

7. ENDOGENINIAI SENSIBILIZATORIAI FOTOSENSIBILIZUOTOJE NAVIKŲ TERAPIJOJE

FNT naudojami fotosensibilizatoriai tamsoje yra nekenksmingi, tačiau dėl nepakankamai selektyvios lokalizacijos navikiniuose audiniuose ir gana lėto pašalinimo iš organizmo neišvengiama pašalinio jų poveikio – padidėjusio jautrumo šviesai. Po FNT pacientai keletą savaičių turi vengti tiesioginių saulės spindulių. Dar 1912 metais F. Mejer-Betso atliktas eksperimentas parodė, kokie žalingi ir nemalonūs yra pašaliniai FNT reiškiniai (žr.3 sk ir 3.1 pav.). Todėl, tobulindami FNT metodą ir ieškodami veiksmingesnių ir mažesnius pašalinius reiškinius sukeliančių fotosensibilizatorių, mokslininkai susidomėjo vidiniais žmogaus organizmo ištekliais. Organizme yra endogeninių molekulių, galinčių atlikti fotosensibilizatoriaus vaidmenį. Buvo pastebėta, kad navikiniai audiniai pasižymi didesne fluorescencija raudonoje spektro srityje, o juos apšvitinus raudona šviesa, nors ir nesant egzogeninio sensibilizatoriaus, lėtėja navikinio darinio augimas ir pailgėja eksperimentinių gyvūnų gyvenimo trukmė.

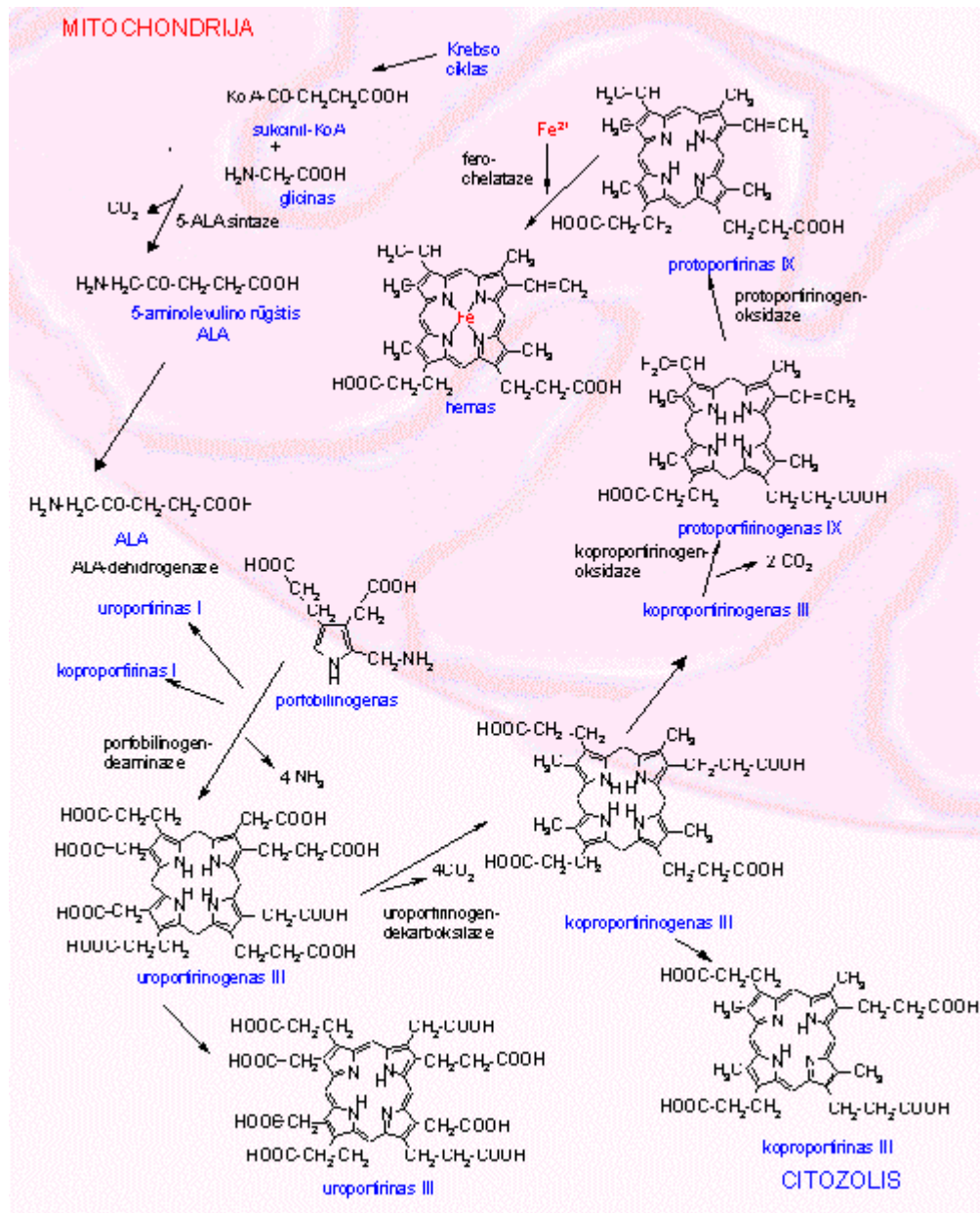
Žmogaus organizme sintetintos porfirinės prigimties molekulės. Įvedus į organizmą aminolevulino rūgštis (ALA) – hemo sintezės pirmtako – ląstelėse ir audiniuose pradeda kauptis daugiau endogeninių porfirinų, kuriuos apšvitinus galima inicijuoti fotosensibilizacinį efektą, sukelti ląstelių žūtį. Paaiškėjo, kad, esant organizme ALA pertekliui, navikiniuose audiniuose susikaupia daugiau endogeninių porfirinų nei sveikuose. Taigi panaudojant tik endogeninį sensibilizatorių galima atlikti FNT.

Porfirinų sintezė ir jų metabolizmas gyvoje ląstelėje yra būtini pačių ląstelių, taigi ir organizmų gyvybinei veiklai palaikyti. Protoporfirino IX (PpIX) ir geležies (II) kompleksas (hemas), susijungęs su įvairiais baltymais, sudaro tokias svarbias medžiagas apykaitoje dalyvaujančias makromolekules kaip hemoglobinas, mioglobinas, citochromai, katalazė, peroksidazė ir triptofano pirolazė. Beveik visos žmogaus ląstelės geba sintetinti hemą, tačiau sparčiausiai biosintezė vyksta kaulų čiulpų ląstelėse (jose sintetinama apie 85% hemo) ir kepenų ląstelėse (Voet ir Voet, 1995).

