \cdot 10^{-5}\text{M}$ nekinta nei λ_{maks} , nei $\Delta\nu$. Toliau mažėjant koncentracijai vyksta pirmoji deagregacijos stadija, kuriai būdinga didelių agregatų disociacija į mažesnius – dimerus ir trimerus. Šį procesą lydi sugerties ties 370 nm mažėjimas ir ilgabangis SJ postūmis. Stadijos pabaigoje tirpale vyrauja maži agregatai ir nedidelis kiekis monomerų. Antrajam koncentracijų intervalui būdingas mažų agregatų skilimas į monomerus. Šio proceso metu

SJ slenka į ilgabangę spektro pusę ir koncentracijų intervalo pabaigoje yra ties 395 nm – tirpale lieka labai nedaug smulkių agregatų. Trečioje deagregacijos stadijoje praktiškai visi dimerai (ir trimerai) disocijuoja į monomerus. Apskaičiuota Hp–Diac dimerizacijos konstanta $K_D = 2,8 \cdot 10^6$ M (Kapočiūtė ir kt., 1989) yra tos pačios eilės kaip Hp (Brown ir kt., 1976), mezoporfirino ir 2,4–dibromdeuteroporfirino (Turay ir kt., 1978).

Į organizmą patekusio fotosensibilizatoriaus selektyvus pasiskirstymas ir laikas, per kurį jis įvyksta, priklauso nuo sensibilizatoriaus cheminės struktūros, jo hidrofobinės–hidrofilinės prigimties, agregatinės būsenos ir jonizacijos. Visiems navikams yra būdinga mažesnė negu normalių audinių pH vertė (Thistlethwaite ir kt., 1985). Kadangi dauguma porfirinų yra amfoterinės prigimties medžiagos, tikslinga tyrinėti, kokios joninės būsenos vyrauja įvairiuose pH intervaluose, nes nuo jų taip pat gali priklausyti sensibilizatoriaus selektyvus pasiskirstymas navikiniame audinyje (Pottier ir Kennedy, 1990).

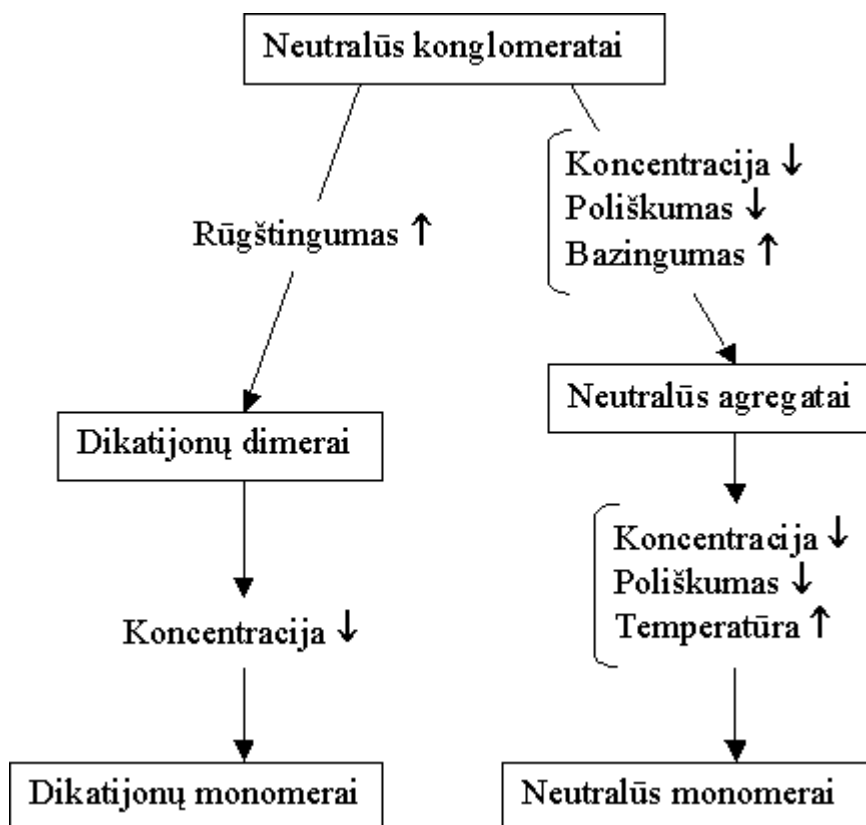
FNT požiūriu ypač svarbus pH intervalas 6–7, kadangi šios pH vertės būdingos daugeliui navikų (Wike–Hooley ir kt., 1984). Tiriant pirmos kartos sensibilizatorių savybių priklausomybę nuo įvairių aplinkos parametrų, o ypač nuo terpės rūgštingumo, buvo pasirinktas homogeninės sudėties fotosensibilizatorius – hematoporfirino diacetatas (Hp–Diac) (4.1 pav., d). Ištirtos Hp–Diac agregacijos pokyčių priklausomybės nuo pH (Kapočiūtė ir kt., 1989; Kapočiūtė ir kt., 1991). Rūgštinėje terpėje vyksta Hp–Diac imino azotų protonizacija ir Hp–Diac spektras turi dikatijoniniams porfirinams būdingą spektrą (4.8 pav.). SJ yra pasislinkusi į raudonąją spektro pusę ir Δv , palyginti su neutralaus Hp–Diac spektru, yra daug mažesnis. Matomos srities spektre išlieka tik dvi juostos. Tokie spektriniai pokyčiai vyksta dėl Hp–Diac molekulės konjuguotos π elektronų sistemos pasikeitimo iš D_{2h} į D_{4h} simetriją (Gurinovich ir kt., 1961). Esant didesnėms koncentracijoms tirpale egzistuoja dikatijonų dimerai, kurie mažėjant koncentracijai disocijuoja į monomerus.



4.8 pav. Hp–Diac sugerties spektrai pH:1–7,4; 2–5,9; 3–2,1

Dikatijoninių monomerų dimerizacijos konstanta $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Kapočiūtė ir kt., 1989). Ji yra dviem eilėmis mažesnė už neutralių monomerų dimerizacijos konstantą, matyt, dėl elektrostatinės stūmos tarp protonuotų Hp–Diac molekulių. Vertinant Hp–Diac spektrinių charakteristikų pokyčius įvairių pH verčių tirpaluose, galima išskirti tris pH intervalus: 1. > 6 ; 2. nuo 6 iki 4,5 ir 3. $< 4,5$. Pirmajame ir trečiajame intervale Hp–Diac egzistuoja atitinkamai neutralių molekulių ir dikatijonų pavidalu, tarpiniam intervalui būdingos abi formos. Šiam intervalui (nuo 6 iki 4,5) taip pat būdinga stipresnė agregacija. Koncentracijos, terpės poliškumo, rūgštingumo ir temperatūros pokyčių įtaka Hp–Diac agregatinėms būsenoms pavaizduota 4.9 paveiksle (Kapočiūtė ir kt., 1991).

Kaip jau minėta, FNT efektyvumas susijęs su porfirinų agregatinėmis būsenomis. Gauti rezultatai rodo, kad didelis agregacijos laipsnis mažos koncentracijos Hp–Diac tirpaluose esant navikams būdingoms pH vertėms gali būti susijęs su monokatijonų susidarymu ir jų sąveika su kitomis Hp–Diac formomis. Įvairios agreguotos formos, susidarančios šiame pH intervale, galėtų pagerinti Hp–Diac selektyvų kaupimąsi navikinime audinyje ir padidinti sensibilizacijos efektyvumą.



4.9 pav. Koncentracijos, terpės poliškumo, rūgštingumo ir temperatūros pokyčių įtaka Hp–Diac agregatinėms būsenoms

4.3. Pirmosios kartos sensibilizatorių nenuostovioji sugerties spektroskopija

Fotosensibilizatoriaus molekulei sugėrus šviesos fotoną, ji sužadinama į aukštesnę energinę būseną, iš kurios vyksta sužadavimo energijos relaksacijos procesai. Sužadinta sensibilizatoriaus molekulė energiją gali prarasti keliais būdais. Dalis molekulių energiją praranda vidinės konversijos būdu, kai šviesos fotono energija virsta šiluma. Priklausomai nuo sensibilizatoriaus savybių fotono energija taip pat gali būti išspinduliuota fluorescencijos pavidalu. Šis energijos praradimo kelias nesukelia fotosensibilizacinių procesų, tačiau gali būti sėkmingai panaudojamas diagnostavimo tikslams. Tik interkombinacinė konversija, kurios metu sensibilizatorius iš sužadintos singuletinės būsenos peršoka į sužadintą tripletinę būseną, užtikrina navikinių audinių destruktiją sukeltą fotosensibilizacijos procesą. Šio proceso efektyvumas – φ_{sens} – pirminėse stadijose gali būti įvertintas pasinaudojant formule:

$$\varphi_{\text{sens}} = (N_{\text{vk}} + N_{\text{fl}} + N_{\text{ik}}) / N_{\text{ik}} = N_{\text{hv}} / N_{\text{ik}}$$

čia: N_{hv} – šviesos fotonų sugėrusių sensibilizatoriaus molekulių skaičius; N_{vk} – sugertų fotonų, kurių energija virto šiluma, skaičius; N_{fl} – išspinduliuotų fluorescencijos kvantų skaičius, N_{ik} – sensibilizatoriaus molekulių, iš sužadintos singuletinės būsenos peršokusių į sužadintą tripletinę būseną, skaičius.

Sužadavimo energijos relaksacijos ir pernašos biologiškai aktyviuose pigmentuose tyrimai būtini norint suprasti FNT mechanizmą, fotosintezės reiškinį, šviesos ir biologinio objekto ar biologiškai aktyvių molekulių sąveikos visumą. Jau kelis dešimtmečius optinės spektroskopijos metodai plačiai taikomi sudėtingoms molekulėms bei molekuliniams dariniams tirti biotechnologijoje ir fotobiomedicinoje. Tačiau kai sudėtinguose biologiniuose dariniuose susipina kelios pirminių vyksmų grandinės, nuostoviosios spektroskopijos ir kinetinės fluorescencijos metodai ne visada būna pakankamai informatyvūs. Tokiais atvejais kur kas tinkamesnis yra nenuostoviosios sugerties spektroskopijos metodas, nes jis gerokai praplečia tyrimų ribas ir leidžia stebėti labai sparčius pikosekundžių trukmės šviesos sukeltus vyksmus, nepastebimus kitais būdais. Pikosekundinės sugerties spektroskopijos metodika atveria naujas galimybes nagrinėjant daugiakomponenčio mišinio atskirų dedamųjų, pasižyminčių įvairiais agregacijos laipsniais, sužadavimo relaksacijos būdus.

Hematoporfirinų sužadintos būsenos relaksacija. Nemaža dalis sužadintų porfirinų molekulių energiją išspinduliuoja fluorescencijos fotonų pavidalu 550–750 nm srityje. Porfirinų fluorescencijos spektrą paprastai sudaro dvi pagrindinės juostos, kurių maksimumų padėtys ir intensyvumai priklauso nuo porfirino cheminės struktūros ir nuo tirpiklio (Reddi ir Jori, 1988). Šioje dalyje apibendrinti pasaulinėje literatūroje paskelbti hematoporfirinų subnanosekundinės laiko skyros kinetinės fluorimetrijos duomenys, gauti naudojant skirtingas registracijos metodikas:

a) tiesioginį matavimą sparčiais fotodaugintuvais (laiko skyra ~300–400 ps) (Andreoni ir kt., 1982; Andreoni ir kt., 1983; Andreoni ir Cubeddu, 1984a; Andreoni ir Cubeddu, 1984b; Roder ir Wabnitz, 1987);

b) elektrooptines kameras (laiko skyra siekia 1–2 ps) (Yamashita ir kt., 1984; Yamashita ir kt., 1988);

c) pavienių fotonų skaičiavimo techniką (laiko skyra gali siekti 10–20 ps) (Brookfield, 1984; Kinoshita, 1988; Schneckenburger ir kt., 1985; Schneckenburger ir kt., 1987; Schneckenburger ir kt., 1992; Schneckenburger ir Wustrow, 1988; Seidlitz ir kt.,

1990; Cubeddu ir kt.,1986a; Cubeddu ir kt.,1986b; Cubeddu ir kt.,1987a; Cubeddu ir kt.,1987b).

Skirtingos įvairių ekperimentų sąlygos bei metodikų ypatumai sąlygoja didelį rezultatų nesutapimą ir labai apsunkina interpretaciją. Todėl suklasifikavome relaksacijos parametrus pagal aplinkas, kuriose yra porfirinų molekulės.

Hematoporfirinai vandeniniuose tirpaluose. Vandeninių tirpalų tyrimas svarbus, kadangi dauguma cheminių bei fizikinių procesų juose vyksta panašiai kaip ir biologinėse sistemose, o rezultatų interpretacija paprastesnė dėl terpės vienalytiškumo. Sužadintos būsenos relaksacijos tyrimų vandeninėse terpėse (vandenyje ir tirpaluose, kur vanduo pagrindinis tirpiklis) rezultatai pateikti 4.2 lentelėje. Šioje ir kitose lentelėse pateikiami fluorescencijos trukmės priklausomybės eksponentinio dėstinio parametrai (τ –įvairių sužadintos būsenos relaksacijos vyksmų trukmės, A – atitinkamų sužadintos būsenos relaksacijos vyksmų indėlis į bendrą relaksacijos procesą).

4.2. lentelė. Hematoporfirinų relaksacijos parametrai vandeniniuose tirpaluose

Prepara- ratas	pH	Koncentracija, M	$\lambda_{\text{žad.}}$, nm	τ_1 , ns	A_1 , %	τ_2 , ns	A_2 , %	τ_3 , ns	A_3 , %	Šalti- nis
Hp	7,4	2×10^{-6}	405	15,4	93,5	3,94	6,5	–	–	a
"	"	1×10^{-5}	"	15,4	89,4	3,65	10,6	–	–	"
"	"	$2,5 \times 10^{-5}$	"	15,0	89,0	3,54	11,0	–	–	"
"	"	5×10^{-5}	"	15,3	78,8	3,64	21,2	–	–	"
"	"	$7,5 \times 10^{-5}$	"	14,9	78,5	3,80	21,5	–	–	"
"	"	1×10^{-4}	"	15,5	70,3	4,07	29,7	–	–	"
HpD	7,4	2×10^{-6}	405	16,5	85,8	4,10	14,2	–	–	b
"	"	5×10^{-5}	"	16,1	77,3	4,03	22,7	–	–	"
"	"	1×10^{-4}	"	16,7	69,3	3,69	30,7	–	–	"
Hp	7,4	1×10^{-5}	364	15,1	100	–	–	–	–	c
PfII	"	"	"	14,8	84,8	3,07	15,2	–	–	c
Hp	7,4	1×10^{-5}	570	15,0	100	–	–	–	–	d
Hp	6,5	$2 \times 10^{-6} \div 2 \times 10^{-4}$	570	16	54÷ 31	6,5	23÷33	1,4	23÷33	e
"	7,0	"	"	"	49÷ 29	6,0	25÷35	1,2	25÷35	"
"	7,5	"	"	"	63÷29	5,9	22÷36	0,8	15÷24	"
HpD	7,4	1×10^{-4}	514	15	–	2,5	–	0,3	–	f
PfII	7,0	8×10^{-6}	364	14,6	64,3	3,0	17,6	0,74	18,1	g
HpD*	7,0	8×10^{-6}	364	14,8	55,3	3,31	23,0	0,68	21,7	h
PfII	6,0	8×10^{-6}	420	–	–	1,1	–	0,09	–	i
HpD	7,2	$8 \times 10^{-6} \div 8 \times 10^{-4}$	570	–	–	3,6	–	0,12	–	j

* plono sluoksnio chromatografijos būdu išskirtos aktyvios HpD frakcijos;

a (Andreoni ir kt., 1982); b (Reddi ir Jori, 1988); c (Andreoni ir Cubeddu, 1984a); d (Roder ir Wabnitz, 1987); e (Brookfield, 1984); f (Kinoshita ir kt., 1988); g (Cubeddu ir kt., 1986); h (Cubeddu ir kt., 1989); i (Docchio ir Ramponi, 1988); j (Yamashita ir kt., 1984)

Kaip matyti iš lentelės duomenų, vandeninėse terpėse vienu metu registruojama iki trijų skirtingų relaksacijos dedamųjų, kurių santykiniai svoriai priklauso nuo hematoporfirinų koncentracijos, žadinimo bangos ilgio bei fluorescencijos bangos ilgio.

Hematoporfirinai organiniuose tirpikliuose. Monomerinių porfirinų relaksacijos parametrai dažniausiai tiriami organiniuose tirpikliuose. Be monomerų, juose egzistuoja ir kovalentiniais ryšiais sujungti agregatai (Andreoni ir kt., 1983). Šių molekulių gyvavimo trukmių matavimai kinetinės fluorimetrijos metodu pateikti 4.3 lentelėje.

4.3 lentelė. Hematoporfirinų relaksacijos parametrai organiniuose tirpikliuose

Prepa-ratas	Organinis tirpiklis	Koncen-tracija, M	$\lambda_{\text{žad.}}$, nm	τ_1 , ns	A_1 , %	τ_2 , ns	A_2 , %	Šalti-nis
Hp	MeOH	2×10^{-6}	405	12,3	100	–	–	a
"	"	1×10^{-4}	"	12,0	100	–	–	"
"	EtOH	2×10^{-6}	"	13,0	100	–	–	"
"	"	1×10^{-4}	"	12,6	100	–	–	"
"	formamidas	2×10^{-6}	"	17,1	100	–	–	"
"	"	1×10^{-4}	"	16,4	100	–	–	"
HpD	MeOH	2×10^{-6}	405	12,7	86,2	4,02	3,8	b
"	"	1×10^{-4}	"	13,3	87,5	6,44	12,5	"
Hp	MeOH	8×10^{-6}	364	12,0	100	–	–	c
PfII	"	8×10^{-6}	"	10,7	100	–	–	c
Hp	EtOH	1×10^{-5}	514	12,0	100	–	–	d

a (Andreoni ir kt., 1983); b (Andreoni ir kt., 1982); c (Andreoni ir Cubeddu, 1984b); d (Roder ir Wabnitz, 1987)

Hp ir jo darinių fluorescencija organiniuose tirpikliuose gęsta kaip eksponentinė arba dviekponentinė funkcija ir atspindi monomerų ir kovalentiniais ryšiais sujungtų agregatų sužadintos būsenos relaksaciją.

Hematoporfirinai micelėse. Micelės – paprasčiausias tyrimams svarbus modelis, sukuriantis biologinio audinio ląstelės membranos hidrofobinei aplinkai artimas sąlygas. Micelės susidaro vandeniniuose tirpaluose esant detergentų – medžiagų, savo veikimu primenančių skalbimo priemonės. Šių medžiagų molekulės dėl hidrofobinės–hidrofilinės sąveikos suformuoja plonas plėveles, o esant kritinei koncentracijai – micles. Micelėse uždaryti porfirinų agregatai suyra ar patiria įvairias deformacijas.

Matavimų rezultatai tirpaluose su įvairiais detergentais (tritonu X-100 (TRIT) – alkilfenilpolietilenglikoliu, SDS – natrio dodecilsulfatu, CTAB – cetilmetilamonio bromidu), esant skirtingoms detergentų ir porfirinų koncentracijoms, apibendrinti 4.4 lentelėje.

4.4 lentelė. Hematoporfirinų relaksacijos parametrai micelėse

Prepara- ratas	Deter- gentas	C_{det} , M	$\lambda_{žad}$, nm	τ_1 , ns	A_1 , %	τ_2 , ns	A_2 , %	τ_3 , ns	A_3 , %	Šalti- nis
HpD	SDS		405	17,6	82,2	3,83	17,8	–	–	a
"	CTAB		"	14,6	84,2	4,98	15,8	–	–	"
Hp	CTAB		405	13,1	100	–	–	–	–	b
"	TRIT*		"	18,5	100	–	–	–	–	"
"	SDS		"	16,7	100	–	–	–	–	"
PfII	CTAB	5×10^{-6}	364	14,4	22,4	2,37	14,7	0,42	62,9	
"	"	1×10^{-5}	"	14,2	10,4	2,20	14,2	0,67	48,5	
PfII	"	5×10^{-5}	"	12,4	3,1	2,66	18,9	0,62	78,0	c
"	"	1×10^{-4}	"	10,5	21,5	3,71	43,2	0,96	35,3	
"	"	1×10^{-3}	"	16,0	89,6	3,38	10,7	–	–	
DHE	CTAB	5×10^{-5}	364	13,8	15,1	2,52	26,1	0,66	66,8	d
"	"	1×10^{-3}	"	16,3	72,9	3,91	27,1	–	–	
HpD*	CTAB	5×10^{-5}	364	11,6	4,2	3,04	42,8	1,11	52,9	
"	"	1×10^{-4}	"	10,7	58,9	3,57	41,1	–	–	e
"	"	1×10^{-3}	"	15,0	68,8	3,54	31,2	–	–	

* išskirtos aktyvios HpD frakcijos;

a (Andreoni ir kt., 1982); b (Andreoni ir kt., 1983); c (Cubeddu ir kt., 1986a); d (Cubeddu ir kt., 1987a); e (Cubeddu ir kt., 1989)

Ikmicelinių koncentracijų tirpaluose matoma iki trijų relaksacijos dedamųjų. Micelėse, kaip ir spiritiniuose tirpaluose, porfirinai monomerizuoti, todėl Hp matoma viena, o Hp dariniuose – dvi relaksacijos dedamosios.

Hematoporfirinai biologinėse terpėse. Ypač daug darbų skirta Hp ir jo darinių fotofizikinių vyksmų tyrimams biologinėje aplinkoje, t.y. ląstelių kultūrose, audiniuose bei biologinės kilmės organiniuose junginiuose su inkorporuotais porfiriniais. Dažniausiai taikomas mikrofluorimetrijos metodas. Šie rezultatai (4.5 lentelė) sunkiai interpretuojami, nes kartojant eksperimentus praktiškai neįmanoma pagaminti identiško bandinio, be to, reikia atsižvelgti į nevienalytį fluorescuojančių medžiagų pasiskirstymą bandinyje.

Apibendrinant matavimų biologinėse terpėse rezultatus, reikia pažymėti jų prieštarumą. Taigi iš vieno eksperimentų, pavyzdžiui, kai ląstelių kultūrose matoma intensyvėjanti porfirinų agregatų juosta (Kinoshita ir kt., 1988) arba kai registruojama 90 ps relaksacijos dedamoji (Yamashita ir kt., 1984), aiškėja, kad ląstelėse Hp molekulės papildomai agreguoja. Kiti rezultatai, kai pastebima 100 ps dedamąją išnykstant, pereinant nuo vandeninio tirpalo prie ląstelių (Schneckenburger ir kt., 1987), ar vyraujant dviekspontinę relaksaciją ląstelėse (Schneckenburger ir kt., 1988), leidžia manyti, kad ląstelėse agregatai suyra.

4.5 lentelė. Hematoporfirinų relaksacijos parametrai biologinėse terpėse

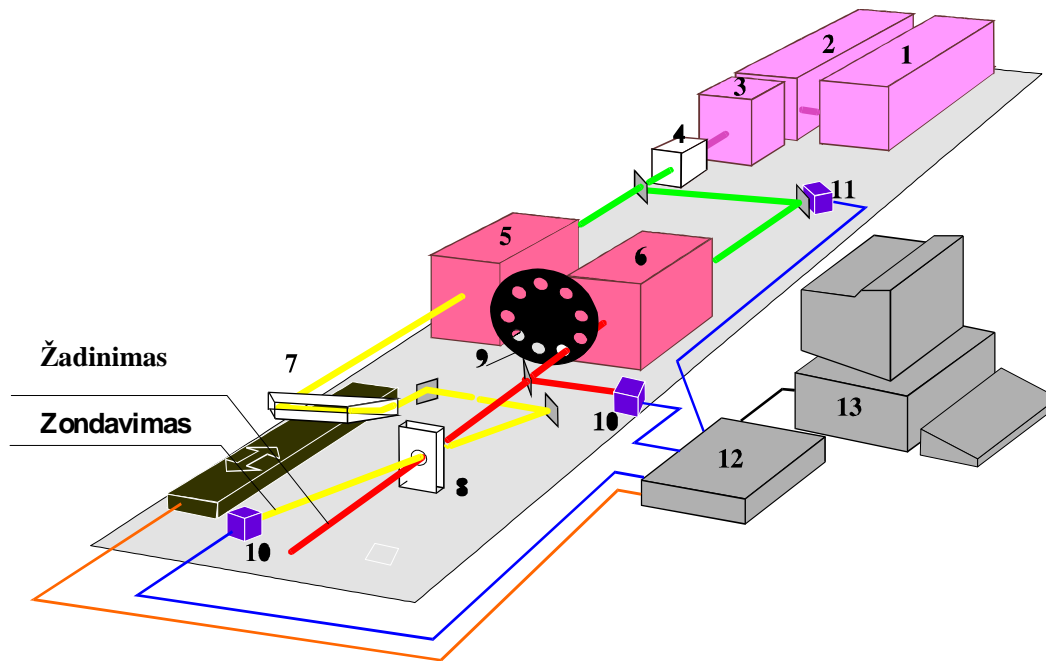
Prepara- ratas	$\lambda_{\text{žad,}}$ nm	τ_1 , ns	A_1 , %	τ_2 , ns	A_2 , %	τ_3 , ns	A_3 , %	Biol.sistema (autofluor.)	Šalti- nis
PfII	420	11±2	70÷80	1,7±.5	30÷20	–	–	ląstelės	a
PP	395÷420	14,1	–	2,9	–	0,2	–	ląstelės (0.1;1,9;19)*	b
PfII	420	12	–	2,8	–	0,1	–	ląstelės	c
"	"	14	–	2,8	–	0,1	–	audinys	
PP	"	14	–	2,6	–	0,1	–	"	
HpD	400	6,5÷8,5	–	–	–	–	–	ląstelės(2,0)	d
"	"	14,5	–	–	–	–	–	vakcina(4,4)	
HpD	400	14,9	55,3	3,7	44,6	–	–	limfocitai	e
		15,2	25,1	3,5	74,9	–	–	(13;3;0.6)	
HpD	575	14÷8,8	6÷50	1,5÷4,0	80÷20	0,3÷1,0	30÷0	ląstelės	e
HpD	575	14÷15	60÷73	3,2÷3,8	15÷27	0,6÷0,7	11÷13	ląstelės	f
HpD [#]	"	15÷8,8	32÷40	4,0÷4,7	25÷32	0,6÷1,1	29÷43	"	
HpD	575	14÷8,8	6÷50	1,5÷4,0	80÷20	0,3÷1,0	30÷0	ląstelės	e
HpD	514	15	–	2,5	–	0,3	–	ląstelės	f
HpD	570	–	–	–	–	0,1	–	ląstelės	g
Hp	532	20÷15	25÷6, 5	0,2÷0,6	75÷85	–	–	liposomos	h
"	"	11÷13	20÷43	0,5÷0,6	75÷85	80÷57	–	ląstelės	

* – skliaustuose pateiktos biologinių sistemų autofluorescencijos trukmės (ns)

– išskirtos aktyvios HpD frakcijos

a (Schneckenburger ir kt., 1985); b (Seidlitz ir kt., 1990); c (Schneckenburger ir kt., 1992); d (Docchio ir kt., 1982); e (Docchio ir kt., 1984); f (Cubeddu ir kt., 1990; Kinoshita ir kt., 1988); g (Yamashita ir kt., 1988); h (Chernyaeva ir kt., 1991)

Pikosekundinės laiko skyros spektroskopinis kompleksas sensibilizatorių pirminiams fotoprocesams tirti. Sužadavimo energijos relaksacijos parametru matavimai buvo atlikti Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centre sumontuotu pikosekundinės skyros sugerties spektrofotometru, kurio struktūra pavaizduota 4.10 pav. Kompleksą sudaro neigiamo grįžtamojo ryšio sinchronizuotų modų Nd:YAG lazeris, Nd:YAG regeneratyvinis stiprintuvas, du nepriklausomi derinamo bangos ilgio pikosekundinių šviesos impulsų šaltiniai, spektrofotometrinė schema ir automatizuotas valdymo bei duomenų apdorojimo kompleksas. Pasitelkiant sistemą pagalba formuojamos 2–10 μ s trukmės impulsų voros ir užtikrinama visapusiškesnė išilginių rezonatoriaus modų sinchronizacija, o drauge ir trumpesni impulsai. Skiriant pavienį impulsą praėjus 1,5–2 μ s nuo voros pradžios, išmatuota jo trukmė yra 12–15 ps.



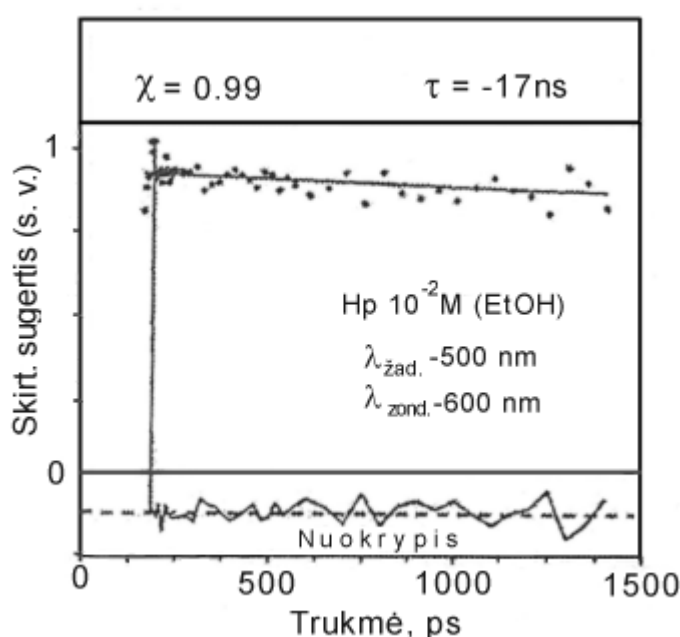
4.10 pav. Lazerinio spektrometro optinė ir elektrinė grandinė. 1–lazeris, 2, 3–stiprintuvai, 4–II harmonikos generatorius, 5, 6–derinamo bangos ilgio PŠG, 7–optinė vėlinimo linija, 8–bandinys, 9–sklendė, 10, 11–fotoimtuvai,

Kadangi iš lazerio rezonatoriaus išskirto pavienio impulso energija siekia tik keletą μJ , patikimam spektroskopiniam eksperimentui atlikti reikia ją sustiprinti daugiau nei 1000 kartų. Šiam tikslui panaudotas Nd:YAG regeneratyvinis stiprintuvas. Parametrinių šviesos generatorių (PŠG) kaupinimui regeneratyvinio stiprintuvo spinduliuotė dar stiprinama viename arba dviejuose Nd:YAG stiprintuvuose. Taip pasiekama 15–30 mJ impulso energija, pakankama stabiliam spektrometro darbui.

Žadinimo ir matavimo spinduliuotė generuojama dviem nepriklausomais PŠG, kurių vienas (matavimo) yra dviegis temperatūrinio derinimo ličio niobato (LiNbO_3) PŠG, kaupinamas antrąja lazerio spinduliuotės harmonika, o kitas (žadinimo) papildomai turi kalio dihidrofosfato kristalo kampinio derinimo parametrinį stiprintuvą. Hibridinė schema užtikrina aukštą energinį keitimo efektyvumą. Matavimo PŠG bangos ilgio derinimo sritis kartu su antrosios harmonikos generavimu regimajai šviesai gauti yra 400–2000 nm, o žadinimo PŠG derinimą riboja netiesinio kristalo spektrinė skaidrio sritis ir ji yra 400–1600 nm. Žadinimo PŠG generuojamų impulsų energija artimoje infraraudonojoje spektro dalyje yra 1–2 mJ, o regimojoje – iki 100 μJ . Tokios energijos visiškai pakanka sparčių fotofizikinių vyksmų spektroskopijos eksperimentams. Sugerties

pokyčių zondavimui taip pat skirtas pikosekundinis kontinuumas, generuojamas sunkiajame vandenyje. Sukurtos sistemos generuojamų impulsų energijos nestabilumas neviršija 5 %, o trukmės – mažiau nei 0,5%. Tai užtikrina 0,05 optinio vieneto pralaidumo pokyčių matavimo tikslumą ir santykį signalas – triukšmas 100–1000.

Sužadavimo energijos relaksacija Hp ir HpD tirpaluose. Sugerties pokyčių laikinė priklausomybė nuo vėlinimo trukmės spiritiniame Hp tirpale, išreiškianti singuletinės būsenos užpildos kitimą laike, pavaizduota 4.11 pav. $\Delta A(t)$ kreivė aproksimuota viena eksponente, kurios laiko konstanta 10–17 ns (Rotomskis ir kt., 1993).

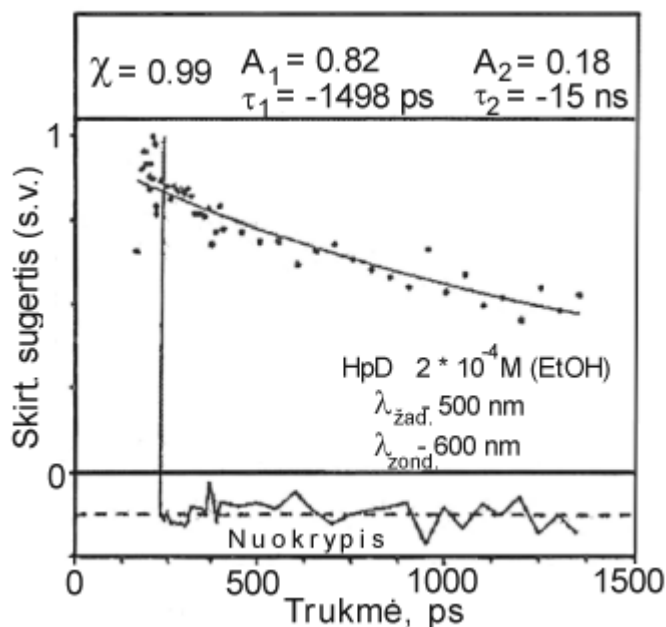


4.11 pav. Hp etanolinio tirpalo sugerties pokyčių (ΔA) priklausomybė nuo vėlinimo trukmės

Ši vertė atitinka literatūroje pateikiamus fluorescenciniais metodais gautus duomenis, interpretuojamus kaip Hp monomerų sužadinto lygmens gyvavimo trukmę. Eksperimento metu pastebėtas monoeksponentinis signalo sumažėjimas, matavimo paklaidų ribose nepriklausantis nuo žadinimo intensyvumo, patvirtina hipotezę, kad spiritiniame tirpale Hp yra monomerų pavidalo.

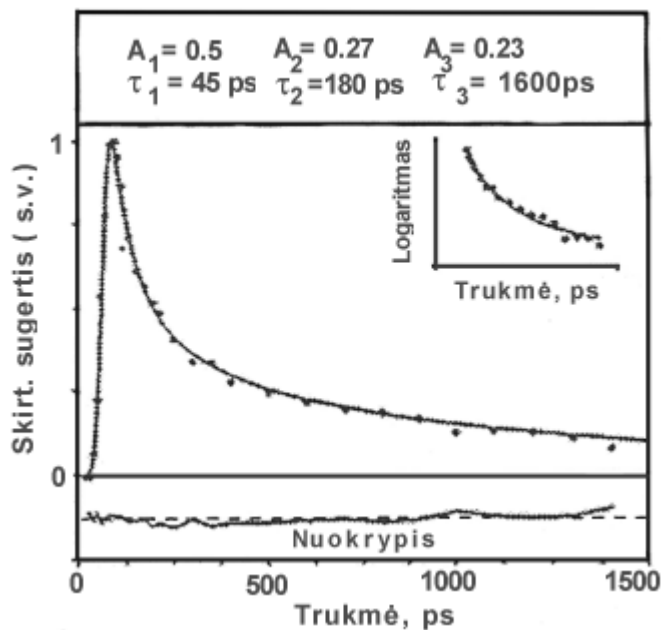
Priešingai negu Hp, ΔA sumažėjimas spiritiniame HpD tirpale aprašomas dviejų eksponenčių suma su laiko konstantomis $\tau_1=10-17$ ns ir $\tau_2=2-4$ ns (4.12 pav.). Galima tikėtis, jog τ_2 atspindi sužadavimo energijos relaksaciją kovalentiniu ryšiu sujungtuose HpD

oligomeruose, o ilgesnioji komponentė τ_1 – sužadavimo relaksaciją monomeruose. Pastaroji laiko konstanta labai priklauso nuo HpD paruošimo sąlygų ir pasireiškia kaip daugelio įvairių rūšių oligomerų, kurių gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios tolygiai, efektinė pastovioji.



4.12 pav. HpD etanolinio tirpalo sugerties pokyčių (ΔA) priklausomybė nuo vėlinimo trukmės

Kitokia $\Delta A(t)$ priklausomybė yra vandeniniuose Hp ir HpD tirpaluose, kur susiformuoja pusiausvirieji agregatai. Esant tirpale kelioms porfirinų frakcijoms, pasižyminčioms įvairiomis gyvavimo trukmėmis bei skirtingomis spektrinėmis sugerties savybėmis, $\Delta A(t)$ signalas priklauso taip pat ir nuo zondavimo bei žadinimo bangos ilgių ir nuo koncentracijos. Todėl kinetikų vandeniniame tirpale (4.13 pav.) pobūdis labai sudėtingas.



4.13 pav. HpD vandeninio tirpalo (pH 5,8) sugerties pokyčių (ΔA) priklausomybė nuo vėlinimo trukmės. $C_{\text{HpD}} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\lambda_{\text{žad}} - 532 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{zond}} - 630 \text{ nm}$

Šiems matavimams buvo parinktas $\lambda_{\text{žad}} = 532 \text{ nm}$, atitinkantis fotoproducto, kuris gali susiformuoti matavimo metu, sugerties minimumą. Atlikus eksperimentinių kreivių aproksimaciją trijų eksponenčių suma, gautos tokios trukmių konstantos: $\tau_3 = 20\text{--}70 \text{ ps}$ (trumpiausia dedamoji), $\tau_2 = 100\text{--}200 \text{ ps}$ (trumpoji dedamoji) bei $\tau_1 = 1,5\text{--}5 \text{ ns}$ (ilgoji dedamoji) (Rotomskis ir kt., 1993). Ribota eksperimento laiko skalė, kurią lemia vėlinimo linijos ilgis, ir didelis greitų dedamųjų kiekis neleido atliktuose matavimuose pastebėti 10 ns eilės monomerų gyvavimo trukmių.

4.4. Pirmosios kartos sensibilizatorių trūkumai

Klinikiniam gydymui pirmosios kartos sensibilizatoriai – hematoporfirinas ir jo dariniai – pradėti taikyti išnaudojant jų gana selektyvų kaupimąsi įvairių rūšių hiperproliferuojančiuose audiniuose. Hp dariniai, turintys savo sudėtyje daug oligomerinių frakcijų, navikiniame audinyje kaupiasi kur kas geriau už gryną Hp. Tačiau šios frakcijos beveik ne fluorescuoja, jų tripletų ir singuletinio deguonies generavimo kvantiniai našumai maži. Šiuo metu kol kas vienintelis klinikiniam gydymui naudojamas fotosensibilizatorius fotofrinas II (FFII) yra specifiniu būdu apdorotas Hp ir pasižymi visiems pirmosios kartos sensibilizatoriams būdingais trūkumais (4.6 lentelė).

4.6 lentelė. Kai kurios fotofrino II fizikocheminės, fotobiologinės ir farmakokinetinės savybės (Jori, 1992)

Savybė	Vertės ir komentarai
Cheminė sudėtis	Monomerinių ir oligomerinių frakcijų mišinys
Šviesos sugertis raudonojoje spektro srityje	Monomerų ekstinkcijos koeficientas ties 630 nm apie $3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, agregatų – truputį mažesnis
Tripleto kvantinis našumas	0,6 (monomerų) 0,2 (agregatų)
Singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas	0,3 (monomerų) 0,1 (agregatų)
Kaupimasis navikiniame audinyje (suleidus $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$)	Po 48 val audinyje maždaug $2 \mu\text{g/g}$
Koncentracijų santykis tarp navikinio ir prinavikinio audinio	Tarp 15:1 (smegenyse) ir 1:1 (raumenyse ir odoje) 24–48 val po injekcijos
Pašalinis poveikis	Ilgalaikis (iki 4 savaičių) jautrumas šviesai

Tokios savybės būdingos ir kitiems pirmosios kartos sensibilizatoriams. Nehomogeninė cheminė sudėtis (monomerinių ir oligomerinių frakcijų mišinys) apsunkina sensibilizacinių savybių ir selektyvumo kontrolę *in vivo*. Monomerai ir agregatai turi skirtingus tripletų ir singuletinio deguonies generavimo kvantinius našumus. FFII oligomeriniai komponentai yra hidrofobiškesni ir lengviau prasiskverbia pro ląstelių membranas, tačiau jų tripletinių būsenų gyvavimo trukmės trumpos ir jie silpnai generuoja singuletinį deguonį (4.6 lentelė). Agreguoti dariniai, atsidūrę biologinėje aplinkoje, gali suirti: kovalentiškai sujungtuose dariniuose esterinės jungtys hidrolizuojasi, nekovalentiniai agregatai, patekę į skirtingus ląstelės kompartmentus, kur mažos dielektrinio skarbumo konstantos, suyra į monomerus. Biologinėje aplinkoje atsiradusios frakcijos turės kitokį sensibilizacinį efektyvumą.