Pirmajame hemo biosintezės etape iš glicino ir sukcinilo kofermento A susidaro 5-aminolevulino rūgštis (ALA). Paskutiniame etape fermentas ferrochelatazė PpIX molekulę paverčia hemo molekule, į porfirino žiedą įterpdamas geležies atomą (7.1 pav.). Šis ciklas audiniuose yra sureguliuotas taip, kad sveikame organizme PpIX perteklius nesusikaupia, tačiau ciklą galima sutrikdyti paveikus papildomu ALA kiekiu. Fermentai nespėja

paversti viso besigaminančio PpIX hemu ir ląstelėse kaupiasi PpIX perteklius. Navikinėse ląstelėse dėl sumažėjusio fermento ferochelatazės (FeC) aktyvumo (El-Sharabasy ir kt., 1992) arba padidėjusio fermento porfobilinogeno deaminazės (PBGD) aktyvumo (Smith, 1987) pastebimas didesnis ALA-indukuotų porfirinų kaupimasis. Kadangi PpIX yra efektyvus sensibilizatorius, pritaikius navikų gydymui natūralius hemo biosintezės metu ląstelėse vykstančius procesus, susidarė nauja FNT pakraipa – ALA-FNT (Kennedy ir kt., 1990; Kenedy ir Pottier, 1992). Klinikoje ALA-FNT pirmą kartą taikyta 1990 metais (Kennedy ir kt., 1990) ir šiuo metu yra sparčiai besiplėtojantis perspektyvus tiek navikinių, tiek ir nenavikinių (tarp jų ir ikinavikinių) darinių gydymo metodas. ALA-indukuoto PpIX fluorescencija panaudojama odos, šlapimo pūslės, virškinimo trakto ir plaučių navikams diagnozuoti (Konig ir kt., 1993a; Kriegmair ir kt., 1996).

Ypač plačiai ALA-FNT taikoma odos navikams gydyti, ant gydomos vietos užtepus tepalo, kurio sudėtyje yra ALA. ALA yra hidrofilinė medžiaga, tad sunkiai skverbiasi per odą (Goff ir kt., 1992) ir ląstelių membranas, todėl reikia gana didelių ALA koncentracijų, kad navike susikaupytų gydymui reikalinga PpIX koncentracija. Dabar vyksta intensyvūs lipofilinių ALA darinių (metil-, etil-, propil-, heksil-, heptil- ir oktil-esterių) tyrimai, nes jie kur kas geriau negu ALA skverbiasi į ląsteles ir pasiekia gilesnius navikų sluoksnius (Peng ir kt., 1996). Ląstelėse fermentas esterazė katalizuoja esterių hidrolizę į ALA.



7.1 pav. Kraujo hemo biosintezės ciklas

Svarbiausias šio metodo privalumas yra tai, kad ALA yra endogeninė medžiaga, todėl neturi šalutinio neigiamo poveikio. Kadangi ALA-indukuotas endogeninis PpIX sintetinamas ląstelės gyvybiškai svarbioje organelėje – mitochondrijoje, net ir nedidelis šio sensibilizatoriaus perteklius joje švitinimo metu gali sukelti dideles ląstelės pažaidas.

Šiame skyriuje bus trumpai aptarta endogeninių sensibilizatorių biosintezė, apžvelgti ALA-indukuoto PpIX fototransformacijų ląstelėse tyrimo rezultatai, endogeninio PpIX spektroskopinės savybės *in vivo* ir literatūroje paskelbti ALA-FNT klinikinių tyrimų duomenys.

7.1. Endogeninių porfirinų biosintezė

Hemo biosintezė. Fiziologinėmis sąlygomis hemas naudojamas įvairių hema turinčių baltymų biosintezei ir biologiškai naudingos cheminės energijos formoms ląstelėje gauti (Dietel ir kt., 1996). Pradiniame hemo biosintezės ciklo etape iš glicino ir sukcinil-kofermento-A katalizuojant ALA-sintaze (ALAS) sintetinama 5-aminolevulino rūgštis (7.1 pav.) (Voet ir Voet, 1995). Kitoje fazėje iš dviejų ALA molekulių susidaro porfobilinogenas (PBG) ir išsiskiria dvi vandens molekulės. Veikiant porfobilinogeno deaminazei (PBGD) ir uroporfirinogeno sintazei keturios PBG molekulės kondensuojamos į uroporfirinogeną III. Toliau vyksta dekarboksilinimo ir oksidavimo reakcijų seka, kol geležies atomas įterpiamas į tetrapirolo žiedą.

Dalis hemo biosintezės vyksta mitochondrijose, dalis – citozolyje (7.1 pav.). Mitochondrijoje susintetinta ALA pernešama į citozolį, ten susidaro PBG, o iš jo – uroporfirinogenas III. Citozolyje uroporfirinogeno dekarboksilazė atima iš uroporfirinogeno III keturias karboksilo grupes ir taip susidaro koproporfirinogenas III, kurio šoninės propiono rūgšties liekanos, veikiamos koproporfirinogeno oksidazės, yra dekarboksilinamos ir oksiduojamos į vinilo grupes. Šios reakcijos vėl vyksta mitochondrijoje. Katalizuojant protoporfirinogeno oksidazei tetrapirolo žiedo metileno grupės oksiduojamos į metino grupes – susidaro protoporfirinas IX (PpIX). Katalizuojant ferochelatazei Fe(II) įterpiama į tetrapirolo struktūros centrą – susidaro hemo molekulė.

Kaip reguliuojama hemo biosintezė? Hemo sintezės ciklo greitis sureguliuotas taip, kad atitinka hemo pašalinimo iš sistemos greitį. Hemo sintezę kontroliuoja grįžtamosios reguliacijos mechanizmas, kuris veikia taip, kad susidaręs laisvo hemo perteklius stabdo ALA sintezę (Sinclair ir Granick, 1975). Taigi jei hemas suvartojamas tokiu pat greičiu kaip ir sintetinamas, laisvo hemo bus nedaug ir ALA sintezė nebus stabdoma. Kai ALA koncentracija didės, atitinkamai suintensyvės hemo sintezė. Jei hemas sintetinamas greičiau negu pašalinama, susikaupęs jo perteklius stabdys ALA sintezę, o tai savo ruožtu silpnins tolesnę hemo sintezę. Taigi esant normalioms sąlygoms hemo poreikis kontroliuoja hemo sintezės greitį, o kartu ir PpIX sintezės greitį.

Kaip egzogeninė ALA skatina endogeninių porfirinų kaupimąsi? Didžiausias ALA sintezės greitis visada yra mažesnis už didžiausią kiekvienos kitos ciklo pakopos greitį ir tarpiniai produktai nesikaupia. Tačiau ciklą galima sutrikdyti ALA pertekliumi. Terapijai, diagnostikai ar moksliniams tyrimams endogeninių porfirinų biosintezė stimuliuojama egzogeniniais pirmtakais – ALA ar ALA-esteriais (Peng ir kt., 1997a). Jų

dėka apeinama griežtai reguliuojama, viso sintezės kelio greitį lemianti ALAS katalizuojama reakcija ir aktyvinama PBGD (antroji greitį limituojanti stadija) (Gibson ir kt., 1999), todėl ląstelėse vyksta intensyvesnė endogeninių porfirinų sintezė.