Kadangi FFII ir kitų pirmosios kartos sensibilizatorių sugerties juostos ties 630 nm intensyvumas mažas ($\epsilon \sim 3 \cdot 10^3$), jų fotosužadavimo tikimybė irgi nedidelė. Todėl pakankamam fototerapiniam atsakui gauti tenka naudoti gana dideles sensibilizatoriaus dozes (FFII 2–5 mg/kg). Kai kuriuose organuose, pavyzdžiui, kepenyse ir blužnyje, susikaupus dideliems sensibilizatoriaus kiekiams, galimas ilgalaikis toksinis poveikis.

Kaupimasis navikiniame audinyje nepakankamai selektyvus. Didžiausias kaupimosi selektyvumas nustatytas smegenyse, kadangi porfirinai nepereina kraujo–smegenų barjero, tačiau kitose organizmo vietose šis selektyvumas daug mažesnis ir dėl

to išlieka pavojus FNT metu pažeisti aplinkinius sveikus audinius. Šie sensibilizatoriai ilgai (iki 2 mėnesių) išbūna susikaupę odoje, dėl to pacientai turi vengti šviesos.

Naujų, neturinčių minėtų trūkumų, junginių poreikis stimuliavo “antros kartos” fotosensibilizatorių paieškas.

4.5. Antrosios kartos fotosensibilizatoriai

Antrosios kartos fotosensibilizatoriai sugeria 650–850 nm bangų ilgio šviesą. Šio intervalo – “fotodinaminio lango” – šviesos nesugeria biologiniai chromoforai. Intervalas iš trumpųjų bangų pusės (650 nm) ribojamas biologinių chromoforų optinių savybių, o iš ilgujų (850 nm) – būtino energijos tarpo tarp fotosensibilizatoriaus tripletinės būsenos, T_1 , ir energijos akceptorius 3O_2 bei jo sužadintos būsenos – singuletinio deguonies 1O_2 . Sensibilizatoriai, sugeriantys ilgesnių nei 850 nm bangų šviesą, silpnai generuoja singuletinį deguonį.

4.7 lentelėje apžvelgtos efektyviam sensibilizatoriui reikalingos savybės, sąlyginai sugrupuotos į fotofizikines, fizikines–chemines ir farmakologines. Sensibilizatoriaus, turinčio visas reikiamas savybes, nėra. Efektyviausi yra tie, kurių įvairių parametų sąveika optimaliai tenkina FNT reikalavimus.

Dauguma policiklinės struktūros dažiklių yra efektyvūs sensibilizatoriai (Spikes, 1975), tačiau klinikiniu požiūriu, palyginti su kitais, daugiausia privalumų turi porfirininės kilmės junginiai. Jų mažas sisteminis toksiškumas, metabolizmo organizmuose metu neišsiskiria kenksmingų produktų (Moan ir Christensen, 1980). Porfirinai turi sugerties juostą ilgabangėje matomosios spektro srities pusėje (>600 nm) ir todėl gali būti sužadinti raudona šviesa, kuri giliau prasiskverbia į audinius, nes ją silpniau sugeria endogeniniai chromoforai. Raudona šviesa, prasiskverbianti į audinius iki kelių milimetrų gylio, nėra kenksminga, jei audinys nesensibilizuotas. Tuo FNT skiriasi nuo kitų gydymo metodų, tokių kaip PUVA ar radioterapija, kurių metu nepavyksta išvengti sveikų audinių pažeidimų. FNT metu, tinkamai parinkus fotosensibilizatoriaus ir šviesos dozes, galima inicijuoti fotosensibilizacines reakcijas labai selektyviai – tik tose vietose, kur susikaupęs sensibilizatorius.

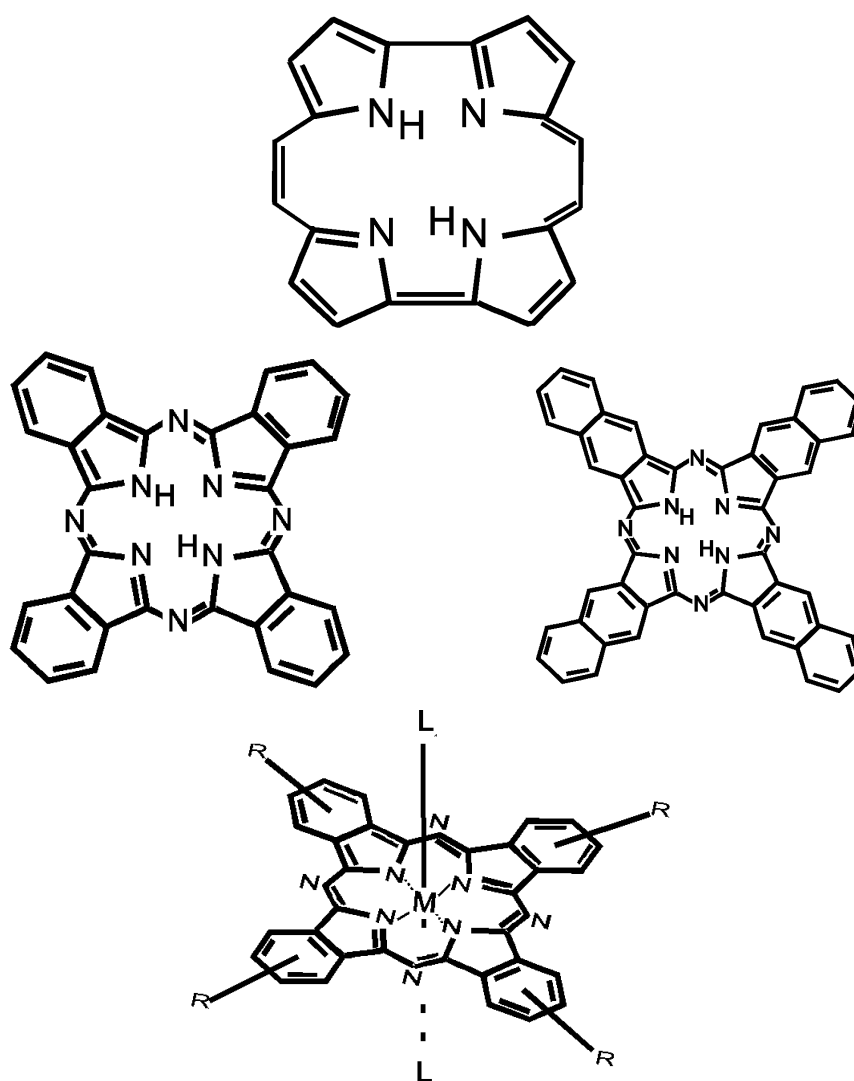
4.7 lentelė. Svarbiausios efektyvaus FNT sensibilizatoriaus savybės (pagal (Jori, 1996))

Savybė	Susiję struktūriniai ir biologiniai ypatumai
<i>Fizikinės cheminės</i>	
Cheminis grynumas	Grynumas sunkiai pasiekiamas, jei yra daug pakaitų
Didelis ekstinkcijos koeficientas raudonoje spektro srityje	Kuo ilgesnė makrociklo π elektronų konjugacija
Silpna agregacija vandeninėje terpėje	Krūvį turintys šoniniai pakaitai ar prie centrinio metalo jono prijungti ašiniai ligandai
<i>Fotofizikinės</i>	
Ilgas tripletinės būsenos gyvavimo laikas	Vyraujanti monomerinė forma
Didelis $^1\text{O}_2$ generavimo kvantinis našumas ir/ar elektronų pernaša į substrato molekules	Gerai prieinamas molekuliniam deguoniui arba išsidėstęs arti substrato, turinčio tinkamą oksidacijos–redukcijos potencialą
<i>Farmakologinės</i>	
Efektyvus ir selektyvus kaupimasis navikiniame audinyje	Hidrofobinės ar amfifilinės savybės; tinkamos nešiklių sistemos
Greitas pasišalinimas iš serumo ir sveikų audinių	Ryškus giminingumas serumo baltymams, atsakingiems už sensibilizatoriaus pernešimą iš periferinių audinių į kepenis
Mažas sisteminis toksiškumas	Letali dozė > 300 mg kūno svorio kg
<i>Fototerapinės</i>	
Pirmenybinis ir efektyvus poveikis navikinėms ląstelėms	Didelis susikaupusių koncentracijų skirtumas navikiniame ir prienavikiniame audinyje ir/ar greitas pažeisto sveiko audinio gyjimas
Nesukelia pašalinių poveikių	Mažas kaupimasis odoje padeda išvengti fotojautrumo
Nesukelia mutageninio poveikio	Neturi fotopoveikio DNR

Siekiant išvengti pirmosios kartos sensibilizatoriams būdingų trūkumų, antros kartos sensibilizatoriai pirmiausia yra homogeninės, žinomos struktūros medžiagos. Kai gerai žinoma fotosensibilizatoriaus struktūra, daug lengvesni ir aiškesni tampa toksikologiniai tyrimai, struktūros ir poveikio mechanizmo ryšių aiškinimas, sensibilizatoriaus transportavimo organizme keliai, judėjimas plazmoje ir per membranas, viduląstelinis pasiskirstymas, sąveikos su ląstelės organelėmis.

Potencialūs sensibilizatoriai vertinami pagal jų fotofizikines ir fotochemines savybes, struktūrą, nuo kurios priklauso jų hidrofiliinės ir hidrofobinės savybės, jų stabilumą *in vivo*. Keičiant fotosensibilizatoriaus cheminę struktūrą galima pasiekti

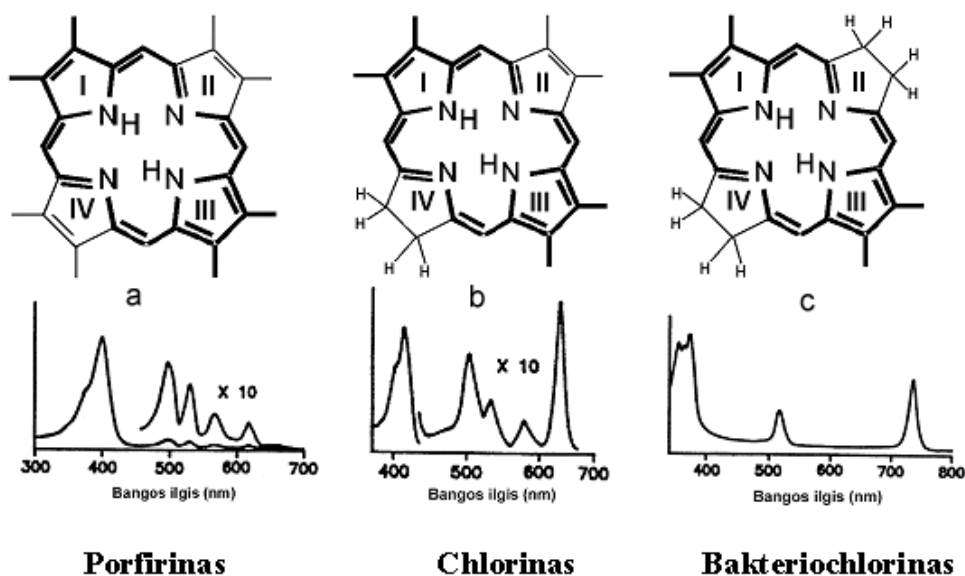
intensyvią šviesos sugertį raudonojoje spektro srityje, tačiau molekūlės struktūros pokyčiai keičia ir jos hidrofilišės–hidrofobines savybes (nuo jų priklauso selektyvus kaupimasis navikiniame audinyje) ir polinkį į agregaciją įvairiose terpėse (nuo jo priklauso sensibilizacinės savybės) (Dougherty, 1987). Optimalaus sprendimo ieškoma derinant kelis faktorius – prailginant konjuguotų ryšių sistemą, prijungiant tinkamą metalo joną prie keturių azoto atomų porfino ciklo centre ir parenkant reikiamos prigimties šoninius pakaitus ar ašinius ligandus (4.14 pav.).



4.14 pav. Sensibilizatoriai, gerai sugeriantys raudoną šviesą: porficenai, ftalocianinai, naftalocianinai ir metaloftalocianinai (M–metalo jonas, L–ašiniai ligandai, R–šoniniai pakaitai)

Geresnes sugerties savybes turintiems junginiams gauti sintetinami porfirinų (4.15 pav., a) analogai su modifikuota konjuguotų ryšių sistema. Chlorinai, kurie nuo porfirinų

skiriasi viena hidrinta jungtimi pirolo žiede (4.15 pav., b), turi intensyvią sugerties juostą 650–700 nm intervale. Bakteriochlorinai, kuriuose yra dvi hidrintos jungtys, gerai sugeria šviesą ties 780 nm (4.15 pav., c). Daugėjant hidrintų jungčių didėja ilgabangės juostos batochrominis poslinkis. Kitas būdas – delokalizuoatų π elektronų debesėlio išplėtimas pailginant konjuguotų jungčių grandinę (susidaro vadinamieji 22π arba 34π porfirinai) arba kondensacijos reakcijos dėka prie pirolo žiedų prijungiant benzeną (susidaro ftalocianinai) arba naftaleną (susidaro naftalocianinai) (4.14 pav.). Tokių junginių spektrinės savybės pateiktos 4.8 lentelėje (Jori, 1992).



4.15 pav. Porfirino, chlorino ir bakteriochlorino makrociklai ir sugerties spektrai Daugėjant hidrintų jungčių didėja ilgabangės juostos batochrominis poslinkis

4.8 lentelė. Kai kurių antros kartos sensibilizatorių spektrinės savybės

Sensibilizatorių klasė	Sugerties maksimumas raudonojoje spektro srityje, nm	Ekstinkcijos koeficientas, $M^{-1} cm^{-1}$
22 π porfirinas	670	130000
34 π porfirinas	660	370000
Chlorinai	680	40000
Bakteriochlorinai	780	150000
Ftalocianinai	700	200000
Oktabutoksi-ftalocianinai	750	250000
Naftalocianinai	780	350000

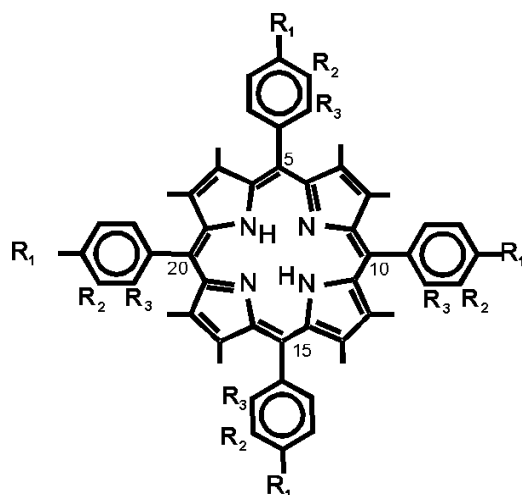
Sensibilizatoriai ištirpinti organiniuose tirpikliuose arba inkorporuoti į tvarkias sistemas (pvz., liposomas)

Minėtieji sensibilizatoriai vandeninėje aplinkoje dėl hidrofobinių ir tarpmolekulinių π - π jėgų linkę sudaryti agreguotus darinius, kuriuose sumažėja sąveikos tarp aromatinių makrociklų ir polinės aplinkos. Agregacijos pasekmė – hipochrominis efektas, sugerties juostų išplatėjimas ir sensibilizacinio poveikio susilpnėjimas. Polinkį agregacijai sumažina turintys elektrinį krūvį arba didelės apimties šoniniai pakaitai. Ašiniai ligandai, prijungti prie centrinio metalo atomo statmenai makrociklui (4.14 pav.), dėl elektrostatinės stūmos tampa erdvine kliūtimi agregatams susidaryti. Nors žinoma, kad oligomeriniai fotofrino komponentai geriausiai lokalizuojasi navikiniuose audiniuose, dabar laikomasi nuomonės, kad tik monomeriniai porfirinai yra efektyvūs biologinių sistemų sensibilizatoriai (Jori, 1992).

Metalo jono prijungimas porfirino molekulės centre keičia sensibilizatoriaus spektrines, fotochemines ir sensibilizacines savybes. Keturių Q-juostų spektras, būdingas bemetaliams porfirinams, dėl komplekso su metalu susidarymo pasikeičia į dviejų juostų spektrą. Metalo jono prijungimas mažiau pakeičia chlorinų, ftalocianinų ir naftalocianinų spektrus, tačiau ir šiuo atveju vyksta sugerties juostų siaurėjimas ir intensyvėjimas. FNT tinkamas fotofizikines savybes suteikia tik metalų jonai, turintys elektronais užpildytą d -orbitalę (Zn^{II} , Al^{III} , Si^{IV} , Ge^{IV}).

Nuo šoninių pakaitų prigimties priklauso ir Q juostų sugerties intensyvumų santykis. FNT požiūriu svarbių ilgesnių už 600 nm sugerties juostų intensyvumas padidėja esant pakaitams – elektronų donorams. Šoninių pakaitų poliškumas ir dydis veikia sensibilizatorių polinkį agreguoti ir hidrofiliškas–hidrofobines savybes, o drauge ir tirpumą. Nuo hidrofiliškas–hidrofobinių pakaitų, nulemiančių fotosensibilizatoriaus pobūdį, priklauso jų lokalizacija ir specifinis pasiskirstymas biologinėje aplinkoje.

Porfirino ir ftalocianino molekulės skeletas yra hidrofobiškas, dėl to netirpus vandenyje. Tirpumui padidinti prijungiami poliniai hidrofiliškieji šoniniai pakaitai: sulfo-, karboksi-, hidroksi-, ketvirtinės amonio ar piridinio grupės. 5,10,15,20-tetrafenilporfinų, turinčių hidroksilo grupes šoniniuose fenilo pakaituose (4.16 pav.), 3-hidroksi- ir 3,4-dihidroksi- dariniai yra maždaug 30 kartų efektyvesni navikų sensibilizacijoje negu HpD. Plačiai ištirta sulfonintų aliuminio ftalocianinų (Fc) fotochemija ir fotobiologija (van Lier ir Spikes, 1989; Paquette ir van Lier, 1992) parodė, kad šių junginių fotosensibilizacinės savybės labai priklauso nuo sulfogrūpių skaičiaus: mono- ir di-sulfoftalocianinai yra kur kas geresni sensibilizatoriai už tri- ir tetrasulfoftalocianinius.



	para	meta	orto
5,10,15,20-tetra- (4-hidroksifenil) porfinas	$R_1 = -OH; R_2 = R_3 = H$	$R_2 = -OH; R_1 = R_3 = H$	$R_3 = -OH; R_1 = R_2 = H$
5,10,15,20-tetra- (4-o-acetamidofenil) porfinas			$R_3 = -NHCOCH_3; R_1 = R_2 = H$
5,10,15,20-tetra- (4-sulfonatofenil) porfinas	$R_1 = -SO_3H; R_2 = R_3 = H$		
5,10,15,20-tetra- (4-karboksifenil) porfinas	$R_1 = -CO_2H; R_2 = R_3 = H$		

4.16 pav. 5,10,15,20–tetrafenilporfino dariniai

Ryšys tarp sensibilizatoriaus molekulės struktūros ir jo pasiskirstymo ląstelėse yra plačiai išnagrinėtas (Boyle ir Dolphin, 1996). Tinkamai derinant hidrofilinius ir hidrofobinius pakaitus sensibilizatorių molekulėse galima gauti junginius, turinčius geresnes selektyvios lokalizacijos savybes. Toks struktūrinis fotosensibilizatorių optimizavimas padidina selektyvų jų kaupimąsi atitinkamose navikinių ląstelių organelėse. Manoma, kad optimaliomis selektyvaus kaupimosi navikuose savybėmis pasižymi porfirino tipo makrociklas, kuriame hidrofiliniai ir hidrofobiniai pakaitai gretimuose žieduose suderinti taip, kad suteikia molekulei amfifilinį pobūdį, tačiau nepakeičia bendro struktūros hidrofobiškumo, palengvinančio sąveikas su ląstelėmis.

Neturintys pakaitų arba turintys hidrofobinius pakaitus netirpūs vandenyje sensibilizatoriai prieš injekciją tirpinami atitinkamuose nešikliuose. Jais gali būti įvairios nepolinės sistemos, tokios kaip micelės, liposomos, aliejinės emulsijos. Tokie nešikliai apsaugo sensibilizatorių molekules nuo hidrofobinių sąveikų, verčiančių jas jungtis į

agregatus. Todėl net ir labai linkę sudaryti agregatus sensibilizatoriai tokių nešiklių dėka į organizmą patenka monomerų pavidalo.