Kai ALA koncentracija nėra ribojantis faktorius, pirmojo tarpinio produkto – porfobilinogeno sintezės greitis priklausys nuo fermentų, katalizuojančių šią reakciją, pajėgumo. Jei porfobilinogeno sintezės greitis viršija kitos ciklo pakopos pajėgumą (uroporfirinogeno sintezę), susikaupia didesnis porfobilinogeno kiekis (Healey ir kt., 1981). Kita vertus, kai uroporfirinogeno sintezės mechanizmas dar turi rezervų, o porfobilinogenas sintetinamas maksimaliu greičiu, uroporfirinogeno sintezės greitį riboja porfobilinogeno sintezės greitis. Tas pat galioja ir kiekvienai sekančiai ciklo pakopai. Jei PpIX virtimas hemu vyksta lėčiau negu PpIX sintezė, susikaups didesnis PpIX kiekis (Bonkovsky ir kt., 1985). Uroporfirinai ir koproporfirinai irgi yra potencialūs sensibilizatoriai (Menon ir kt., 1990). Kadangi uroporfirinai susidaro iš uroporfirinogeno, o koproporfirinai iš koproporfirinogeno, ALA pertekliui sutrikdžius hemo biosintezės ciklą, gali susikaupti ir šių porfirinų perteklius (El-Far, 1990).

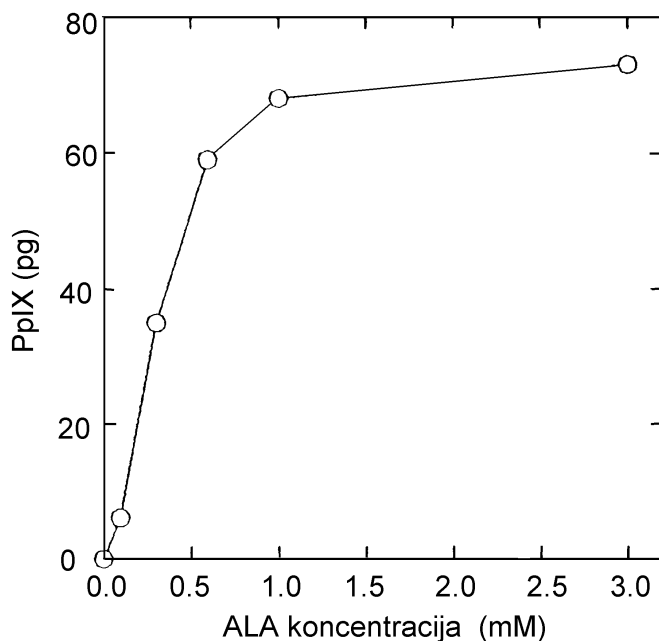
7.2. Endogeninio PpIX fototransformacijos ląstelių suspensijoje

Į ląstelę ALA ir jos dariniai patenka aktyvios pernašos dėka. Eukariotinėse ląstelėse ALA perneša β -amino rūgščių ir γ -aminobutirinės rūgšties transporteriai. ALA lipofiliniai dariniai – ALA esteriai – lengviau patenka į ląstelę (Peng ir kt., 1997). Kad būtų susintetintas toks pat PpIX kiekis, ALA esterių su ilgesnėmis liekanomis ($C_6 - C_8$) reikia 30 – 150 kartų mažiau negu grynos ALA (Gaullier ir kt., 1997). Porfirinų sintezė iš ALA navikinėse ląstelėse vyksta greičiau negu normaliose (Walters ir kt., 1963). ALAS ir ferochelatazės aktyvumas navikinėse ląstelėse yra mažesnis, o PBGD – didesnis negu nepažeistose ląstelėse (Kondo ir kt., 1993). Ferochelatazė fotosensibilizatorių PpIX paverčia į šviesai nejautrą hemą, tad sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas navikinėse ląstelėse yra palankus ALA-FNT, nes padeda geriau kauptis PpIX.

Sensibilizatorių fototransformacijų tyrimai yra būtini ieškant optimalių FNT švitinimo dozės įvertinimo parametru (6 skyrius). Šių tyrimų metu gauti rezultatai yra svarbus veiksnys tinkamai apskaičiuoti kliniškes FNT dozes. PpIX yra fotolabilus sensibilizatorius (Gudgin Dickson ir Pottier, 1995), švitinamas tiek tirpaluose, tiek ląstelių kultūrose ar *in vivo* yra ir sudaro raudonos spektro srities šviesą sugeriančius

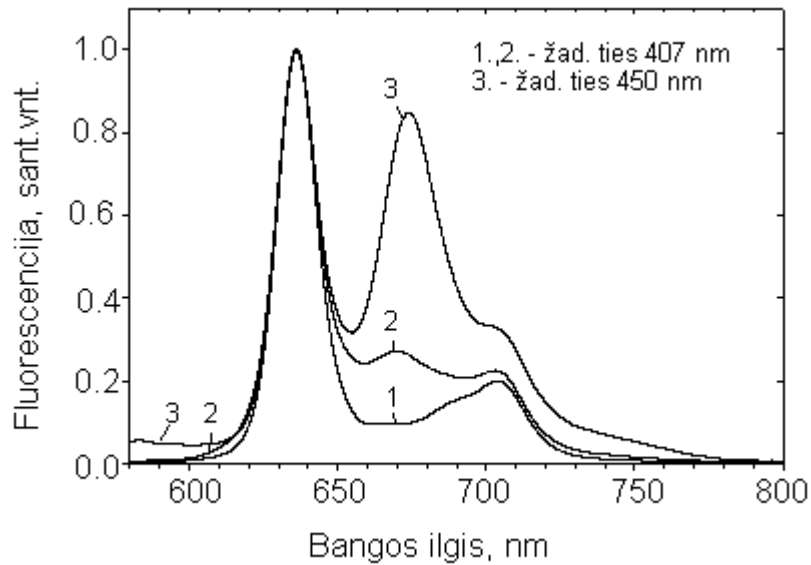
fotoproduktus (Konig ir kt., 1993b; Wessels ir kt., 1993; Robinson ir kt., 1998).

PpIX fototransformacijos buvo tirtos iš žmogaus žarnyno adenokarcinomos išskirtose ląstelėse WiDr. Inkubavus šias ląsteles skirtingų koncentracijų ALA tirpalais, susidarančio PpIX kiekis didėja didėjant ALA koncentracijai iki 1mM (7.2 pav.) (Streckytė ir kt., 1994).



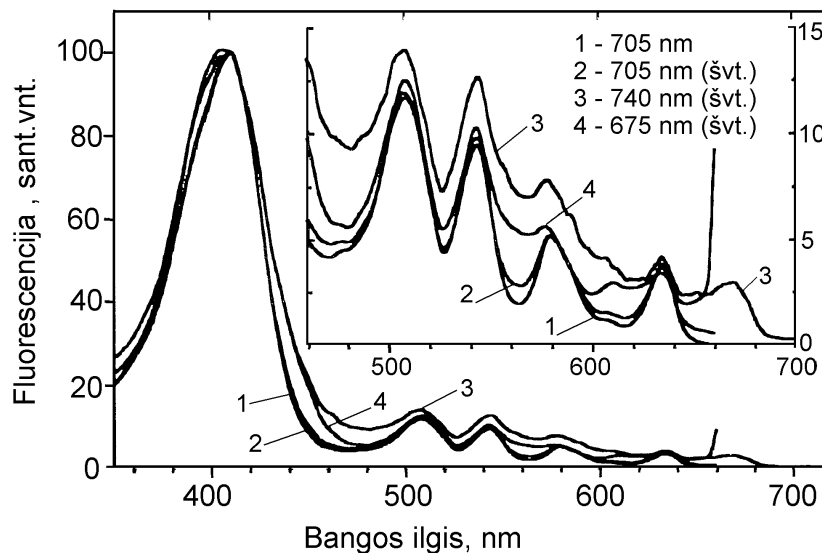
7.2 pav. ALA-indukuoto PpIX susidarymas ląstelėse

Švitinant ląstelėse susidariusį PpIX raudona šviesa ir registruojant švitinimo metu vykstančius PpIX fluorescencijos spektrų pokyčius, matyti, kad švitinimo metu silpnėja PpIX fluorescencija ir ties 675 nm formuojasi fotoprodukto juosta, kurios santykinis intensyvumas priklauso nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio (7.3 pav.).