Spektrinės savybės. Svarbus antrosios kartos sensibilizatorių privalumas yra dideli jų ekstinkcijos koeficientai (ϵ) švitinimo bangos ilgio srityje. FNT naudojamos sensibilizatorių dozės sietinos su jų ekstinkcijos koeficientais ties švitinimo bangos ilgiu: kai ekstinkcijos koeficientas didelis, tam pačiam FNT efektyvumui pasiekti pakanka mažos vaisto dozės.

Mūsų laboratorijoje buvo tirtos aliuminio ftalocianino tetrasulfonato (AlFcS_4) ir chlorino e_6 (Cle_6) spektrinės savybės (Rotomskis ir kt., 1995 b). Vandeninėje terpėje (fosfatinis buferis, $\text{pH}=7,1$) Cle_6 spektrui būdinga gana intensyvi Sore juosta ties 403 nm, silpna sugerties juosta ties 504 nm ir intensyvi Q juosta ties 654 nm. AlFcS_4 sugerties spektrui būdinga Sore juosta ties 350 nm, silpna juosta ties 608 nm ir intensyvi juosta raudonojoje spektro srityje ties 676 nm (4.4 pav.).

Palyginus HpD, AlFcS_4 ir Cle_6 spektrines savybes (4.9 lentelė), matyti, kad AlFcS_4 ir Cle_6 turi intensyvesnes ir labiau į raudonąją spektro pusę pastumtas sugerties juostas negu HpD. Jų ekstinkcijos koeficientai ties ilgabangės Q juostos maksimumu taip pat kur kas didesni.

4.9 lentelė. HpD, Cle_6 ir AlFcS_4 spektrinės charakteristikos

Fotosensibilizatorius	SJ_{maks} , nm	QJ_{maks} , nm	ϵ , $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
HpD	400	630	0,3
Cle_6	403	654	2,0
AlFcS_4	350	676	7,7

HpD ϵ mažiausias, todėl jo dozės didžiausios (5–30 mg/kg). AlFcS_4 ekstinkcijos koeficientas didelis, todėl tą patį FNT efektyvumą galima pasiekti panaudojant mažą sensibilizatoriaus dozę (iki 1 mg/kg). Cle_6 pagal ekstinkcijos koeficiento dydį yra tarp HpD ir AlFcS_4 , tad ir jo medicininė dozė yra tarpinė (2–15 mg/kg).

Iš 4.9 lentelės duomenų apskaičiuoti tirtų fotosensibilizatorių ekstinkcijos koeficientų santykiai: $\epsilon_{\text{HpD}} : \epsilon_{\text{Cle}_6} : \epsilon_{\text{AlFcS}_4} = 3000 : 20000 : 77000 = 1,0 : 6,7 : 25,7$. Realiai naudojamų sensibilizatorių dozių santykiai beveik atitinka atvirkščius ekstinkcijos koeficientų santykius. Parenkama sensibilizatoriaus koncentracija turėtų būti atvirkščiai proporcinga jo ekstinkcijos koeficientui ties švitinimo bangos ilgiu.

Pagal spektrines savybes iš mūsų tirtų sensibilizatorių efektyviausias FNT turėtų būti AlFcS₄. Šio sensibilizatoriaus sugertis “fototerapiniame lange” yra maždaug 26 kartus stipresnė negu HpD (atitinkamai ekstinkcijos koeficientai $\epsilon_{676}=70000$ ir $\epsilon_{630}=3000$). Cle₆ raudonojoje spektros srityje sugeria septynis kartus daugiau šviesos negu porfirinai (atitinkamai ekstinkcijos koeficientai $\epsilon_{656}=20000$ ir $\epsilon_{630}=3000$). Stipri sugertis “fototerapiniame lange” padidina šviesos įsiskverbimo į audinį gylį, drauge padidėja FNT veikimo zona (šviesa pasiekia gilesnius sluoksnius ir sužadina ten esančias sensibilizatoriaus molekules), tačiau spektrinės savybės nėra lemiamas veiksnys vertinant fotosensibilizatoriaus tinkamumą FNT. Sensibilizatorių farmakokinetinės, jų kaupimosi navikiniame audinyje bei toksinės savybės lemia jų perspektyvumą FNT. Labai svarbus sensibilizatoriaus parametras yra jo fotostabilumas (6 skyrius).

Sužadintos būsenos savybės. Fotosensibilizuota navikų nekrozė *in vivo* vyksta dalyvaujant deguoniui. Sensibilizuoti procesai gali vykti dviem būdais: I tipo reakcijų metu tarp į tripletą sužadinto sensibilizatoriaus ir substarto molekulės vyksta elektronų ar H atomų pernaša, II tipo procesų metu į tripletą sužadinto sensibilizatoriaus energija panaudojama deguonies molekulei sužadinti į labai reaktyvią singuletinę būseną (plačiau apie fotosensibilizuotas reakcijas – 5 sk.). Tad, ieškant efektyvių FNT sensibilizatorių, reikia įvertinti molekulinės struktūros ir aplinkos veiksnių (terpės, pH) poveikį tripletinės būsenos fizikocheminėms savybėms – (i) gyvavimo trukmei ir generavimo kvantiniam našumui, kuris nulemia į tripletinę būseną sužadinto sensibilizatoriaus aktyvumą difuzijos ribojamuose procesuose, (ii) redokso potencialui, nuo kurio priklauso elektronų kaitos su substratu efektyvumas, ir (iii) energijos lygį, nuo kurio priklauso ¹O₂ generacijos našumas.

4.10 lentelė. Kai kurių potencialių antrosios kartos sensibilizatorių fotofizikinės savybės

Sensibilizatorius	Tripleto kvantinis našumas	Singuletinio kvantinis deguonies generavimo našumas
Bakteriochlorinas	0,54	0,20
Zn(II)–ftalocianinas	0,67	0,53
Zn(II)–oktabutoksi–ftalocianinas	0,59	0,45
Zn(II)–ftalocianino tetrasulfonatas	0,46	0,35
Cu(II)–ftalocianinas	0,95	0,00
Si(IV)–naftalocianinas	0,39	0,19
Zn (II)–etiopurpurinas	0,83	0,57

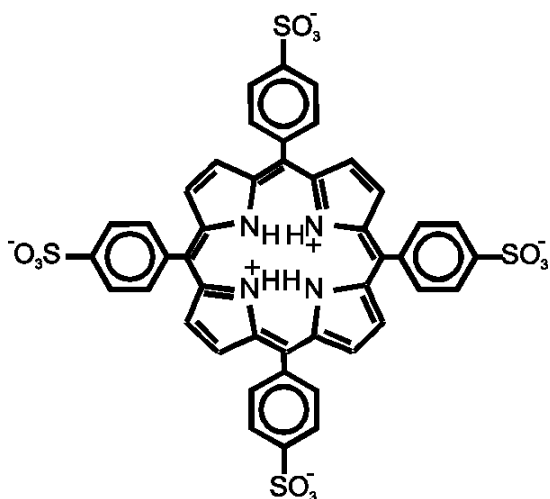
Porficenai	0,42	0,30
------------	------	------

4.10 lentelėje pateikti kai kurių antrosios kartos sensibilizatorių tripletų ir singuletinio deguonies generavimo kvantiniai našumai (Jori, 1992). Duomenys gauti tiriant monomerinės būsenos sensibilizatorius: ištirpintus organiniuose tirpikliuose arba inkorporuotus į tvarkias sistemas (pvz., liposomas). Kaip matyti iš lentelės duomenų, Zn(II) ir Si(IV) jonai, kurių koordinacinis skaičius 6, užtikrina pakankamą $^1\text{O}_2$ generavimo kvantinį našumą, tačiau Cu(II), kaip ir kiti pereinamieji *d* metalai, turintys nesuporuotų elektronų, slopina sensibilizacinį aktyvumą. Šoniniai pakaitai svarbūs tuo, kad silpnina agregatų susidarymą, o agreguotų darinių tripletų gyvavimo trukmės gerokai trumpesnės, tad ir sensibilizacinis efektyvumas mažesnis. Nuo ašinių ligandų prigimties priklauso hidrofilinės/lipofilinės savybės, o jos savo ruožtu kontroliuoja sensibilizatoriaus selektyvų pasiskirstymą ląstelėse ir audiniuose.

Dauguma naujos kartos sensibilizatorių yra tetrapirolų klasės junginiai. Jie turi daug privalumų: jų gana didelis singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas; be šviesos netoksiški; sugeria šviesą raudonojoje spektro srityje; yra gana fotostabilūs. Apžvelgsime pagrindinių sensibilizatorių grupių svarbiausius atstovus.

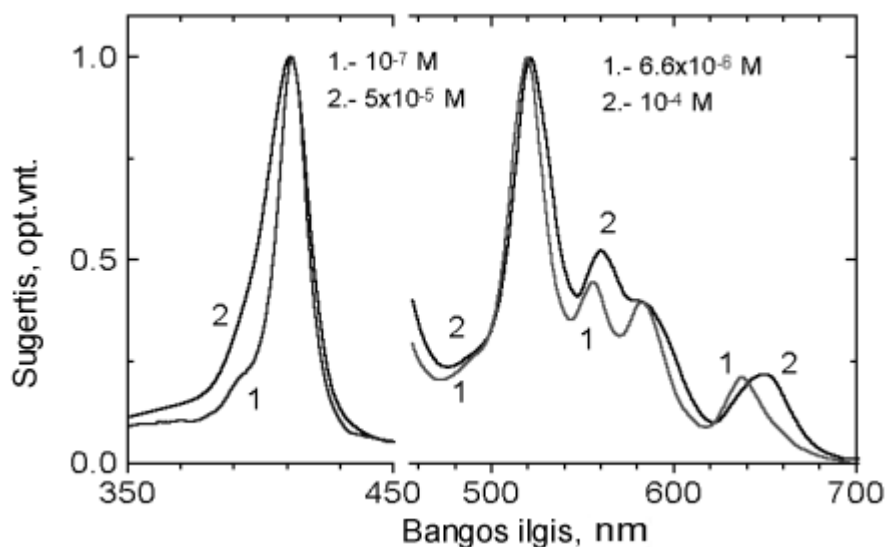
Mezo – tetrafenilporfino dariniai. Tetrafenilporfinų (4.16 pav.) sensibilizacinės savybės pastebėtos jau gana seniai (Berenbaum ir kt., 1986). Susintetintų 5,10,15,20–tetra(hidroksifenil)porfino (THPP) para–, meta– ir orto– izomerų fluorescencijos kvantiniai našumai maži, tačiau tripletų kvantiniai našumai dideli ($0,7\pm 10\%$) ir singuletinio deguonies generavimo kvantiniai našumai taip pat gana dideli ($0,6\pm 10\%$) (Bonnett ir kt., 1988). Šių junginių ilgabangės Q juostos sugerties maksimumai palyginti, su Hp ir HpD, yra labiau pasislinkę į raudonąją spektro pusę, bet moliniai ekstinkcijos koeficientai nedideli: p–THPP ($\lambda_{\text{maks}} = 656 \text{ nm}$) $\epsilon = 6800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; o–THPP ($\lambda_{\text{maks}} = 648 \text{ nm}$) $\epsilon = 1600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; m–THPP ($\lambda_{\text{maks}} = 648 \text{ nm}$) $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Sugertis raudonojoje spektro srityje (650–660 nm) ir didelis singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas yra labai pageidautinos fotofizikinės FNT sensibilizatorių savybės. *In vivo* eksperimentuose m–THPP pasirodė 25–30 kartų efektyvesnis už HpD (Berenbaum ir kt., 1986). Pelių navikų nekrozės gylis po FNT su p–THPP (švitinta 656 nm bangos ilgio šviesa) siekė 3–4 mm. Tačiau šių sensibilizatorių trūkumas – mažas tirpumas vandenyje. Tokio trūkumo neturi tetrafenilporfino sulfonato dariniai. FNT tikslams tinkamiausias yra tetrasulfonatofenilporfinas (TPPS₄) (4.16 pav.). Dar septintojo dešimtmečio pradžioje pastebėta, kad šis junginys gerai kaupiasi navikuose (Winkelman, 1962). Jis nesunkiai sintetinamas, gaunamas homogeninės sudėties, patvarus tamsoje ir gerai tirpsta

vandenyje. Plačiai tyrinėti TPPS dariniai, turintys 1–4 sulfonato– grupes: TPPS₁, TPPS_{2a} (dvi sulfonato– grupės gretimuose fenilo žieduose), TPPS_{2o} (dvi sulfonato grupės priešais esančiuose fenilo žieduose), TPPS₃ ir TPPS₄. Nelygu sulfonato grupių skaičius, šie junginiai skirtingai tirpsta vandenyje ir kaupiasi skirtingose ląstelių ir navikinių audinių vietose (Berg ir kt., 1990; Peng ir kt., 1990), o tai lemia jų skirtingą sensibilizacinį efektyvumą. *In vivo* eksperimentai parodė, kad labiau lipofiliniai TPPS₁ ir TPPS_{2a} daugiau kaupiasi ląstelių viduje, o labiau hidrofiliniai TPPS_{2o} ir TPPS₄ skverbiasi į naviko stromą (Peng ir kt., 1990). Fluorescencinės mikroskopijos metodais nustatyta, kad TPPS_{2a}, TPPS_{2o} ir TPPS₄ lokalizuojasi lizosomose, o TPPS₁ vidinėse ląstelės membranose (Berg ir kt., 1990). Mezo–tetrafenilporfirinai yra geresni elektronų donorai negu porfirinai, neturintys pakaitų mezo– padėtyse, tad šių dviejų tipų porfirinų rūgštinės–bazinės savybės skirtingos. TPPS_n junginių elektroninės savybės kinta priklausomai nuo aplinkos pH (Stone ir Fleischer, 1968). Rūgštinėje terpėje, esant pH vertėms artimoms esančioms lizosomose, TPPS₄ molekulė dėl elektroninių sąveikų įgyja dikatijono (TPPS₄H₂²⁺) pavidalą (4.17 pav.). Tokių dikatijonų spektrinės savybės skiriasi nuo neutraliame tirpale egzistuojančių TPPS₄ formų spektrinių savybių. Žinodami, kad navikams būdinga mažesnė negu normali audinių pH vertė (Thisthewaite ir kt., 1985) ir kad TPPS₄ geriau kaupiasi ląstelių lizosomose (Berg ir kt., 1990), kur aplinka taip pat rūgštinė, nuostoviosios spektroskopijos metodais tyrėme TPPS₄ spektrines savybes įvairaus rūgštingumo terpėse (Bagdonas ir Rotomskis, 1998). Tetrapirolinių sensibilizatorių agregacija turi įtakos jų fotofizikinėms savybėms, o joms keičiantis kinta ir sensibilizatorių efektyvumas FNT. Neutraliame tirpale (pH 7,2) TPPS₄ sugerties spektro forma būdinga porfirinų laisvoms bazėms, turinčioms D_{2h} simetriją: intensyvi SJ ultravioletinėje spektro srityje ir keturios mažiau intensyvios Q juostos matomoje spektro srityje (etio tipo spektras) (4.18 pav.) (Bagdonas ir Rotomskis, 1998).



4.17 pav. Tetrafeniltetrasulfonato porfino dikatijonas

Padidinus tirpalo koncentraciją SJ padėtis nepakinta, tačiau ji gerokai išplatėja, ypač trumpųjų bangų pusėje (4.18 pav.). Matomoje spektro srityje Q juostos pasislenka į raudonąją spektro pusę, daugiausia pasislenka ilgabangė juosta; taip pat vyksta sugerties intensyvumų persiskirstymas tarp dviejų vidurinių juostų.

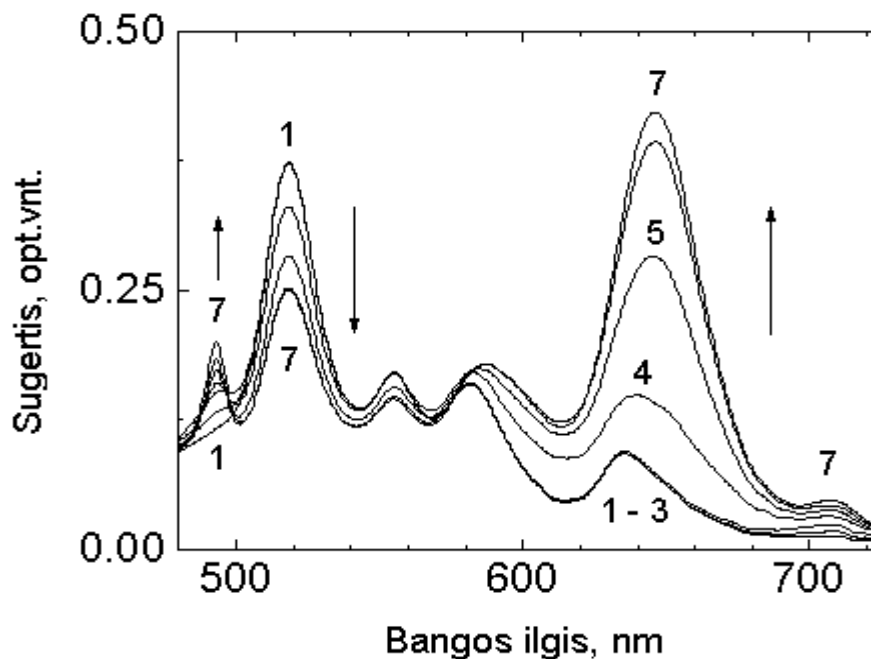


4.18 pav. Sunormuoti skirtingų koncentracijų TPPS₄ tirpalų buferyje (pH 7,2) spektrai

Tokie spektriniai pokyčiai būdingi “sendvičio” tipo agregatams. Panašūs pokyčiai buvo gauti į tirpalą pridėjus druskų, kurios ištirpusios padidindavo katijonų kiekį tirpale. Katijonai, apsupę sulfonato anijonus, palengvina dimerų susidarymą (Pasternack ir kt., 1972). Fenilo grupių pakaitų krūviai taip pat turi įtakos elektronų tankiui ties tetrapirolo žiedo azoto atomais (Pasternack ir kt., 1972). Dėl to molekulės centras labiau traukia

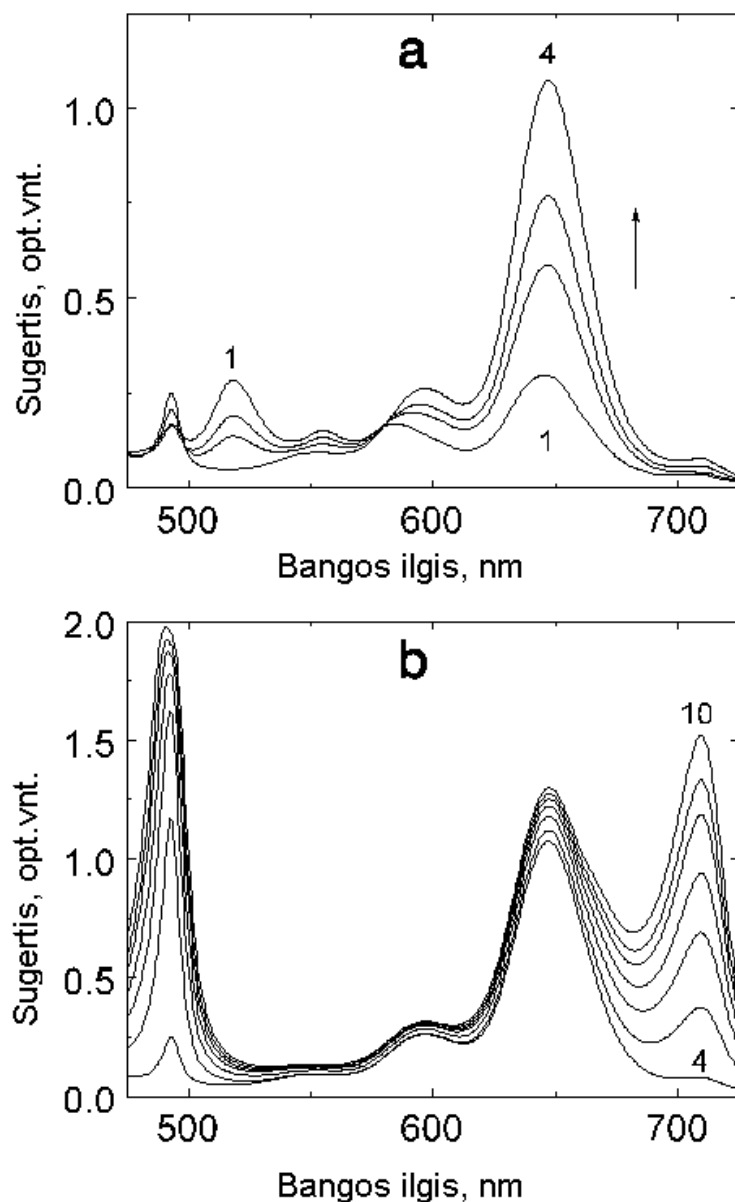
protonus ir susidaro geresnės sąlygos Van der Valso sąveikoms tarp dviejų molekulių formuojantis “sendvičio” tipo dimerams. Taigi TPPS₄ sugerties spektrų pokyčiai didėjant tirpalo koncentracijai, matyt, yra sąlygoti tokių – “sendvičio” tipo – dimerų (4.7 pav., a) susidarymo.