7.3 pav. PpIX ląstelių suspensijoje fluorescencijos spektrai prieš (1) ir po (2 ir 3) švitinimo raudona šviesa ($\lambda=635$ nm, dozė 43 J/cm²)

Fluorescencijos žadinimo spektre taip pat užregistruota ties 670 nm susiformavusi nauja juosta (7.4 pav.) (Bagdonas ir kt., 2000).

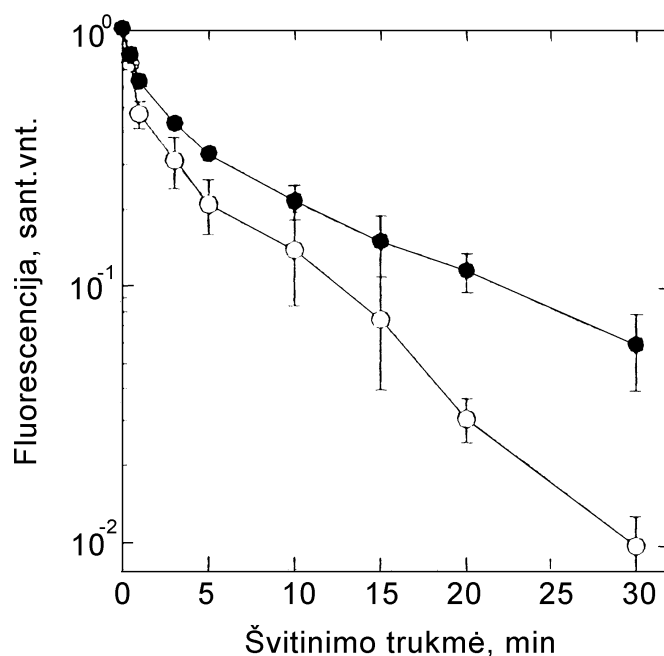


7.4 pav. PpIX ląstelių suspensijoje fluorescencijos žadinimo spektrai prieš (1) ir po (2 – 4) švitinimo raudona šviesa ($\lambda=635$ nm, dozė 39 J/cm²)

Šie spektriniai pokyčiai būdingi fotooksidacijos reakcijoms, kurių metu dalyvaujant singuletiniam deguoniui (Aveline ir kt., 1988) susidaro izomerinių hidroksialdehidų mišinys, pavadintas fotoprotoporfirinu (Inhoffen ir kt., 1969). Hidroksialdehidų izomerai

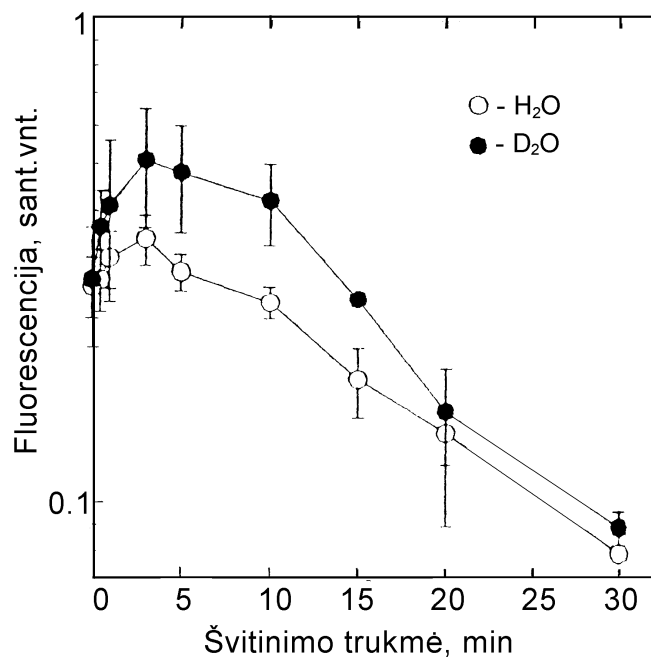
susiformuoja ciklinio jungimosi reakcijos metu singuletiniam deguoniui jungiantis prie vienos iš protoporfirino vinilo grupių ir redukuojantis gretimai dvigubai jungčiai (Cox ir Whitten, 1982).

Švitinimo metu mažėjantis PpIX fluorescencijos intensyvumas (7.5 pav.) rodo, kad protoporfirino makrociklas yra. Manoma, kad protoporfirinas efektyviai generuoja singuletinį deguonį, šis aktyviai reaguoja su amino rūgštimis ir baltymais, o šių oksidacijos reakcijų produktai veikia porfiriną ir ardo jo makrociklą (Krieg ir Whitten, 1984 a). Singuletinis deguonis dalyvauja ir susidarant fotoproduktui. Buvo tirtas fotoprodukto susidarymo efektyvumas ląstelėse suspenduotose H₂O ir D₂O terpėse. Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė D₂O yra maždaug 13 kartų ilgesnė negu H₂O (Gorman ir Rodgers, 1989).



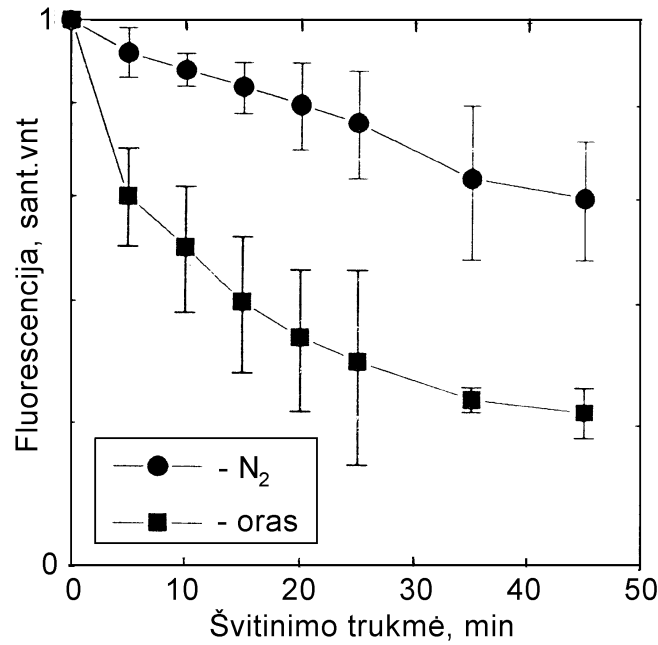
7.5 pav. ALA-indukuoto PpIX ląstelių suspensijoje fluorescencijos intensyvumo silpnėjimas švitinant mėlyna šviesa (λ 340-420 nm, intensyvumas 13 W/cm²). Fluorescencija registruota ties 635 nm žadinant ties 413 nm. ALA koncentracija 0,2 mM (tušti rutuliukai) ir 1 mM (užtušuoti rutuliukai)

Kaip matyti 7.6 paveiksle, D₂O terpėje fotoproduktas formuojasi efektyviau (Strečkytė ir kt., 1994). Taigi galima daryti išvadą, kad singuletinis deguonis tikrai dalyvauja švitinimo metu iš PpIX susidarant fotoproduktui.