Kintant terpės pH, TPPS₄ tirpalo spektre taip pat pastebima nemažų pokyčių. Didėjant rūgštingumui matomoje spektro srityje pradinė sugertis mažėja; kartu formuojasi nauja juosta ties 650 nm ir neženkiai padidėja sugertis ties 590 nm; taip pat atsiranda naujas sugerties maksimumas ties 490 nm ir padidėja sugertis ties 710 nm (4.19 pav.).



4.19 pav. Pokyčiai, atsirandantys TPPS₄ sugerties spektruose didėjant terpės rūgštingumui

Šių pokyčių priežastis gali būti TPPS₄H₂²⁺ katijonų susiformavimas tirpale, kai pH < 5 (7 kreivė 4.19 pav., matyt, atspindi dikatijonų ir neutralių molekulių mišinio sugertį). Rūgščioje terpėje vykstanti porfirino žiedo azoto atomų protonizacija keičia molekulės simetriją iš D_{2h} į D_{4h} (Pottier ir Truscott, 1986), ir dikatijono TPPS₄H₂²⁺ sugerties spektre lieka dvi juostos – mažiau intensyvi ties 590 nm ir intensyvesnė ties 650 nm (4.20 a ir b pav., 4 kreivė).

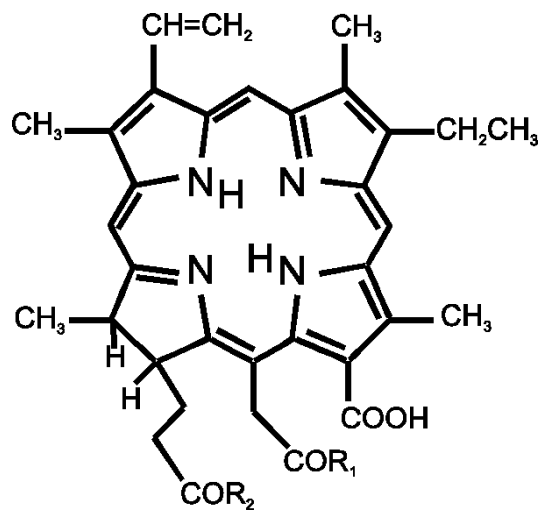


4.20 pav. Pokyčiai, atsirandantys TPPS₄ sugerties spektruose dėl: (a) laipsniško aplinkos pH mažėjimo (susidaro dikatijonai); (b) TPPS₄ koncentracijos didėjimo rūgščioje terpėje esant pastoviai pH vertei (susidaro dikatijonų agregatai)

Rūgščioje terpėje (pH<5) TPPS₄H₂²⁺ spektro forma priklauso nuo tirpalo koncentracijos (4.20 b pav.). Didėjant tirpalo rūgštingumui iš neutralių molekulių formuojasi dikatijonai (4.20 a pav., 1–4 kreivės). Rūgščioje terpėje didėjant TPPS₄H₂²⁺ koncentracijai labai išauga juostos ties 490 nm intensyvumas ir susiformuoja nauja juosta ties 710 nm. Šios juostos ima vyrauti, kai sensibilizatoriaus koncentracija viršija 10⁻⁵ M (4.20 b pav., 8–10 kreivės). Kadangi jų nėra neutraliuose TPPS₄ tirpaluose, o atsiranda tik rūgščiuose tirpaluose didėjant koncentracijai, manoma, kad jos priklauso agreguotoms katijoninėms sensibilizatoriaus formoms (Bagdonas ir Rotomskis, 1998). Taigi tirpaluose,

kurių pH vertės artimos ląstelių lizosomose esančioms pH vertėms, vyraujanti TPPS₄ forma yra TPPS₄H₂²⁺ dikatijonas, kurio ekstinkcijos koeficientas FNT naudojamoje raudonoje spektro srityje (ties 650 nm) yra didesnis, dėl to jis gali smarkiai pakeisti FNT efektyvumą.

Chlorinai. Palyginti su porfiriniais, chlorinai daug geriau sugeria šviesą raudonojoje spektro srityje. Dvi dvigubos jungtys porfirino molekulės pirolo žieduose priklauso kryžminei konjugacijai ir neįeina į pagrindinį aromatinį ciklą (4.15 pav., a). Redukavus vieną ar abi šias jungtis gaunami chlorinai (4.15 pav., b) arba bakteriochlorinai (4.15 pav., c). Tuose junginiuose išlieka nepakitęs pagrindinis aromatinis ciklas, tačiau, pasikeitus molekulės simetrijai, Q juostos ženkliai pasistumia į raudonąją spektro pusę ir išauga jų ekstinkcijos koeficientai. Gamta išnaudoja tokių redukuotų porfirinų molekulių optines savybes saulės energijos gaudymui fotosintezėje – chlorofilai ir bakteriochlorofilai veikia kaip antenos ir reakciniai centrai. Nėra ko stebėtis, kad junginiai, turintys gerą šviesos sugertį raudonojoje spektro srityje, buvo bandomi panaudoti FNT.



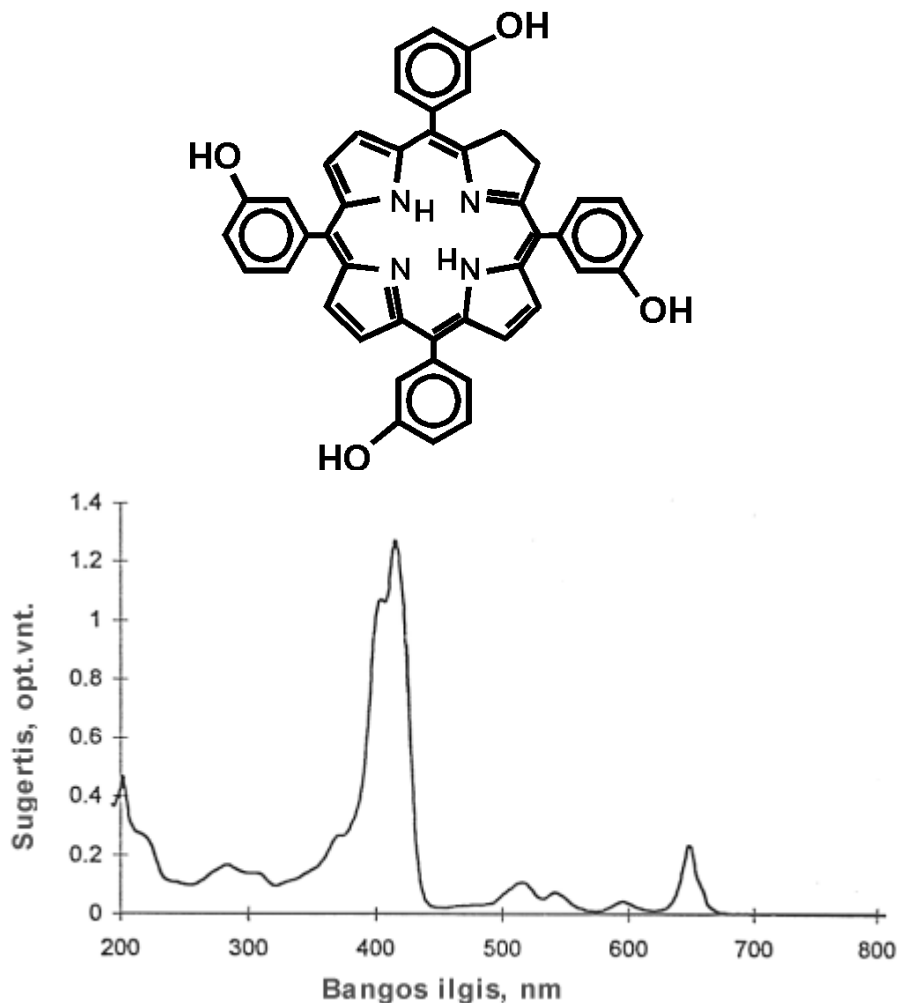
4.21 pav. Chlorinai. R₁ = R₂ = –OH (chlorinas e₆); R₁ = –OH; R₂ = –NHCH(COOH)CH₂COOH (chlorino e₆ monoaspartatas); R₁=R₂= –NHCH(COOH)CH₂COOH (chlorino e₆ diaspartatas)

Plačiausiai ištirtas ir turintis FNT tinkamas fotofizikines savybes yra chlorofilo A darinys chlorinas e₆ (Cle₆) (4.21 pav.). Jo ekstinkcijos koeficientas ties sugerties maksimumu (664 nm) raudonojoje spektro srityje yra 53000. Dėl tokių tinkamų savybių Cle₆ plačiai tirtas kaip potencialus FNT sensibilizatorius. Išsamūs ikiklinikiniai tyrimai

(toksiškumas, farmakokinetika, fotodinaminis poveikis įvairios histologijos navikams) atliekami Baltarusijos onkologijos ir medicininės radiologijos institute (Kostenich ir kt., 1994). Minske taip pat vyksta I fazės klinikiniai FNT bandymai panaudojant Cle_6 .

Kitas junginys – chlorino e_6 mono-L-aspartatas (4.21 pav.) pasižymi gera sugertimi raudonojoje spektro srityje (600–700 nm), mažai kaupiasi odoje (Roberts ir kt., 1988) ir gerai kaupiasi navikiniuose audiniuose (Aizawa ir kt., 1987), turi ilgą tripleto gyvavimo trukmę ir pakankamą singuletinio deguonies generavimo kvantinį našumą. Taigi šis junginys turi tinkamas FNT sensibilizatoriams savybes; *in vivo* eksperimentuose buvo gauti daug žadantys rezultatai, todėl su chlorino e_6 mono-L-aspartatu šiuo metu vykdomi klinikiniai tyrimai (Spikes ir Bommer, 1993).

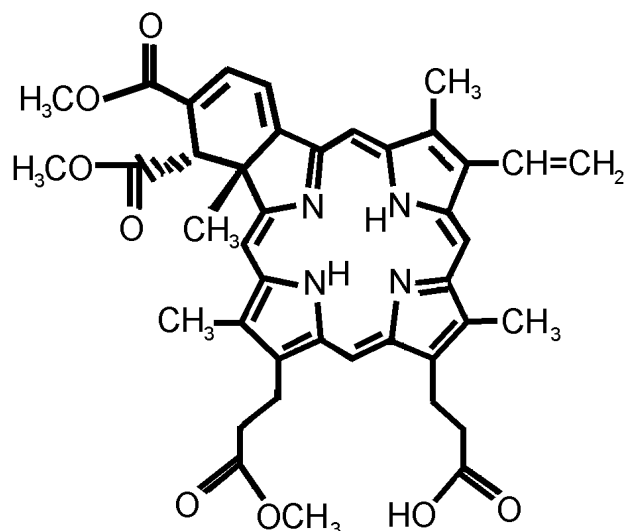
meta-Tetrahidroksifenilchlorinas. Šis junginys yra amfifilinės prigimties – jo molekulėje yra ir hidrofobinių, ir hidrofilinių sričių. Tokie junginiai šiuo metu laikomi tinkamiausiais FNT, nes dėl savo savybių jie geriau kaupiasi ir veikia navikines ląsteles. meta-Tetrahidroksifenilchlorinas (m-THPC) (dar vadinamas temoporfinu) (4.22 pav.) yra maždaug prieš dešimtį metų susintetintas sensibilizatorius (Bonnett ir kt., 1989), jau turintis komercinį pavadinimą – FOSKANASTM (gamina Scotia Quanta Nova) ir šiuo metu tiriamas paskutinėse klinikinių bandymų fazėse kvėpavimo takų ir virškinimo trakto navikų gydymui (Bonnett, 1999). m-THPC yra homogeniškas junginys, gerai sugeriantis šviesą raudonojoje spektro srityje ($\lambda_{\text{maks}}=650$ nm, $\varepsilon=33500$ M⁻¹cm⁻¹) ir turintis pakankamą singuletinio deguonies generavimo kvantinį našumą (Bonnett, 1995). Eksperimentuose su graužikų navikais m-THPC pasirodė gerokai pranašesnis už hematoporfirino darinius – jo selektyvumas ir priešnavikinis poveikis daug didesnis. Pirmieji FNT su m-THPC klinikiniai rezultatai paskelbti 1991 metais (Ris ir kt., 1991), o šiuo metu tokių duomenų jau sukaupta gana daug (Boyle ir Dolphin, 1996).



4.22 pav. meta–Tetrahidroksifenilchlorinas (temoporfinas) ir jo spiritinio tirpalo sugerties spektras

Temoporfinas yra fototoksiškiausias iš visų šiuo metu tiriamų antrosios kartos sensibilizatorių. Ir nors FNT naudojamos labai mažos jo dozės (apie 0,1 mg/kg) ir silpnas švitinimas (iki 10 J/cm²), jo poveikis yra maždaug 100 kartų stipresnis negu fotofrino, kurio dozė 2–5 mg/kg ir švitinimas – 100–200 J/cm². Tokio didelio šio sensibilizatoriaus efektyvumo priežastys nėra visiškai aiškios. Iš dalies jos paaiškinamos geromis optinėmis savybėmis ir dideliu singuletinio deguonies generavimo kvantiniu našumu, tačiau svarbiausia priežastis, matyt, glūdi specifinėje šio junginio lokalizacijoje navikinėse ląstelėse. Jei suleisti į organizmą lipofiliniai sensibilizatoriai jungiasi su lipoproteinais, o hidrofiliniai su serumo albuminais, tai temoporfinas gali būti prisijungęs prie nežinomo plazmos baltymo, kuris jį nuneša į specifines ląstelės vietas (Sharman ir kt., 1999).

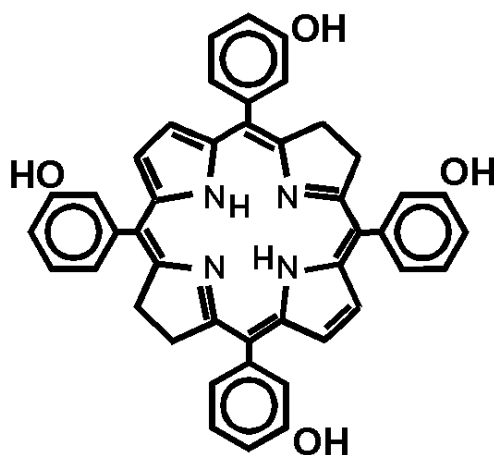
Benzoporfirino darinys (BPD). Šis junginys – tai chlorinas, turintis pailgintą konjuguotų ryšių grandinę (4.23 pav.) ir gerai sugeriantis raudoną šviesą ($\lambda_{maks}=690$ nm).



4.23 pav. Benzoporfirino darinys (verteporfinas)

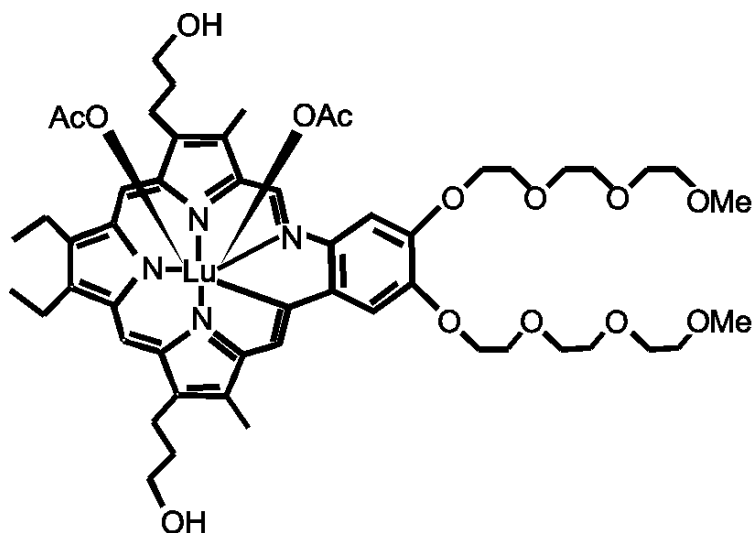
Jis pasižymi amfifiline prigimtimi, gerai kaupiasi navikiniame audinyje (Richter ir kt., 1990). Šiuo metu jau artėja į pabaigą klinikiniai bandymai su benzoporfirino dariniu FNT gydant odos navikus. BPD (dar vadinamą verteporfinu) jau sintetina gerai žinoma firma QLT PhotoTherapeutics Inc., ir šis sensibilizatorius, kaip ir m-THPC, matyt, bus pirmieji antros kartos sensibilizatoriai, aprobuoti klinikiniam gydymui.

Bakteriochlorinas. Bakteriochlorinų sugerties juosta raudonojoje srityje yra ties 730–760 nm. Vieno iš jų – meta-tetrahidroksifenilbakteriochlorinas (m-THPBC) (4.24 pav.), turinčio gerą sensibilizacinę aktyvumą *in vivo*, jau gaminama vaistinė forma (Scotia Quanta Nova).



4.24 pav. Meta-tetrahidroksifenilbakteriochlorinas

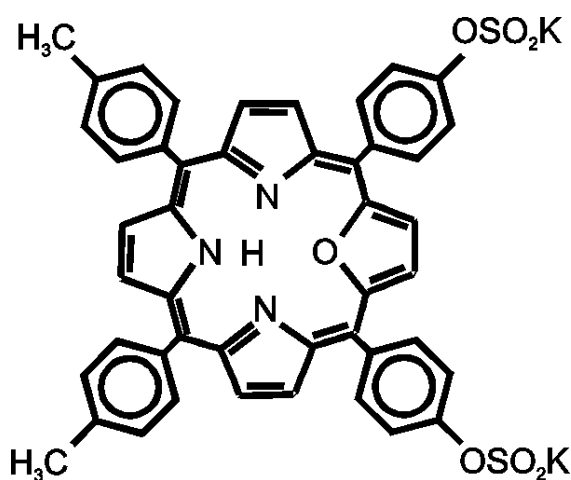
Teksafirinais. Teksafirinais – ne tetrapirolinės kilmės junginiai, turintys išplėstą koordinacinę sferą ir lengvai sudarantys metalų kompleksus. Nelygu pakaitai, jų sugerties maksimumas yra 600–900 nm spektriniame ruože. Teksafirinų lantano ir liutecio kompleksai pasižymi geru fotodinaminiu poveikiu *in vivo* (Sessler ir kt., 1994).



4.25 pav. Liutecio teksafirinas

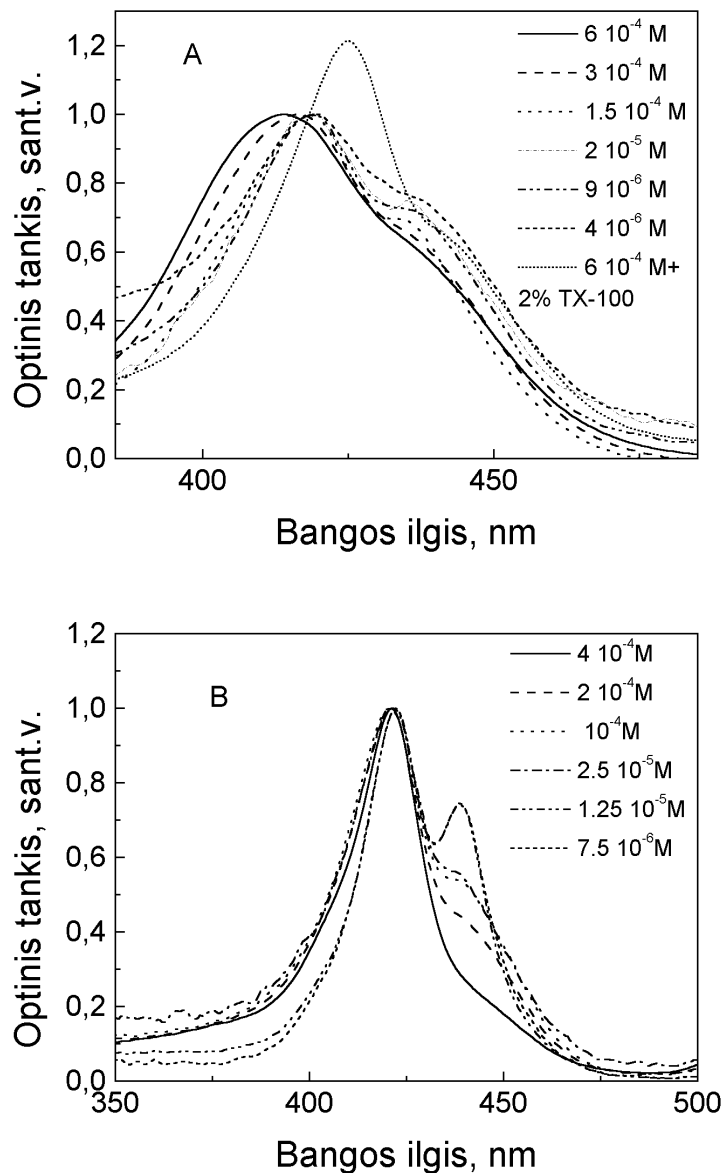
Lu–teksafirinas (4.25 pav.), prekinis pavadinimas LutrinasTM, šiuo metu tiriamas II klinikinių bandymų stadijoje krūties vėžiui gydyti.

21–oksaporfirinas. Ieškodami naujų, turinčių geresnes spektrines savybes, fotosensibilizatorių Vroclavo (Lenkija) universiteto Chemijos instituto mokslininkai susintetino naują junginį 5,20–bis(sulfofenil)–10,15–bis(p–toluil)–21–oksaporfiriną (SOP) (4.26 pav.).



4.26 pav. Sulfo–21–oksaporfirinas

Porfirino cikle azoto atomą pakeitus kitu heteroatomu gaunami sensibilizatoriai su FNT tinkamesnėmis fizikinėmis-cheminėmis savybėmis. *In vivo* eksperimentai parodė, kad SOP yra potencialus FNT sensibilizatorius, nesukeliantis nepageidaujamo ilgalaikio jautrumo šviesai (Ziolkowski ir kt., 1999). Bendradarbiaudami su Vroclavo universitetu ištyrėme šio junginio fotofizikines savybes (Strečkytė ir kt., 1998). Įvairios koncentracijos SOP tirpalų sugerties matavimai (4.27 A pav.) parodė, kad SOP vandeninėje terpėje sudaro agregatus, greičiausiai “sendvičio” tipo. Kadangi spiritas šių agregatų nesuardo iki monomerų (4.27 B pav.), jiems susidarant, matyt, veikia ne tik hidrofilinės–hidrofobinės, bet ir elektrostatinės sąveikos. SOP agregatinės būsenos taip pat priklauso nuo aplinkos pH. Sudėtingi spektrų pokyčiai rodo, kad, esant skirtingoms aplinkos pH vėrtėms, tirpaluose egzistuoja įvairių joninių formų ir agregatinių būsenų mišiniai. SOP yra gana fotostabilus – švitinant šviesos doze iki 950 J/cm^2 pastebimas tik 5% sugerties intensyvumo sumažėjimas (Strečkytė ir kt., 1998).



4.27 pav. Sulfo–21–oksaporfirino įvairių koncentracijų vandeninių (A) ir etanolinių (B) tirpalų sugerties spektrai

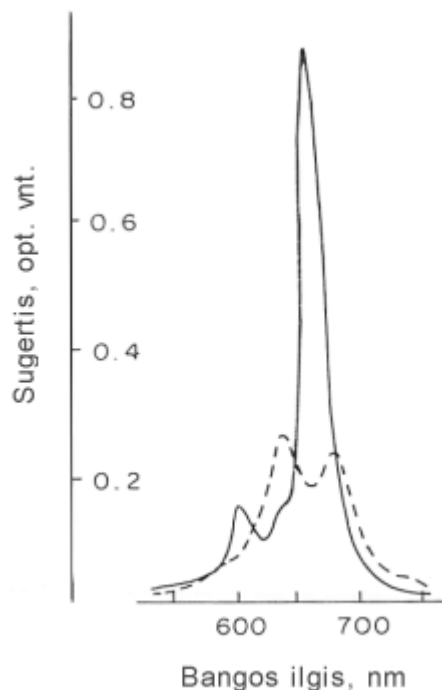
Tetraazaporfirinai – tai porfirinų dariniai, kuriuose mezo–padėties anglies atomas pakeistas azoto atomu. Tokių junginių susintetinta labai daug ir jiems būdinga stipri šviesos sugertis raudonojoje ir artimoje infraraudonoje spektro srityje. Kaip tik dėl šios savybės jie imti tyrinėti kaip potencialūs sensibilizatoriai FNT. Labiausiai ištirti ir perspektyviausi yra flalocianinai ir naftalocianinai.

Ftalocianinai (Fc) – porfirinai, kuriuose metino tiltelio anglis pakeista azotu, o makrociklo konjugaciją praplečia pirolų žiedai kondensuoti su vienu (ftalocianinuose) arba dviem (naftalocianinuose (Nc)) benzolo žiedais (4.14 pav.). Dėl taip pailgintos

konjugacijos grandinės tokie junginiai gerai sugeria raudoną šviesą. Jie lengvai sudaro patvarius metalų kompleksus, prijungdami metalo joną prie keturių makrociklo centre esančių azoto atomų (4.14 pav.). Mažo skersmens metalo jonai sudaro plokščias kompleksų struktūras, didesni – išsidėsto virš makrociklo arba suformuoja “sendvičio” tipo agregatus. Benzolo žieduose galimi įvairūs pakaitai; daugiausia sintetinama sulfodarinių, nes jie gerai tirpsta vandenyje. Fc netoksiški, stabilūs, gerai sugeria šviesą 660–700 nm srityje (ekstinkcijos koeficientai $> 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Pirmą kartą kaip potencialūs fotosensibilizatoriai FNT Fc pasiūlyti 1985 metais (Ben–Hur ir Rosenthal, 1985) ir nuo to laiko jie išsamiai tiriami. Šiuo metu net trys Fc tiriami klinikiniuose bandymuose. Tai sulfoninti aliuminio ftalocianinai (AlFcS): vienas – disulfonatas – AlFcS₂ – Anglijoje; kitas – sulfonatų mišinys AlFcS_x – Rusijoje. ZnFc įjungtas į liposomas tiriamas Šveicarijoje, o SiFc – JAV.

Spektrinės Fc savybės. Monomerinių Fc metalo kompleksų vandeninių tirpalų spektrams būdinga SJ ties 350 nm, nedidelis sugerties maksimumas ties 600 nm ir intensyvi sugerties juosta ties 670 nm (4.28 pav.). Šių junginių ekstinkcijos koeficientas yra dviem eilėmis didesnis už HpD ekstinkcijos koeficientą ties 630 nm.

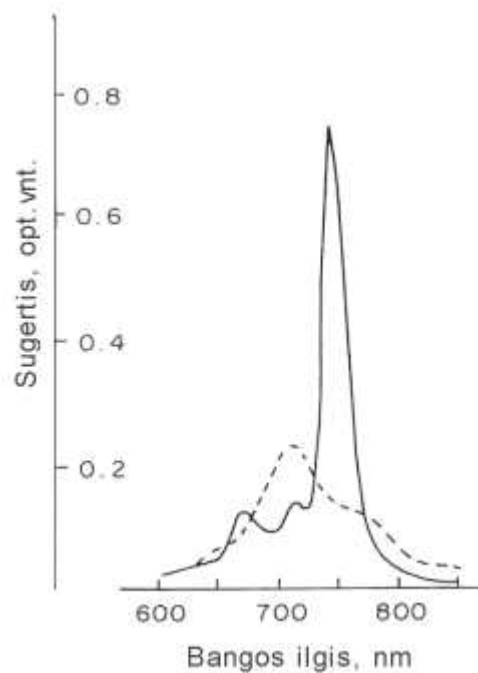
Vandenyje tirpių Fc metalo kompleksų sulfonatų (MFcS) sugerties maksimumų padėtis priklauso nuo terpės pH. Manoma, kad maksimumo poslinkiai atsiranda ne dėl makrociklo protonizacijos, o dėl prie centrinio metalo atomo koordinaciniais ryšiais prijungtų ašinių ligandų pokyčių (Ferraudi ir kt., 1988). Vandenyje tirpūs MFcS linę sudaryti dimerus ir agregatus, ypač atsidūrę biologinėje terpėje. Dimerų ir agregatų fotocheminis aktyvumas mažesnis negu monomerų. Spektuose agreguotų struktūrų susidarymą atspindi SJ ir juostos ties 670 nm trumpabangis poslinkis (4.28 pav.).



4.28 pav. Cinko ftalocianino vandeninio tirpalo (- - -) ir ištirpinto metanolyje (—) sugerties spektrai. Sensibilizatoriaus koncentracija $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$

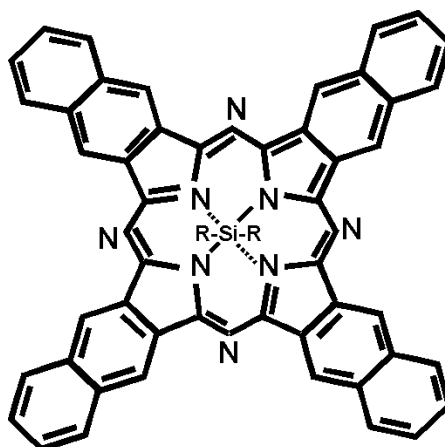
Fc polinkis sudaryti agregatus labai priklauso nuo pakaitų prigimties ir jų kiekio. Mažėjant sulfograpių didėja agregacija ir mažėja singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas. Ftalocianinų fotofizikinės savybės priklauso nuo centrinio metalo jono prigimties. Pereinamųjų metalų Fc kompleksai turi trumpas tripletų gyvavimo trukmes (ns eilės), diamagnetinių jonų (Zn^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+}) kompleksai pasižymi dideliu tripletų kvantiniu našumu ($>0,4$) ir ilga gyvavimo trukme (iki kelių milisekundžių) (Darwent ir kt., 1982). Gana ilgas gyvavimo laikas ir sužadintos tripletinės būsenos energija užtikrina didelį singuletinio deguonies generavimo kvantinį našumą (0,3–0,5) (Rosenthal ir kt., 1986). Tokie kompleksai labiausiai tinkami FNT.

Naftalocianinai (Nc). Kita perspektyvių FNT tetraazaporfirinų grupė – naftalocianinai (4.14 pav.). Fenilo pakeitimas naftilu smarkiai pakeičia naftalocianinų fotofizikines savybes – pagrindinė sugerties juosta dar labiau pasislenka į ilgųjų bangų pusę. ZnNc komplekso sugerties maksimumas yra ties 755 nm (4.29 pav.), AlNc – ties 768 nm.



4.29 pav. Cinko naftalocianino vandeninio tirpalo (- - -) ir ištirpinto metanolyje (—) sugerties spektrai. Sensibilizatoriaus koncentracija $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$

Naftalocianinų ekstinkcijos koeficientai didesni nei $10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Palyginti su Fc, Nc labiau linkę sudaryti agregatus, o agreguotos formos blogiau generuoja singuletinį deguonį (Daraio ir kt., 1991). Šie junginiai pasižymi dideliu fotosensibilizaciniu efektyvumu. Ypač perspektyvus atrodo Si naftalocianinas (4.30 pav.).



4.30 pav. Silicio naftalocianinas

Jo sugerties maksimumas yra ties 776 nm, $\epsilon=650000$ (benzole) (Kreimer–Birnbbaum, 1989), o tai labai tinkami parametrai sužadinti šviesa “fototerapijame lange”. SiNc tripletinės būsenos kvantinis našumas (0,20) yra artimas jo singuletinio deguonies

generavimo kvantiniam našumui (0,19) (Firey ir Rodgers, 1987). Šis junginys yra gana fotostabilus (Schnurpfeil ir kt., 1997) ir mažiau linkęs sudaryti agregatus negu kiti Nc (Zuk ir kt., 1994). Į liposomas inkorporuotas SiNc patenka į ląsteles monomerų pavidalu ir yra pakankamai fototoksiškas, tačiau jo selektyvus kaupimasis navikiniame audinyje nedidelis. Geresniam kaupimuisi pasiekti ir pašaliniais poveikiais sumažinti kuriamos naujos nešiklių sistemos (pvz., monokloniniai antikūnai).

Kadangi SiNc labiausiai sugeria šviesą matomos spektro srities raudonojoje dalyje, odos jautrumas šviesai yra daug mažesnis negu naudojant kitus sensibilizatorius. Taigi dėl geros šviesos sugerties 750–780 nm intervale ir pakankamo singuletinio deguonies generavimo našumo šie junginiai yra ypač perspektyvūs FNT, nes jiems sužadinti tinka patogūs ir santykinai pigūs diodiniai lazeriai.

Trečiosios kartos fotosensibilizatoriai – tai antrosios kartos sensibilizatorių dariniai, gaunami sujungiant juos su biomolekulėmis, padedančioms fotosensibilizatoriui selektyviai pasiekti taikinius navikiniame audinyje. Manoma, kad navikinės ląstelės turi tik joms būdingus antigenus. Prijungus fotosensibilizatoriaus molekules prie tuos antigenus atpažįstančių monokloninių antikūnų, jos selektyviai patenka į navikinį audinį ir gali jį sensibilizuoti (Hasan, 1992).

Visų kartų FNT naudojamų sensibilizatorių charakteristikų palyginimas pateiktas 4.11 lentelėje (Wohrle ir kt., 1998). Antrosios kartos sensibilizatoriai turi FNT tinkamesnes savybes negu pirmosios kartos sensibilizatoriai. Trečiosios kartos sensibilizatoriai dar tik pradkami tirti.

4.11 lentelė. Pirmosios (I), antrosios (II) ir trečiosios (III) kartos fotosensibilizatorių charakteristikų palyginimas

Palyginamas rodiklis	Efektas		
	I	II	III
<i>Sintezė</i>			
Gana nebrangi ir nelabai sudėtinga	Taip (+)	Dažniausiai (+)*	Ne
Struktūros homogeniškumas	Ne	Taip (+)	Taip (+)
<i>Savybės tirpale</i>			
Ilgabangė šviesos sugertis	Ne	Taip (+)	Taip (+)
Didelis sugerties koeficientas	Ne	Taip (+)	Taip (+)
Didelis sensibilizacinis aktyvumas	Taip (+)	Taip (+)	Taip (+)
Didelis stabilumas:			

fotooksidacinis	Taip	Taip ir ne (+)	Taip ir ne (+)
tamsinis	Taip	Taip (+) ir ne	Taip (+)ir ?
<i>Savybės in vitro ir in vivo</i>			
Greitas kaupimasis navike	Taip (+)	Taip (+)	?
Selektyvus kaupimasis navike	Ne	Ne	Taip (+)
Fotodinaminis aktyvumas	Taip (+)	Taip (+)	Taip (?)
Patvarumas <i>in vivo</i>	Taip	Taip ir ne (+)	?
Mažas tamsinis toksiškumas			
Platus taikymo spektras	Taip (+)	Taip (+)	?

* Ženklų (+) žymimas teigiamas efektas

Literatūra

Aizawa K., T. Okunaka, T. Ohtani, H. Kaabe, Y. Yasunaka, S.O. Hata, N. Ohtomo, K. Nishimiya, C. Konaka, H. Kato, Y. Hayata, T.Saito (1987) Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues. *Photochem.Photobiol.*, 46, 789–794.

Andreoni A., R. Cubeddu (1984) Photophysical properties of Photofrin II in different solvents. *Chem.Phys.Lett.*, 108, 141–144.

Andreoni A., R. Cubeddu (1984a) Time-resolved fluorescence measurements on porphyrins and furocoumarins. *Medicine Biologie Environment*, 12, 421–424.

Andreoni A., R. Cubeddu, S.De Silvestri, G. Jori, P. Laporta, E. Reddi (1983) Time-resolved fluorescence studies of hematoporphyrin in different solvent systems. *Z.Naturforsch*, 38 c, 83–89.

Andreoni A., R. Cubeddu, S.De Silvestri, P. Laporta, G. Jori, E. Reddi (1982) Hematoporphyrin derivative: experimental evidence for aggregated species. *Chem.Phys.Lett.*, 88, 33–36.

Auler H., G. Banzer (1942) Untersuchungen ueber die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen and Tieren. *Z.Krebsforsh*. 53, 65–72.

Bagdonas S, R. Rotomskis (1998) Investigation of spectroscopic properties of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine TPPS₄ in aqueous solutions of different acidity, *Lith.J.Phys.*, 38, 75–78.

Ben-Hur E., I. Roshental (1985) The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *Int.J.Radiat.Biol.*, 47, 145–147.

Berenbaum M.C., S.L. Akande, R. Bonnett et al (1986) meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitizers with favourable selectivity. *Br.J.Cancer*, 54, 717–25.

Berg K., J.C. Bommer, J. Moan (1989) Evaluation of sulphonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* 4, 7–15.

Berg K., J.C. Western, J.C. Bommer, J. Moan (1990) Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in a human carcinoma cell line. *Photochem.Photobiol.*, 52, 481–487.

Bonnett R., D.J. McGarvey, A. Harriman et al (1988) Photophysical properties of meso-tetraphenylporphyrin and some meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins. *Photochem.Photobiol.*, 48, 271–276.

Bonnett R. (1995) Studies on 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)-chlorin, m-THPC(Temoporfin). *SPIE Proc.*, 2371, 31–38.

Bonnett R. (1999) Photodynamic therapy in historical perspective. *Rev.Contemp.Pharmacother.*, 10, 1–17.

Bonnett R., R.D. White, U.-J. Winfield, M.C. Berenbaum (1989) Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem.J.*, 261, 277–280.

Bottiroli G., I. Freitas, F. Docchio, R. Ramponi, C.A. Sacchi (1984) The time-dependent behaviour of hematoporphyrin-derivative in saline: a study of spectral modifications. *Chem.-Biol.Interactions*, 49, 1–11.

Boyle R.W., D. Dolphin (1996) Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem.Photobiol.*, 64, 469–485.

Boyle R.W., W.F. Keir, A.H. Maclellan, G. Maguire, T.G. Truscott (1987) On the nature of the active component of haematoporphyrin derivative – Part 2. *Cancer Lett.*, 38, 9–14.

Brookfield R.L., (1984) Time-resolved fluorescence spectroscopy of haematoporphyrin. In: *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, NATO ASI Series, A85, 329–333.

Brown S.B., M. Shillcock, P. Jones (1976) Equilibrium and kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem.J.*, 153, 279–285.

Chernyaeva E., A. Vardanyan, N. Koroteev, V. Kamalov, O. Lobanov (1991) Laser picosecond microfluorometry of haematoporphyrin in cells and liposomes. *J.Photochem.Photobiol., B: Biol.*, 10, 239–248.

Cubbedu R., R. Ramponi, G. Bottiroli (1986a) Disaggregation effects on hematoporphyrin derivative in the presence of surfactants at different concentrations: temperature dependence. *Proceedings of SPIE conference ECOOSA, Florence*, 701, 316–319.

Cubbedu R., R. Ramponi, G. Bottiroli (1986b) Time-resolved spectroscopy of hematoporphyrin derivative in micelles. *Chem.Phys.Lett.*, 128, 439–442.

Cubbedu R., R. Ramponi, C.A. Sacchi, G. Bottiroli, A.C. Groce, P. Spinelli, M. dal Fante, T.G. Truscott, F. Keir (1987 b) Photophysical properties of hematoporphyrin compounds for tumor diagnosis and therapy. *Proceedings of the First European Workshop on Lasers in Medicine*, 97–110.

Cubbedu R., R. Ramponi, P. Taroni (1990) Time-gated fluorescence spectroscopy of porphyrin derivatives incorporated into cells. *J.Photochem.Photobiol., B: Biol*, 6, 39–48.

Cubbedu R., R. Ramponi, W.-Q. Liu, F. Docchio (1989) Time-gated fluorescence spectroscopy of the tumor localizing fraction of HpD in the presence of cationic surfactant. *Photochem. Photobiol.*, 50, 157–163.

Cubbedu R., W. Keir, R. Ramponi, G. Truscott (1987 a) Photophysical properties of porphyrin–chlorin systems in the presence of surfactants. *Photochem. Photobiol*, 46, 633–638.

Daraio M.E., P.F. Aramendia, E.A. San Roman, S.E. Braslavsky (1991) Carboxylated Zinc–phthalocyanines–II. Dimerization and singlet molecular oxygen sensitization in hexadecyltrimethylammonium bromide micelles. *Photochem.Photobiol.*, 54, 367–373.

Darwent J.R., P. Douglas, A. Harriman, G. Porter, M.-C. Richoux (1982) Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coord.Chem.Rev.*, 44, 83–126.

Docchio F., R. Ramponi (1988) Equilibrium among hematoporphyrin–derivative components: influence of the interaction with cellular structures. *Photochem. Photobiol.*, 47, 209–214.

Docchio F., R. Ramponi, C. Sacchi, G. Bottirololi, I. Freitas (1982) Time-resolved microscopy of hematoporphyrin derivative in cells. *Lasers in Surg. and Med.*, 2, 21–28.

Docchio F., R. Ramponi, C. Sacchi, G. Bottirololi, I. Freitas (1984) Time-resolved fluorescence of hematoporphyrin-derivative in human lymphocytes. *Chem.-Biol. Interactions*, 50, 135–141.

Dougherty T.J.(1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumours. *Photochem.Photobiol.*, 45, 879–889.