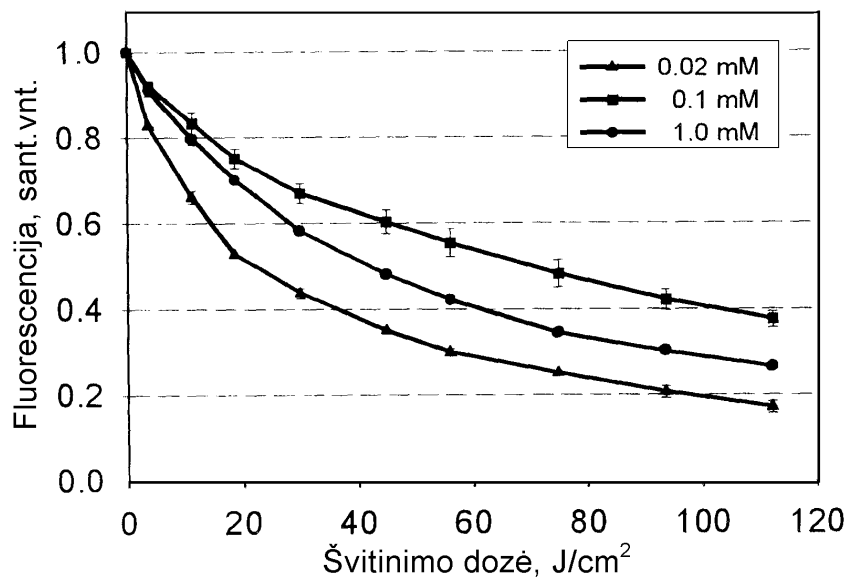
7.6 pav. Fotoprodukto susidarymo kinetikos. Fluorescencija registruota ties 670 nm žadinant ties 445 nm. ALA koncentracija 1 mM

Tyrimai rodo, kad daugelio porfirinų irimo reakcijose dalyvauja singuletinis deguonis (Krieg ir Whitten, 1984a,b; Cox ir Whitten, 1982; Krasnovskij ir kt., 1982). Buvo įvertintas PpIX fluorescencijos intensyvumo mažėjimas švitinimo metu oro prisotintose ląstelių suspensijose ir azoto prisotintose suspensijose. Pučiant azotą į tirpalą 30 minučių deguonies koncentracija jame nuo maždaug 0,22 mM sumažėja iki $\approx 2\mu\text{M}$ (Spikes, 1992). PpIX fotodegradacija azoto aplinkoje vyksta gerokai lėčiau negu oro prisotintoje aplinkoje (7.7 pav.). Taigi kai aplinka yra nepalanki singuletio deguonies susidarymui, PpIX fotooksidacija slopinama (Strečkytė ir kt., 1994).



7.7 pav. ALA-indukuoto PpIX ląstelių suspensijoje fluorescencijos intensyvumo silpnėjimas švitinant. Fluorescencija registruota ties 635 nm žadinant ties 413 nm. ALA koncentracija 1 mM

Pastebėta, jog PpIX fluorescencijos fotoblukimo santykinė sparta priklauso nuo pradinio ALA kiekio, naudoto šio porfirino sintezei stimuliuoti (7.8 pav.) (Bagdonas ir kt., 2000).

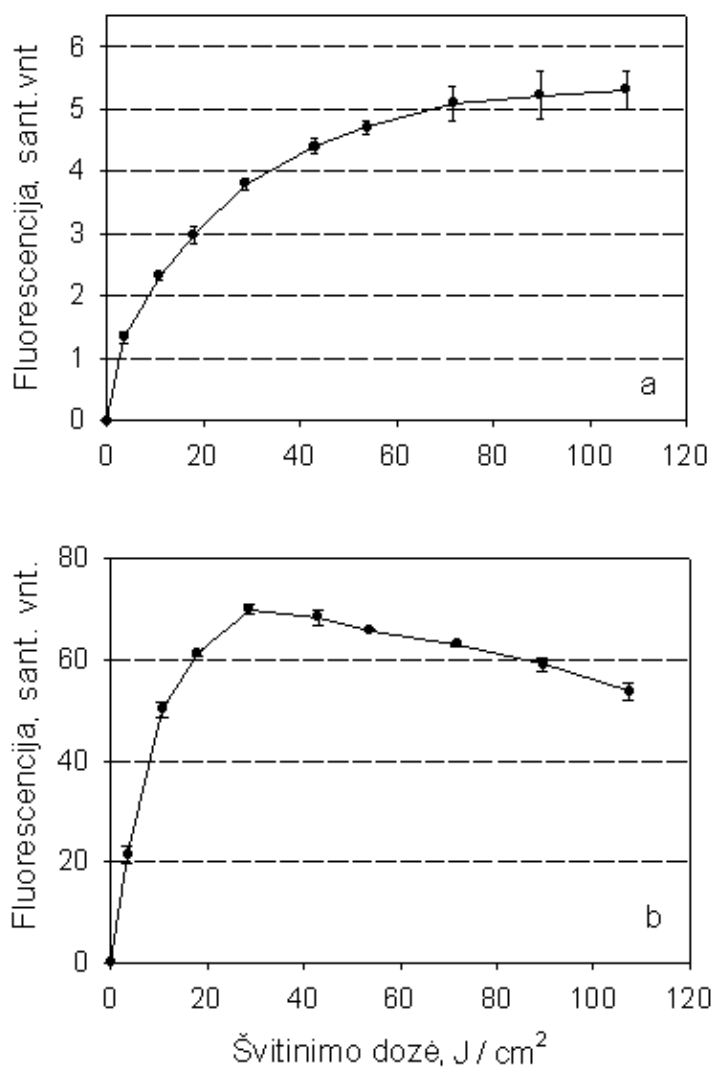


7.8 pav. ALA-indukuoto PpIX ląstelių suspensijoje fluorescencijos intensyvumo silpnėjimas švitinant. Fluorescencija registruota ties 635 nm žadinant ties 407 nm.

Vertinant fotoproducto susidarymą buvo atlikta fluorescencijos korekcija, įskaitanti PpIX fluorescencijos fotoblukimą ties 675 nm, pagal formulę:

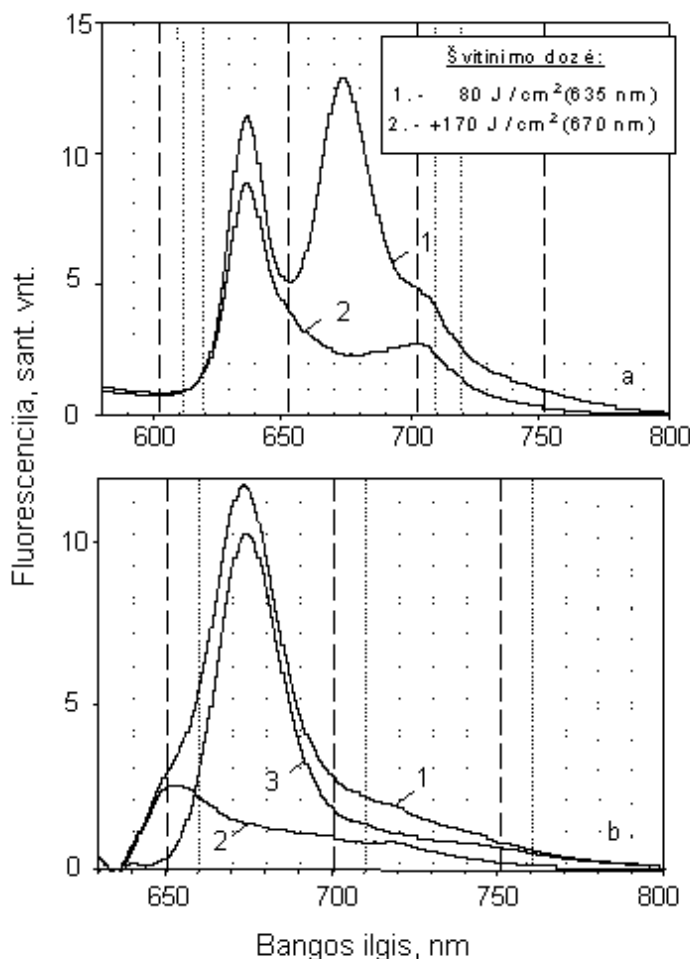
$$F'_{FP}(675) = F'(675) - F'(635) F_0(675)/F_0(635) \quad (7.1)$$

čia: $F_0(675)$ ir $F_0(635)$ – pradinis PpIX fluorescencijos intensyvumas ties 675 ir 635 nm, $F'(675)$ ir $F'(635)$ – fluorescencijos intensyvumai ties atitinkamais bangų ilgiais po kiekvieno švitinimo intervalo, $F'_{FP}(675)$ – koreguota fotoproducto fluorescencijos intensyvumo vertė. Fotoproducto formavimąsi atspindintys fluorescencijos intensyvumo pokyčiai pavaizduoti 7.9 paveiksle.



7.9 pav. Hp fluorescencijos ląstelių suspensijoje santykiniai pokyčiai ties 675 nm, įvertinti pagal (7.1) formulę. Pradinė ALA koncentracija (a) 0,1 mM, (b) 1,0 mM

Kaip matyti, didesnė pradinė ALA koncentracija fototransformacijų metu sąlygoja spartesnę fotoprotoporfirino fluorescencijos intensyvumo didėjimą bei tolesnį jo silpnėjimą. Pasirinkus dviejų bangos ilgių spinduliuotę nuoseklia seka, ląstelių suspensijoje iš PpIX susiformavęs fotoprotoporfirinas buvo selektyviai švitinamas tiriant tolesnes sensibilizatoriaus fototransformacijas. Gautų fluorescencijos spektrų analizė parodė, kad švitinimo metu formuojasi ne tik fotoprotoporfirinas (7.10 b pav., 3 kreivė), bet ir kitas fotoproduktas, turintis savitą fluorescencijos spektrą su smaile ties 650 nm (7.10 b pav., 2 kreivė).



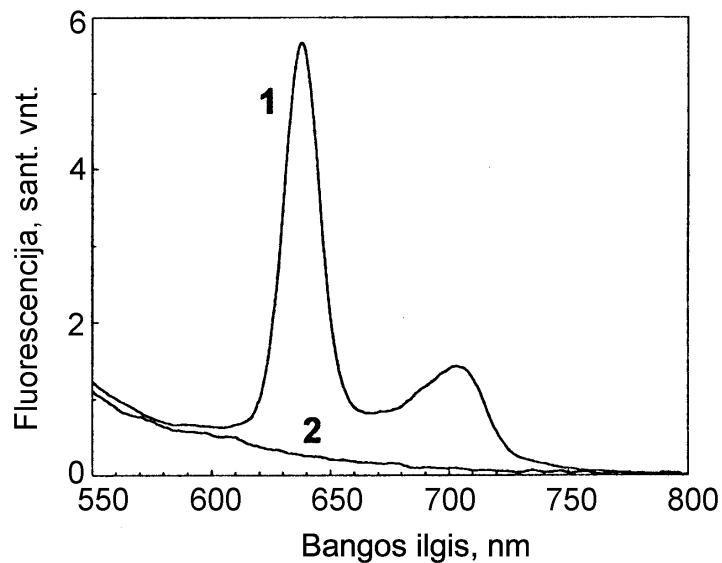
7.10 pav. PpIX fluorescencijos spektrai po švitinimo 635 nm ir 670 nm bangų ilgio šviesa, $\lambda_{\text{žad}} = 450$ nm (a); skirtuminiai spektrai, atspindintys fotoproduktų susidarymą (b)

Spektro forma, santykinai nedidelis intensyvumas, taip pat ir didesnis junginio fotostabilumas, palyginti su PpIX ar fotoprotopofirinu, leidžia daryti prielaidą, jog šis fotoproduktas galėtų būti keleto tetrapiroolinių molekulių darinys, pavyzdžiui, porfirino ir chlorino dimeras (Bagdonas ir kt., 2000).

7.3. Sveikoje pelės odoje ALA-indukuoto PpIX spektroskopinės savybės

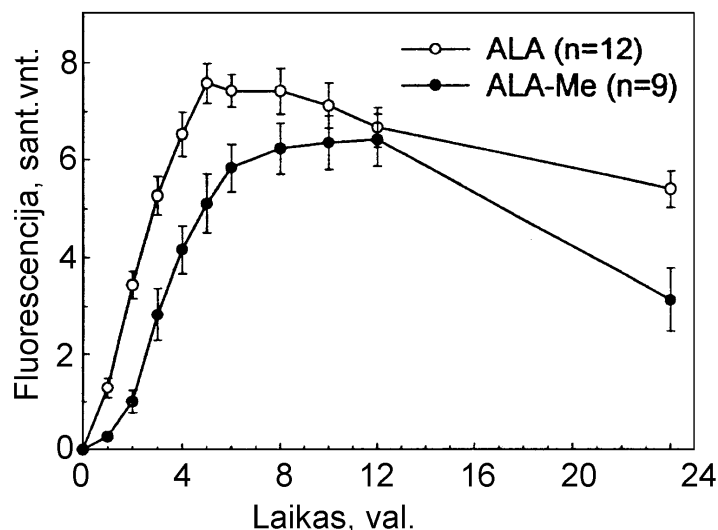
Navikams ir ikinavikiniam dariniams aptikti vis plačiau taikomi neinvaziniai optiniai fluorescenciniai metodai. Išsiskiria dvi šios srities tyrimų kryptys: pirmoji – audinių savosios fluorescencijos (autofluorescencijos) matavimas ir jos specifinių bruožų, būdingų navikiniam audiniui, paieška, siekiant sukurti savalaikio navikų diagnozavimo metodus; antroji – sensibilizuotos navikų diagnostikos metodų kūrimas. Šie metodai dažniausiai taikomi kartu su FNT ir padeda sekti fotosensibilizatoriaus kaupimąsi navikuose po injekcijos bei stebėti jo dinamiką švitinimo metu.