Dougherty T.J., T.S. Mang (1987) Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component. *Photochem.Photobiol.*, 46, 67–70.

Dougherty T.J., W.R. Potter, K.R. Weishaupt (1984) The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. In: *Porphyrin localization and treatment of tumours*, D.R.Doiron, C.J.Gomer (eds.).New York, Liss, 301–314.

Ferraudi G., G.A. Arguello, H. Ali, J.E.van Lier (1988) Types I and II sensitized photooxidation of aminoacid by phthalocyanines: a flash photochemical study. *Photochem.Photobiol.*, 47, 657–660.

Firey P.A., M.A.J. Rodgers (1987) Photo-properties of a silicon naphthalocyanine: a potential photosensitizer for photodynamic therapy. *Photochem.Photobiol.*, 45, 535–538.

Grossweiner L.I., G.C. Goyal (1984) Binding of hematoporphyrin derivative to human serum albumin. *Photochem.Photobiol.*, 40, 1–4.

Gurinovich G.P., A.N. Sevchenko, K.N. Solovyev (1961) Limited polarization of porphyrins fluorescence. *Opt.Spektrosk.*, 10, 750–758.

Hasan T. (1992) Photosensitizer deliver mediated by macromolecular carrier systems. In: B.W. Henderson, T.J. Dougherty (eds.), *Photodynamic therapy. Basic principles and clinical applications*, Marcel–Dekker, New York, 1992, 187–200.

Jori G.(1992) Far-red-absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumours. *J.Photochem.Photobiol. A: Chem.*, 62, 371–378.

Jori G. (1996) Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J.Photochem.Photobiol. B: Biol.*, 36, 87–93.

Kapociute R., R. Rotomskis, J. Rotomskiene, K. Toth, R. Gadonas, G. Ronto (1989) Hematoporphyrin diacetate aggregation and protonation properties in terms of absorption spectroscopy. *Lasers and Ultrafast Processes*, Vilnius University Press, 2, 115–130.

Kapociute R., T. Szito, R. Rotomskis, J. Rotomskiene (1991) The effect of solution pH on the aggregation degree of hematoporphyrin diacetate. In: R.H. Douglas, J. Moan, G. Ronto (eds.) *Light in biology and medicine*, Plenum Press, New York and London, 2, 277–282.

Karns G.A., W.A. Gallagher, W.B. Elliott (1979) Dimerization constants of water-soluble porphyrins in aqueous alkali. *Bioorg.Chem.*, 8, 69–81.

Kessel D.(1986) Proposed structure of the tumor-localizing fraction of HPD (hematoporphyrin derivative). *Photochem.Photobiol.*, 44, 193–196.

Kessel D., C.K. Chang, B. Musselman (1985) Chemical, biologic and biophysical studies on hematoporphyrin derivative. In: *Methods in porphyrin photosensitization*, D. Kessel (ed.). Plenum Press: New York, 213–227.

Kinoshita S., T.-F. Liu, T. Seki, T. Kushida (1988) Fluorescent properties of hematoporphyrin derivative in solutions and biological cells. *Journal of Luminescence*, 40–41, 581–582.

Kohler G., N. Getoff (1989) Photophysical properties of hematoporphyrin and dihematoporphyrin ether (ester) in homogeneous and microheterogeneous environments. *Z.Naturforsch.*, 44a, 307–312.

Kostenich G.A., I.N. Zhuravkin, E.A. Zhavrid (1994) Experimental grounds for using chlorin e_6 in the photodynamic therapy of malignant tumors. *J.Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 22, 211–217.

Kreimer-Birnbaum M. (1989) Modified porphyrins, chlorins, phthalocyanines and purpurins: second-generation photosensitizers for photodynamic therapy. *Seminars in Hematology*, 26, 157–173.

Kuzmitskij V.A., K.N. Solovyov, M.P. Tsvirko (1987) Spectroscopy and quantum chemistry of porphyrins. In N.S.Enikolopian (ed.) *Porphyrins: spectroscopy, electrochemistry, application*, Mir, Moscow, 7–126.

Land E.J., R.W. Redmond, T.G. Truscott (1986) On the nature of the active component of haematoporphyrin “derivative”. *Cancer Lett.*, 32, 181–185.

Van Lier J.E., J.D. Spikes (1989) The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. In: G.Bock, S.Harnett (eds.) *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*, John Wiley and Sons, Chichester, 17–32.

Lipson R.L., E.J. Baldes, A.M. Olsen (1961) The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J.Nat.Cancer Inst.*, 26, 1–11.

Moan J. (1984) The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem.Photobiol.*, 39, 445–449.

Moan J.(1990) Properties for optimal PDT sensitizers. *J.Photochem.Photobiol., B: Biol.*, 5, 521–524.

Moan J., C. Rimington, A. Western (1985) The binding of dihematoporphyrin ether (Photofrin II) to human serum albumin. *Clin.Chim.acta*, 145, 227–236.

Moan J., S. Sommer (1983) Uptake of components of hematoporphyrin derivative by cells and tumours. *Cancer Lett.*, 21, 167–174.

Moan J., S. Sommer (1984) Action spectra for hematoporphyrin derivative and Photofrin II with respect to sensitization of human cells in vitro to photoinactivation. *Photochem.Photobiol.*, 40, 631–634.

Moan J., T. Christensen (1980) Porphyrins as tumour localizing agents and their possible use in photochemotherapy of cancer. A review. *Tumour Res.*, 15, 1–10.

Moan J., T. Christensen, S. Sommer (1982) The main photosensitizing components of hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.*, 15, 161–166.

Paquette B., H. Ali, R. Langlois, J.E.van Lier (1988) Biological activities of phthalocyanines. VIII. Cellular distribution in V-79 Chinese hamster cells and phototoxicity of selectively sulfonated aluminium phthalocyanines. *Photochem.Photobiol.*, 47, 215–220.

Paquette B., J.E.van Lier (1992) Phthalocyanines and related compounds: structure–activity relationships, In: B.Henderson, T.J.Dougherty (eds.) *Photodynamic therapy, basic principles and clinical application*, Marcell Dekker, New York, 145–156.

Pasternack R.F., P.R. Huber, P. Boyd, G. Engasser, L. Francesconi, E. Gibbs, P. Fassela, G. Cerio Venturo, L.de C. Hinds (1972) Structure of aggregates of water soluble porphyrins. *J.Am.Chem.Soc.*, 94, 4511–4517.

Peck G.C., H.P. Mack, W.A. Holbrook, F.H.J. Figge (1955) Use of hematoporphyrin fluorescence in biliary and cancer surgery. *Am.Surgeon*, 21, 181–188.

Peng Q., J. Moan, G. Farrants, H.E. Danielse, C. Rimington (1990) Localisation of potent photosensitizers in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy. *Cancer Lett.*, 53, 129–139.

Pottier R., J.C. Kennedy (1990) The possible role of ionic species in selective biodistribution of phototherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.*, 8, 1–16.

Pottier R., J.P. Laplante, Y.-F.A. Chow, J. Kennedy (1985) Photofrins: a spectral study. *Can.J.Chem.*, 63, 1463–1467.

Pottier R., T.G. Truscott (1986) The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *Int.J.Radiat.Biol.*, 50, 421–452.

Rasmussen–Taxdal D.S., G.E. Ward, F.H.J. Figge (1955) Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer*, 8, 78–81.

Reddi E., G. Jori (1988) Steady–state and time–resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines. *Reviews of Chemical Intermediates*, 10, 241–268.

Redmond R.W., E.J. Land, T.G. Truscott (1985) Aggregation effects on the photophysical properties of porphyrins in relation to mechanisms involved in photodynamic therapy. In: D.Kessel (ed.) *Methods in porphyrin photosensitization.*, Plenum Press: New York, London, 293–302.

Richter A.M., S. Cerruti–Sola, E.D. Sternberg, D.Dolphin, J.G. Levy (1990) Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (3H–bpd–MA), a new potent photosensitizer, in normal and tumor bearing mice. *J.Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 5, 231–244.

Ris H.B., H.J. Altermatt, R. Inderbitzi, R. Hess, B. Nachbur, J.C. Stewart, Q. Wang, C.K. Lim, R. Bonnett, M.C. Berenbaum (1991) Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: Initial clinical results. *Br.J.Cancer*, 64, 1116–1120.

Roberts W., F. Shiao, J.S. Nelson, K. Smith, M. Berns (1988) In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e_6 for photodynamic therapy. *J.Natl.Cancer Inst.*, 80, 330–336.

Röder B., H. Wabnitz (1987) Time–resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide *a* and chlorin e_6 in ethanol and aqueous solution. *J. Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 1, 103–113.

Rosenthal I., C.M. Krishna, P. Riesz, E. Ben–Hur (1986) The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines. *Radiat.Res.*, 107, 136–142.

Rotomskis R. (1989) Spectroscopy of porphyrins used in photosensitized tumor therapy. *Lasers and Ultrafast Processes*, Vilnius University Press, 2, 98–114.

Rotomskis R. (1991) Time-resolved picosecond absorption spectroscopy of pigments: biological and medical aspects. *Lasers and Ultrafast Processes*, Vilnius University Press, 4, 211–219.

Rotomskis R., A. Baltuska, A. Pugzlys, V. Vaicaitis, R. Gadonas, A. Piskarskas (1993) Time-resolved absorption spectroscopy of sensitizers used in photochemotherapy of tumours. *Biomedical Spectroscopy III*, L.A.Nafie, H.H.Mantsch (eds.), Proc.SPIE, 1890, 24–29.

Rotomskis R., G. Streckyte, J. Didziapetriene (1995 a) Steady state and time-resolved spectroscopy of porphyrins aggregates: relation to photosensitized tumour therapy. In: 5th International Conference on Laser Applications in Life Sciences, P.A. Apanasevich, N.I. Koroteev, S.G. Kruglik, V.N. Zadkov (eds), Proc. SPIE, 2370, 73–84.

Rotomskis R., G. Streckytė, J. Didžiapetrienė, L. Gričiūtė, A. Ibelhauptaitė (1995 b) Apie fotosensibilizacinę navikų terapiją. *Medicina*, 31, 666–676.

Schneckenburger H., F. Pauker, E. Unsold D. Jocham (1985) Intracellular distribution and retention of the fluorescent components of Photofrin II. *Photobiochem. Photobiophys.*, 10, 61–67.

Schneckenburger H., H.K. Seidlitz, J. Eberz (1988) Time-resolved fluorescence in photobiology. *J.Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 2, 1–19.

Schneckenburger H., H. Seidlitz, J. Wessels (1992) Intracellular fluorescence polarization, picosecond kinetics, and light-induced reactions of photosensitizing porphyrins. *Optical Engineering*, 31, 1482–1486.

Schneckenburger H., J. Feyh, A. Götz, M. Frenz, W. Brendel (1987) Quantitative in vivo measurement of the fluorescent components of Photofrin II. *Photochem. Photobiol.*, 46, 765–768.

Schneckenburger H., T. Wustrow (1988) Intracellular fluorescence of photosensitizing porphyrins at different concentrations of mitochondria. *Photochem. Photobiol.*, 47, 471–473.

Schnurpfeil G., A.K. Sobbi, H. Kliesch, S. Muller, H. Eichhorn, D. Wohrle (1997) Photochemical stability and the correlation with semiempirical MO-calculations of various porphyrins in solution. *J.Porphyrins Phthalocyanines*, 1, 159–167.

Schwartz S., K. Absolon, H. Vermund (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. *Bull.Minn.Univ.Sch.Med.*, 27, 7–13.

Seidlitz H., H. Schneckenburger, K. Stettmaier (1990) Time-resolved polarization measurements of porphyrin fluorescence in solution and in single cell. *J.Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 5, 391–400.

Selensky R., D. Holten, M.W. Winsdor, J.B. Paine III, D. Dolphin, M. Goutherman, T.C.Thomas (1981) Excitonic interactions in covalently linked porphyrin dimers. *Chem.Phys.*, 60, 33–46.

Sessler J.L., G Hemmi., T.D. Mody, T. Murai, A. Burrell, S.W. Young (1994) Texapyrins: synthesis and applications. *Acc.Chem.Res.*, 27, 43–50.

Sharman W.M., C.M. Allen, J.E.van Lier (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *DDT*, 4, 507–517.

Smith G.J.(1985) The effects of aggregation on the fluorescence and the triplet state yield of hematoporphyrin. *Photochem.Photobiol.*, 41, 123–126.

Smith K.M.(1975) General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: K.M.Smith (ed.) *Porphyrins and metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York, 3–28.

Sommer S., C. Rimington, J. Moan (1987) Porphyrin derivatives having physical and chemical characteristics similar to those of the active components of hematoporphyrin derivative and with very strong photosensitizing effects. *J.Photochem.Photobiol., B: Biol.*, 1, 241–246.

Spikes J.D.(1975) Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitziers. *Ann. NY Acad.Sc.*, 244, 496–508.

Spikes J.D., Bommer J.C.(1993) Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e₆ (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. *J.Photochem.Photobiol., B: Biol.*, 17, 135–143.

Stone A., E.B. Fleischer (1968) The molecular and crystal structure of porphyrin diacids. *J.Am.Chem.Soc.*, 90, 2735–2748.

Streckyte G., P. Ziolkowski, B. Osiecka, K. Symonowicz, R. Rotomskis (1998) New sensitizer in PDT sulfoxaporphyrin: photophysical properties Proceedings of the 7th International Photodynamic Conference, Nantes, France, CD-ROM.

Streckyte G., R. Rotomskis (1993 a) Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. *J.Photochem.Photobiol.*, 18, 259–263.

Streckyte G., R. Rotomskis (1993 b) Phototransformations of porphyrins under clinically relevant light irradiation. *Biologija*, Nr.3, 26–31.

Swincer A.G., D. Ward, G.J. Howlett (1985) The molecular weight of hematoporphyrin derivative, its gel column fractions and some of its components in aqueous solution. *Photochem.Photobiol.*, 41, 47–50.

Thistlethwaite A.J., B. Leeper, D.J. Moylar, III, R.D. Nerlinger (1985) pH distribution in human tumors. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 11, 1647–1652.

Truscott T.G. (1986) The photochemistry of haematoporphyrin and some related compounds. *J.Chem.Soc., Faraday Trans.2*, 82, 2177–2181.

Turay J., P. Hambright, N. Datta–Gupta (1978) Intermolecular association of natural and synthetic water soluble porphyrins. *J.Inorg.Nucl.Chem.*, 40, 1687–1688.

Wike–Hooley J.L., J. Haveman, H.S. Reinhold (1984) The relevance of tumor pH to the treatment of malignant diseases. *Radiother.Oncol.*, 2, 343–366.

Winkelman J.W. (1962) The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor–bearing rat. *Cancer Res.*, 22, 589–596.

Winkelman J.W., S. Kimel (1990) The relationship between porphyrin transport in tissue uptake with photosensitization from $^1\text{O}_2$. In: D.Kessel (ed) *Photodynamic therapy of neoplastic disease*. CRC Press, Boca Raton, Florida, vol.II, 29–42.

Wohrle D., A. Hirth, T. Bogdahn–Rai, G. Schnurpfeil, M. Shopova (1998) Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *Izv.Akademii Nauk, Ser.Chimicheskaya*, Nr.5, 836–845.

Yamashita M., M. Nomura, S. Kobayashi, T. Sato, K. Aizawa (1984) Picosecond time–resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin derivative. *IEEE J.Quantum Electron.*, 20, 1363–1369.

Yamashita M., T. Tomono, S. Kobayashi, K. Torizuka, K. Aizawa, T. Sato (1988) Picosecond fluorescence spectroscopy on incorporation processes of hematoporphyrin derivative into malignant tumor cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 47, 189–192.

Ziolkowski P., K. Symonowicz, P. Chmielewski, L. Latos–Grazynski, G. Streckyte, R. Rotomskis, J. Rabczynski (1999) New potent sensitizers for photodynamic therapy: 21–oxaporphyrin, 21–thiaporphyrin and 21,23–dithiaporphyrin induce extensive tumor necrosis. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 125, 563–568.

Zuk M.M., B.D. Rither, M.E. Kenney, M.A.J. Rodgers, M. Kreimer–Birnbaum (1994) Pharmacokinetic and tissue distribution studies of the photosensitizer bis(di–isobutyl octadecylsiloxy)silicon–2,3–naphthalocyanine (isoBOSINC) in normal and tumor–bearing rats. *Photochem.Photobiol.*, 59, 66–72.

SUMMARY

4. PHOTSENSITIZERS

Photosensitizers are compounds that are capable of absorbing light of a specific wavelength and transforming it into useful energy. In the case of PTT, this would involve the production of lethal cytotoxic agents. There are hundreds of natural and synthetic dyes that can function as photosensitizers for PTT, ranging from plant extracts to complex synthetic macrocycles.

No photosensitizer can be deemed ideal for every possible application. A number of photosensitizers have been developed to take advantage of their more ideal properties.

An ideal photosensitizer for PTT would have the following characteristics (Bonett, 1995; Jori, 1996):

- be chemically pure and of known and constant composition;
- have a minimal dark toxicity and only be toxic in the presence of light;
- be preferentially retained by the cancerous tissue;
- be rapidly excreted from the body, thus inducing a low systemic toxicity;
- have a high photochemical reactivity with high triplet-state yields and long triplet-state lifetimes and be able to effectively produce singlet oxygen and other reactive oxygen species;
- have a strong absorbance with a high extinction coefficient at a longer wavelength (600-800 nm) where tissue penetration of light is at a maximum while still being energetic enough to produce singlet oxygen;
- be optimally photostable.

The first generation photosensitizers are hematoporphyrin derivatives and are the most commonly used photosensitizers. Hematoporphyrin derivatives were originally synthesized by combining hematoporphyrin with 5% sulphuric acid in acetic acid at room temperature (Bonett, 1995). Subsequently, the mixture was treated with an aqueous base and then neutralized. This led to the formation of a complex mixture of dimers and oligomers primarily involving ester and ether linkages (Boyle et al., 1987; Kessel et al., 1985). Purification of the most active of these oligomers by high performance liquid chromatography or size-exclusion gel chromatography lead to Photofrin[®] (Fig.4.2. Structure of Photofrin[®]).

4.1. Steady state spectroscopy of first generation photosensitizers

Porphyrins (Fig.4.6. Porphyrins) and related tetrapyrrolic macrocyclic compounds are prosthetic groups of a large number of biologically active molecules which serve diversified roles in nature. The porphyrin nucleus with its conjugated 18 π electron system constitutes a highly stable macrocyclic system.

All the porphyrin spectra are characterized by a strong absorption band near 400 nm. This band is usually referred to as the Soret band. Less intense ($\cong 1/10$ Soret) bands are observed in the visible region (450-700 nm), and are called Q bands. The number of Q bands depends on the protonation state of the nitrogen of the tetrapyrrole nucleus, and also on metal chelation at the centre of the porphyrin ring. The Soret band is relatively insensitive to changes in protonation state and peripheral groups but is very sensitive to changes in the state of aggregation of the porphyrin. The visible Q bands are very sensitive to the chemical structure of the porphyrin, along with changes in the microenvironment. The visible bands of the neutral free base porphyrins have been classified into four distinct spectral types (Smith, 1975). The classification is based on the relative intensity of the four main visible bands, and this in turn is related to the type, number and relative positions of peripheral substitutions. Porphyrins used as photosensitizers in PTT has aetio type spectra. In this category, the relative intensity of the visible Q bands decreases upon going from shorter to longer wavelengths. Such spectra are observed in neutral solutions of all the neutrally occurring porphyrins, such as proto-, copro- and uro- along with deuterio-, hemato- and pyrro-porphyrins.

We have investigated spectroscopic properties of the following porphyrins: hematoporphyrin (Hp), hematoporphyrin derivative (HpD), hematoporphyrin diacetate (Hp-Diac), dimethoxyhematoporphyrin (DMHp), Photosan (PS) and Photofrin (PF). All these compounds exhibit aetio type spectra.

It is well known that in aqueous solutions porphyrins exist as a mixture of monomers and aggregates (Brown et al., 1976). In ethanol solutions the absorption spectra of porphyrins show the Soret band without the blue shifted shoulder characteristic for aggregated porphyrins. Spectroscopic characteristics of porphyrins in different environmental conditions are presented in Table 4.1 (Spectroscopic characteristics of porphyrins solutions) and Fig.4.6 (Porphyrins absorption spectra: A – in phosphate buffered solution, concentration – 1,2,3– 10^{-3} M, 4,5,6– 10^{-6} M; B – 1,2,3 –in ethanol

solution, 4,5,6 – in the presence of 1% Triton X-100) (Strečkyte and Rotomskis, 1993a; Strečkyte and Rotomskis, 1993b).

On the basis of the spectroscopic characteristics it was concluded that in aqueous solutions Hp, DMHp and PS create “sandwich”-type equilibrium aggregates (Karns et al., 1979) (Fig. 4.7 a. Suggested structures of porphyrins dimers). The presence of these aggregates is reflected by the Soret band intensity at 365 nm changes dependence on concentration (Fig. 4.6 A). PS in ethanol and highly diluted aqueous solutions is a mixture of covalently-linked linear (Fig.4.7 b), intramolecular (Fig.4.7 c) and “sandwich”-type aggregates (Fig. 4.7 d); Hp contains covalently-linked linear-type aggregates (Fig. 4.7 b) and DMHp only monomers.

The conclusions as to the presence of different aggregates in Hp, DMHp and PS solutions made on the basis of spectroscopic characteristics in aqueous and ethanol solutions are confirmed by the analysis of detergents' influence on the spectral features of porphyrin aqueous solutions. As is seen in Fig. 4.6 B, in DMHp ethanol solution and in the buffer in the presence of detergent, monomers prevail. The larger half-band width of the Soret band of Hp spectra indicates the presence of the linear type of covalently-linked aggregates (Fig.4.7 b). In the case of PS the considerably large half-band width and the shoulder at about 365 nm are probably caused by the presence of intramolecular aggregates (Fig.4.7 c,d).

Few stage aggregation process is observed in aqueous solutions of hematoporphyrin diacetate (Hp-Diac) at different concentrations (Kapociute et al., 1989). The whole concentration scale can be divided into three ranges: 1. above 2×10^{-6} M; 2. from 2×10^{-6} to 2×10^{-8} M; 3. below 2×10^{-8} M. The following three stage deaggregation process based on the results of spectroscopic measurements was suggested. At high concentration Hp-Diac is extremely aggregated and has an absorption maximum at about 370 nm. Small aggregates (oligomers) may form more highly aggregated species – conglomerates. The conglomerates must be relatively stable as dilution from 10^{-4} M to ca. 4×10^{-5} M does not cause significant changes in the spectral characteristics. In the first deaggregation stage, which takes place in the first aggregation range, these huge aggregates dissociate into smaller ones (dimers and trimers). This process is characterized by the strong decrease of absorption at 370 nm. In the end of this stage most of the molecules are in the form of small aggregates, though a small amount of monomers are also present. The second stage is characterized by the dissociation of small aggregates into monomers. During this process the absorption maximum shifts to the red, and finally

a maximum at 395 nm appears. In the end of this stage only a small fraction of molecules form small aggregates. In the third deaggregation stage nearly all dimers (and trimers) dissociate into monomers (Kapociute et al., 1989).

Solution pH value also effects the aggregation degree of Hp-Diac (Kapociute et al., 1991). Porphyrin aggregation is greatly effected by extremes of solvent pH (pH<6 and pH>8). From a biological point of view, the influence of extreme solution pH on the aggregation of photosensitizer is of minor importance. However, investigations at pH values close to physiological condition may be useful for the better understanding of porphyrin retention and accumulation in tumours. The pH range 6-7 is of special significance since many tumours have been reported to have pH values in this vicinity (Wike–Hooley et al.,1984).

The efficiency of photosensitized tumour therapy is believed to be related to the aggregated species of the sensitizer. The high degree of aggregation observed at low concentrations of Hp-Diac for pH values characteristic of tumours may be due the interaction between neutral Hp-Diac species and monocationic ones (Kapociute et al., 1991). The different ionic species found at low tumour pH may play an important role in both the selective biodistribution and photosensitizing ability of porphyrin type photosensitizers.

4.2. Time-resolved spectroscopy of first generation photosensitizers

Picosecond absorption spectroscopy seems to be an efficient technique to investigate the relaxation pathways of individual components under excitation of a complex mixture of differently aggregated species. Porphyrins are photolabile under the irradiation by visible light. In the time resolved experiments, pH 6 of the aqueous solution has been chosen, because hematoporphyrins at this pH value has better photostability in comparison with the neutral one (Rotomskis et al., 1993).

The ΔA kinetic measurements presented in Fig.4.11 (ΔA kinetics of Hp in ethanol solution) correspond to the process of excitation energy relaxation from the S_1 state of Hp in ethanol solution. The estimation shows that ΔA relaxes monoexponentially with the time constant $\tau = 15-17$ ns, approximately equal to the life-time of the emission of monomeric Hp. Monoexponential character of the decay and $\Delta A(t)$ independence on the excitation intensity within an experimental error agree with generally accepted assumption that Hp in ethanol solution is monomeric.

The ΔA of HpD in ethanol solution relaxes biexponentially with the time constants $\tau_1 = 10 - 17$ and $\tau_2 = 2 - 4$ ns (Fig.4.12. ΔA kinetics of HpD in ethanol solution). Ethanol solutions of HpD contain covalently linked oligomers. Therefore it was supposed that τ_2 reflects the excitation energy relaxation in covalently linked linear oligomers, while τ_1 was attributed to the excitation energy relaxation from S_1 of HpD monomeric molecules (Rotomskis et al., 1993).

The different time dependence of ΔA has been detected in aqueous solutions of Hp and HpD. In aqueous solutions porphyrins have strong tendency to form equilibrium aggregates. The accurate detection of ΔA spectrum in aqueous solutions is complicated due to the very low ΔA values.

The HpD ΔA kinetics in aqueous solution at a fixed wavelength depends on concentration and is of complex shape, hence several transient species contribute to ΔA (Fig.4.13. ΔA kinetics of HpD in aqueous solution, pH 5.8. $C_{\text{HpD}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 532$ nm; $\lambda_{\text{pr}} = 630$ nm). The fitting by three exponents gives time constants of $\tau_3 = 20 - 70$ ps (the shortest component), $\tau_2 = 100 - 200$ ps (short component) and $\tau_1 = 1.5 - 4$ ns (long component) (fitting was made in assumption that the long tail of kinetics is attributed to the monomeric component of Hp with the life-time 15 ns).

The main difference between ethanol and aqueous solutions is the presence of equilibrium aggregates of porphyrins in the aqueous solution. In conclusion, ΔA relaxation of Hp in ethanol solutions is mainly exponential and reflects long fluorescence decay time of Hp monomers. The time constant $\tau_1 = 1.5 - 4$ ns reflects the excitation relaxation in covalently linked linear dimers or oligomers of HpD and time constant $\tau_2 = 100 - 200$ ps is excitation life-time in "sandwich"-type equilibrium aggregates of Hp and HpD (Rotomskis et al., 1993).

4.3. Second generation photosensitizers

Most clinical experience in PTT comes from using the porphyrin variants – hematoporphyrin derivative and dihematoporphyrin ethers and esters, which commercial preparation is known as Photofrin[®]. However, Photofrin[®] remains a complex mixture with inherent variability, and it has the further limitation of weak light absorption at wavelengths above 600 nm. Tissue transmittance of light at this wavelength is minimal, thus limiting the treatment to tumours at a depth of 5 mm or less. In addition, Photofrin has the side effect of causing prolonged cutaneous photosensitivity and patient must

therefore avoid bright sunlight. These properties led to the search for new and improved compounds.

Unlike Photofrin[®], all newly proposed PTT photosensitizers are characterized by a high degree of chemical purity and a high molar extinction coefficient at the absorption maximum in the red spectral region, which is larger by one or two orders of magnitude than that typical of Photofrin[®] at 630 nm.

Modification of the chemical structure of porphyrins and their analogs (chlorins, phthalocyanines, naphthalocyanines, porphycenes) at different loci and with various levels of complexity, including the size of the macrocycle and the extension of the aromatic electron cloud, the coordination of metal ions with the four central nitrogen atoms, and the nature of the peripheral substituents and/or axial ligands allows a remarkable flexibility in the design of the photosensitizer with different levels of hydro-/lipophilicity, tendency to undergo aggregation, subtissular and subcellular distribution, spectroscopic and photophysical properties (Jori and Reddi, 1991). Thus, the insertion of two polar substituents on two adjacent rings of the macrocycle and the consequent presence of a hydrophobic matrix on the opposite side of the molecule (two unsubstituted rings) makes the photosensitizer an amphiphilic species; in this way, the porphyrin achieves a sufficient water-solubility, to allow its systemic injection *in vivo*, while it retains a high tendency to cross the lipid barrier of the cytoplasmic membrane of tumour cells and localize at endocellular sites (Jori, 1996).

The reduction of one or both of cross-conjugated double bonds of porphyrin molecules gives chlorins and bacteriochlorins. The reduction maintains aromaticity but the change in symmetry results in bathochromic shift of Q bands increase of extinction coefficients (Fig. 4.15. Structures and absorption spectra of porphyrin, chlorin and bacteriochlorin).

Of particular importance is the presence of ions which can coordinate one or two axial ligands that are perpendicular to the ring plane. These ligands can decrease the tendency of a photosensitizer to undergo aggregation as a result of steric hindrance.

The nature of the substituents which are present in the 1-8 peripheral positions of porphyrins can affect the relative intensities of the Q bands. In particular, the intensity of the band above 600 nm, which is most interesting from the point of view of PTT, undergoes a modest increase in the presence of electron donors. The polarity and bulkiness of the substituents can affect both the tendency of photosensitizers to aggregate

and their water/lipo-solubility. In general, the hydrophilicity of macrocyclic compounds can be increased by addition of sulfonated, hydroxyl and alkoxy functional groups.

Detailed investigation of the relationship between the chemical structure and the tumour localizing activity of photosensitizers showed that optimal tumour-localizing properties is imparted to be porphyrin-type macrocycle by the presence of two substituents in adjacent rings, yielding an amphiphilic molecule which retains a hydrophobic matrix to facilitate the interaction with cells (Jori, 1992). Chemically pure unsubstituted compounds can be injected *in vivo* by incorporating the photosensitizer into suitable carriers, such as liposomes, oil emulsions or cyclodextrin inclusion complexes (Garbo and Morgan, 1988).

Spectroscopic properties. The large extinction coefficients in the red spectral range, which are typical of most second generation photosensitizers allow to use for the injection of significantly lower doses of sensitizers.

We have investigated spectral properties of second generation photosensitizers chlorin e_6 (Cle₆) and aluminium phthalocyanine tetrasulphonate (AlPcS₄) (Rotomskis et al., 1995 b). Spectral characteristics, presented in the table 4.9, show that Cle₆ and AlPcS₄ have redshifted and more intensive Q bands in comparison with HpD.

HpD has the lowest value of extinction coefficient (ϵ) therefore the highest doses (5–30 mg/kg) of this photosensitizer are needed for PTT. The extinction coefficient of AlPcS₄ is large and this allows receiving the same efficacy of PTT with the injection of significantly lower doses (about 1 mg/kg).

Excited state properties. Photosensitized effects can occur by two competing mechanisms. In type I processes an electron or hydrogen transfer reaction between the triplet photosensitizer and a substrate molecule takes place, whereas in type II processes ground state oxygen is promoted to the highly reactive singlet state via energy transfer from the triplet photosensitizer. In order to design an effective photosensitizer and to evaluate its efficiency in PTT, it is necessary to assess the influence of the molecular structure and environmental factors (e.g. medium, pH) on the physico-chemical properties of the triplet state, including the life-time and quantum yield of its photogeneration, which determine the reactivity of triplet photosensitizer, the redox potential and the energy level which determines the efficiency of ¹O₂ formation (Jori and Reddi, 1991).

The quantum yields for triplet state and ¹O₂ generation by some of potential second generation photosensitizers are presented in table 4.10 (Jori, 1992). The presence

of axial ligands to the centrally coordinated metal ion is often advantageous, since it generates some degree of steric hindrance to intermolecular aggregation without hopefully impairing the photophysical properties of photosensitizer. Insertion of Zn(II) or Si(IV) ions, both of which have coordination number six, guarantees a satisfactory yield of $^1\text{O}_2$ generation. However, the photosensitizing activity of photosensitizer is quenched by the presence of Cu(II) ions. This is true of all transition metal ions with a *d*-electron configuration which have unpaired electrons (Gouterman, 1978).

The nature of axial ligands can also be used to modulate the degree of hydrophilicity or lipophilicity of the photosensitizer, and hence to control its biodistribution between the various compartments of cells and tissues.

Meso-tetraphenylporphines (Fig. 4.16) are widely used as photosensitizers. In *in vivo* biological assay, 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) porphine was found to be 25-30 times as potent as HpD (Berenbaum et al., 1986).

The major problem with these sensitizers is low solubility. Introduction of sulfonato- groups increases solubility and meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine (TPPS₄) is well water-soluble compound.

It is known from experimental investigations that medium in cancerous tissues is often more acid than in normal tissues. A hydrophilic molecule with negatively charged substitutes, TPPS₄ accumulates in cells being mainly localized in lysosomes (Berg et al., 1990) where medium is also acid. An electronic interaction between the phenyl substitutes and a tetrapyrrolic ring of TPPS₄ could enable the formation of stable dicationic species of TPPS₄ (TPPS₄H₂²⁺) (Fig.4.17. Dicationic form of TPPS₄ (TPPS₄H₂²⁺)) at the values of pH, which are similar to those characteristic for the lysosomes. Spectral properties of this dicationic species could be rather different in comparison with those of a TPPS₄ form existing in neutral medium. Spectroscopic studies on the spectral properties of TPPS₄ depending on the acidity of aqueous medium were performed (Bagdonas and Rotomskis, 1998). The results revealed that in acid aqueous solutions under pH values close to those detected in lysosomes of living cells the dominant TPPS₄ form is a dication TPPS₄H₂²⁺, which has a higher extinction coefficient in the red spectral region at around 650 nm, where biological tissues are relatively more transparent. Therefore, it may be an important agent influencing the photosensitizing efficiency of TPPS₄ during PTT.

Chlorins. Reduction of one or both of cross-conjugated double bonds of porphyrins gives chlorins and bacteriochlorins (Fig.4.15. Structures of the porphyrin, chlorin and bacteriochlorin. Increasing reductions result in an increasing bathochromic shift of the last absorption band). The long-wavelength absorptions of these pigments naturally led to explorations of their use as photosensitizers in PTT. One of them is Chorin e₆ and monoaspartylchlorin e₆ (Fig.4.21) are most widely investigated chlorins for use in PTT (Kostenich et al., 1994; Spikes and Bommer, 1993).

meta-Tetrahydroxyphenyl chlorin (m-THPC) (Fig. 4.22), under tradename FoscanTM, is being marketed by Scotia Pharmaceuticals as a photosensitizer for PTT. The *in vivo* phototoxicity of m-THPC is believed to proceed by the type II mechanism and is superior to hematoporphyrin derivatives in many respects: it is a single component of high purity, has good absorption in the red spectral region (absorption coefficient in the red at 652 nm is one order of magnitude larger than that of HpD), has a high phototoxicity and a large fluorescence quantum yield and induces a somewhat shorter cutaneous photosensitivity (Wagnieres et al., 1998).

Foscan could be one of the most phototoxic of all second-generation photosensitizers currently being investigated. It requires very low doses (as little as 0.1 mg/kg) as well as an unusually low light doses (as low as 10 J/cm²), making it about 100-fold more active than Photofrin (Sharman et al., 1999).

Benzoporphyrin derivative (Verteporfin, QLT Phototherapeutics Inc.) (Fig.4.23) is an example of the class of sensitizers which show poor water solubility, but can be formulated successfully, either in liposomes or emulsions. Verteporfin is in Phase III clinical trials for cutaneous non-melanoma skin cancer and Phase I/II trials against other non-melanoma skin cancers ((Sharman et al., 1999).

Texaphyrins. The main advantage of using texaphyrins as PTT agents is their strong absorbance at a much longer wavelength (732 nm) so that treatment can be carried out effectively on a larger tumour or at a greater depth. The lutetium texaphyrin (Fig.4.25), the trade name LutrinTM, is undergoing Phase II clinical trials as possible photosensitizer for breast cancer PTT.

Phthalocyanines. Phthalocyanines are tetrapyrrolic macrocycles that, unlike the porphyrins, have nitrogen atoms linking the individual pyrrole units instead of methene bridges (Fig.4.14). The periphery of the macrocycle is extended by benzene rings, which strengthens the absorption at longer wavelengths compared to porphyrins. Phthalocyanines commonly incorporate a diamagnetic metal ion, usually zinc or

aluminium, to enhance triplet photosensitizer yields and lifetimes in order to increase photodynamic activity (van Lier and Spikes, 1989). The addition of the sulphonate groups to the periphery of the phthalocyanine greatly increases the solubility of these compounds.

Naphthalocyanines (Fig.4.14) have red shifted absorption spectra compared with phthalocyanines. Addition of a second benzene ring to the periphery of phthalocyanine produces compounds that absorb at a higher wavelength (770 nm versus 680 nm), thus increasing the therapeutic depth that can be achieved and rendering the potential photosensitizers for highly pigmented tumours such as melanomas.

Another very interesting potential photosensitizer for PTT is silicon naphthalocyanine (Fig.4.30). The compound has a very strong Q band at 776 nm. In benzene the extinction coefficient equals 650,000) (Kreimer–Birnbaum, 1989) giving this type of molecule a great potential for excitation with light in the therapeutic region. Because the absorption of light by Si naphthalocyanine is largely confined to the far end of the visible range, solar photosensitivity should be less than that observed with other photosensitizers.

References

- Bagdonas S, R. Rotomskis (1998) *Lith.J.Phys.*, 38, 75–78.
- Berenbaum M.C., S.L. Akande, R. Bonnett et al (1986) *Br.J.Cancer*, 54, 717–25.
- Berg K., J.C. Western, J.C. Bommer, J.Moan (1990) *Photochem.Photobiol.*, 52, 481–487.
- Bonett R. (1995) *Chem.Soc.Rev.*, 24, 19-33.
- Boyle R.W., W.F.Keir, A.H.Maclennan, G.Maguire, T.G.Truscott (1987) *Cancer Lett.*, 38, 9–14.
- Brown S.B., M.Shillcock, P.Jones (1976) *Biochem.J.*, 153, 279–285.
- Garbo G.M., A.R. Morgan (1988) *J.Photochem.Photobiol. B: Biol.*, 1, 494-495.
- Goutherman M. (1978) in D.Dolphin (ed.) *The Porphyrins*, Vol.III, Academic Press, New-York.
- Jori G.(1992) *J.Photochem.Photobiol. A: Chem.*, 62, 371–378.
- Jori G. (1996) *J.Photochem.Photobiol. B: Biol.*, 36, 87–93.
- Jori G., E.Reddi (1991) In: Douglas R.H., J.Moan, G.Ronto (eds.) *Light in biology and medicine*, Plenum Press, New York and London, 2, 253–266.
- Kapociute R., R.Rotomskis, J.Rotomskiene, K.Toth, R.Gadonas, G.Ronto (1989)

In: Lasers and ultrafast processes, Vilnius University Press, 2, 115–130.

Kapociute R., T.Szito, R.Rotomskis, J.Rotomskiene (1991) In: Douglas R.H., J.Moan, G.Ronto (eds.) Light in biology and medicine, Plenum Press, New York and London, 2, 277–282.

Karns G.A., W.A.Gallagher, W.B.Elliott (1979) Bioorg.Chem., 8, 69–81.

Kessel D., C.K.Chang, B.Musselman (1985) In: Methods in porphyrin photosensitization, D.Kessel (ed.). Plenum Press: New York, 213–227.

Kostenich G.A., I.N. Zhuravkin, E.A. Zhavrid (1994) J.Photochem.Photobiol., B:Biol., 22, 211–217.

Kreimer–Birnbaum M. (1989) Seminars in Hematology, 26, 157–173.

van Lier J.E., J.D. Spikes (1989) In: G.Bock, S.Harnett (eds.) Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, John Wiley and Sons, Chichester, 17–32.

Rotomskis R., A.Baltuska, A.Pugzlys, V.Vaicaitis, R.Gadonas, A.Piskarskas (1993) Biomedical Spectroscopy III, L.A.Nafie, H.H.Mantsch (eds.), Proc.SPIE, 1890, 24–29.

Rotomskis R., G. Streckytė, J. Didžiapetrienė, L. Gričiūtė, A. Ibelhauptaitė (1995) Medicina, 31, 666–676.

Sharman W.M., C.M. Allen, J.E.van Lier (1999) DDT, 4, 507–517.

Smith K.M. (1975) In: Porphyrins and metalloporphyrins, K.M.Smith (ed.), Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York, 3–28.

Spikes J.D., Bommer J.C.(1993) J.Photochem.Photobiol., B:Biol., 17, 135–143.

Streckyte G., R.Rotomskis (1993a) J.Photochem.Photobiol.B.: Biol., 18, 259–263.

Streckyte G., R.Rotomskis (1993b) Biologija, Nr.3, 26–31.

Wike–Hooley J.L., J.Haveman, H.S.Reinhold (1984) Radiother.Oncol., 2, 343–366.

Wagnieres G., C. Hadjur, P. Grosjean et al. (1998) Photochem.Photobiol., 68, 382–387.