Paprastai ALA naudojama intraveniniu ar oraliniu būdu. Gydant plaučių vėžį gali būti taikoma tiesioginė ALA miltelių inhaliacija į plaučius, o gydant paviršinius odos navikus dažnai vartojamas specialus tepalas, kurio sudėtyje yra ALA. Šis būdas mažiausiai veikia organizmą, nes tepama tik tam tikra odos vieta. Tad PpIX indukcijai pelių odoje buvo pasirinkta ALA tepalo užtepimo ant odos paviršiaus metodika. Tirtos ALA-indukuoto PpIX kaupimosi pelių odoje farmakokinetikos bei sensibilizatoriaus fotomodifikacijos švitinimo metu (Juzėnas ir kt., 1999 a). Fluorescencinis tyrimo metodas leido stebėti fotosensibilizatoriaus kaupimosi dinamiką bei pasiskirstymą *in vivo*.



7.11 pav. PpIX fluorescencijos pelės odoje spektras praėjus 24 val. po 20 % ALA tepalo užtepimo ant odos (1) ir kontrolinės pelės odos autofluorescencijos spektras (2)

7.11 pav. pavaizduotas ALA-indukuoto PpIX pelės odoje fluorescencijos spektras ir kontrolinės (nesensibilizuotos) pelės odos autofluorescencijos spektras. Kontrolinės pelės odos autofluorescencijos spektras neturi aiškiai išreikštų smailių matuotoje spektro srityje, o ALA-indukuoto PpIX fluorescencijos pelės odoje spektras turi dvi būdingas juostas ties 637 ir 705 nm. Fluorescencijos intensyvumo pokyčiai ties 637 nm atspindi PpIX koncentracijos kitimą eksperimentinių gyvūnų odoje, tad galima įvertinti, per kiek laiko nuo tepalo užtepimo pradžios susikaupia maksimali fotosensibilizatoriaus koncentracija. Endogeninio PpIX kaupimosi pelės odoje kinetikos (7.12 pav.) rodo, kad per pirmąsias penkias valandas PpIX kiekis didėja ir pasiekia didžiausią koncentraciją praėjus 7 valandoms. Fluorescencijos intensyvumo mažėjimą po 8 val. sąlygoja ląstelių apsauginiai mechanizmai, padedantys šalinti audiniuose susikaupusio PpIX perteklių.



7.12 pav. PpIX kaupimosi sveikoje pelių odoje kinetikos, užtepus 20% ALA (12 pelių vidurkis) arba ALA-Me (9 pelių vidurkis) tepalo. Fluorescencija matuota ties 637 nm (žadinimas – 407 nm). Nurodyta standartinė matavimų paklaida

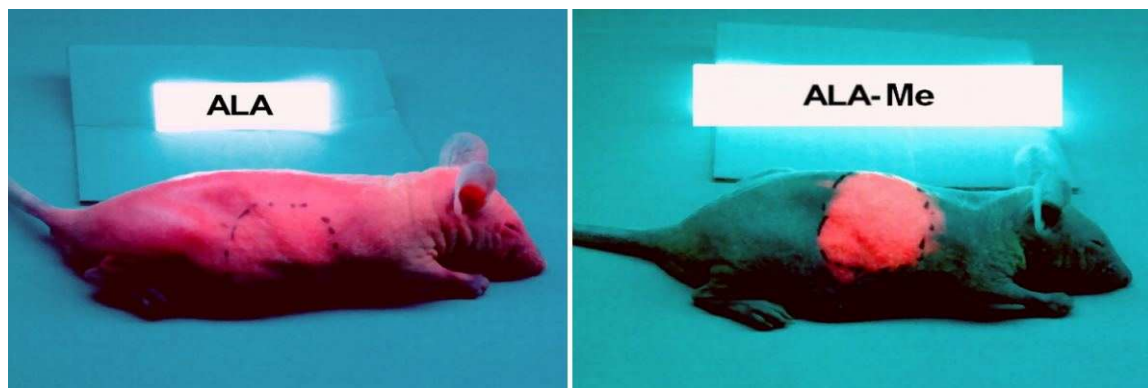
Taikant paviršinį tepalo užtepimo metodą PpIX koncentracija paprastai būna didesnė naviką dengiančioje odoje negu pačiame navike (Malik ir kt.,1995; Henderson, 1995). Tačiau paviršinis ALA tepalo užtepimo metodas, palyginti su intraveniniu ALA įvedimu, pasižymi didesniu selektyvumu gydant paviršinius odos navikus ir yra efektyvus gydant paviršines odos karcinomas (Peng ir kt.,1995; Meijnders ir kt., 1996) bei odos keratozes (Fink-Puches ir kt., 1997; Cairnduff ir kt., 1994).

Dėl gana lėtos ALA molekulių difuzijos į gilesnius audinius paviršinis užtepimo metodas yra neefektyvus gydant mazgelinius ir gilesnių audinių sluoksnių navikus (Cairnduff ir kt., 1994). ALA molekulė yra hidrofilinė, todėl sunkiai skverbiasi per audinius ir ląstelių membranas. Skverbimosi savybės gali būti pagerintos naudojant lipofilinius ALA darinius, tokius kaip ALA esteriai, turintys ilgas esterines grandines (ALA pentilo esteris, ALA heksilo esteris ir t. t.) (Gauillier ir kt.,1997; Kloek ir kt., 1998).

Lyginamųjų eksperimentų rezultatai rodo (7.13 pav.), kad PpIX fluorescencijos intensyvumas pelės odoje naudojant vienodas ALA ir ALA metilo esterio (ALA-Me) koncentracijas tepale po 12 val. yra toks pat (Juzėnas ir kt., 1999 a). Tai sutampa su kitų autorių gautais rezultatais, rodančiais, kad ląstelių kultūrose ALA ir ALA-Me indukuoja tokį patį PpIX kiekį (Kloek ir kt., 1998). ALA-Me indukuoto PpIX sintezės vėlinimas aiškinamas tuo, kad ALA esterių molekulės, prieš patekdamos į hemo biosintezės ciklą, paverčiamos ALA molekulėmis (Kloek ir kt., 1998).

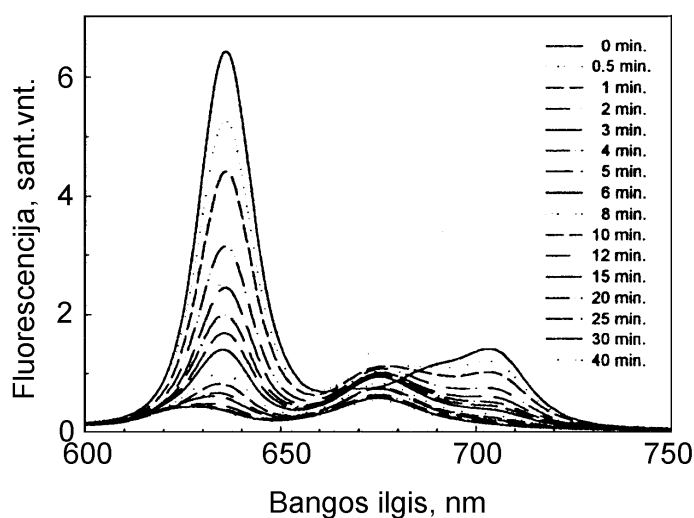
ALA-indukuotas PpIX plinta aplink tepalu pateptą vietą ir PpIX fluorescencija

matoma visuose pelės audiniuose praėjus maždaug 6–8 val. po užtepimo (7.13 pav.).



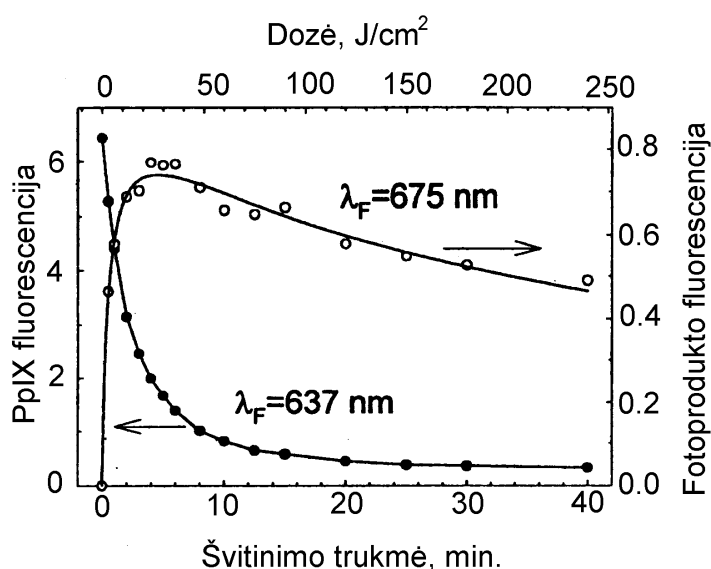
7.13 pav. Pelių odos fluorescencija apšvitinus ultravioletine spinduliuote. 20% ALA (pirma pelė) ir 20% ALA-Me (antra pelė) tepalo buvo užtepta ant sveikos odos ir laikyta 8 val. Ant odos parodyta tepalu patepta vieta

Tuo tarpu ALA-Me indukuotas PpIX neplinta, o išlieka tik tepalu pateptoje vietoje praėjus net 24 val. (Juzėnas ir kt., 1999 a). Taigi parenkant švitinimo parametrus svarbu atsižvelgti ne tik į ALA arba ALA-Me indukuoto PpIX kaupimosi kinetikas, bet ir į PpIX pasiskirstymą audiniuose. Atliekant klinikinius tyrimus pastebėta, kad ALA-Me-indukuotas PpIX, palyginti su ALA-indukuotu PpIX, selektyviau kaupiasi odos keratozėse (Fritsch ir kt., 1998) bei yra homogeniščiau pasiskirstęs gumbuotose paviršinėse odos karcinomose (Peng ir kt., 1997 b). Pastebėta, kad ALA-Me indukuotas PpIX greičiau pasišalina iš odos negu ALA indukuotas PpIX, o tai irgi svarbu norint išvengti odos jautrumo šviesai po gydymo (Juzėnas ir kt., 1999 b). Taigi eksperimentiniai rezultatai rodo, kad FNT gali būti efektyvesnė naudojant ALA esterius.



7.14 pav. PpIX fluorescencijos intensyvumo silpnėjimas pelės odoje švitinant 635 nm 100 mW/cm² spinduliuote. Fluorescencijos spektrai matuoti žadinant ties 407 nm praėjus 14 val. po 20 % ALA tepalo užtepimo

Kaip ląstelių suspensijoje, taip ir pelių odoje ALA-indukuotas PpIX yra nestabilus. Švitinant 635 nm bangos ilgio 100 mW/cm^2 spinduliuote PpIX fluorescencija ženkliai blunka ir santykinai padidėja ties 675 nm (7.14 pav.). Ši nauja fluorescencijos juosta, kuri atsiranda ir švitinant PpIX sensibilizuotas ląstelių kultūras (Strečkytė ir kt., 1994; Bagdonas ir kt., 2000), gali būti priskiriama švitinimo metu besiformuojantiems fotoproduktams. Fluorescencinės kinetikos (7.15 pav.) rodo greitą PpIX fotoblukimą bei fotoproduktų susidarymą. Švitinant FNT taikomomis dozėmis (apie 200 J) PpIX beveik visiškai išblunka.



7.15 pav. PpIX fluorescencijos intensyvumo silpnėjimo ($I_F = 637 \text{ nm}$) ir fotoprodukto formavimosi ($I_F = 675 \text{ nm}$) pelės odoje kinetikos švitinant $635 \text{ nm } 100 \text{ mW/cm}^2$ spinduliuote. Fluorescencija matuota žadinant ties 407 nm

Taigi PpIX yra fotolabilus sensibilizatorius, nuo šviesos irstantis net ir bedeguonėje aplinkoje (Konig ir kt., 1993 b; Strečkytė ir kt., 1994). ALA-FNT metu greičiausiai suyra viršutiniuose audinių sluoksniuose iki $0,1 \text{ mm}$ gylio susikaupęs PpIX (Moan ir kt., 1995). Tai yra privalumas tuo atveju, kai PpIX koncentracija naviką dengiančiuose audinio sluoksniuose ir odoje yra tokia, jog sensibilizatorius suyra nespėjus įvykti sveikų audinių negrįžtamoms pažeidimams. Tada galima taikyti didesnes švitinimo dozes ir sukelti navikinių audinių, sukaupusių kur kas didesnę palyginti su aplinkiniais sveikais audiniais PpIX kiekį, nekrozę nepakenkiant sveikiems audiniams (Moan ir kt., 1996).

7.4. ALA-FNT: klinikiniai tyrimai

ALA-indukuoto PpIX pasiskirstymas išoriškai ir sistemiškai panaudojus ALA. Išoriškai panaudojus ALA sveikoje ir pažeistoje žmogaus odoje registruojamos PpIX fluorescencijos intensyvumas didėja pirmąsias 4 valandas po ALA tepalo užtepimo ir išlieka maždaug vienodas apie 4–14 valandų, nelygu ALA koncentracija tepale ir užtepimo trukmė (Peng ir kt., 1993; Orenstein ir kt., 1995 a). Paprastai nuvalius ALA tepalą po 24 valandų PpIX fluorescencijos odoje užregistruoti nebeįmanoma.

Sistemiškai ALA naudojama fluorescencinei navikų diagnostikai ir kai kurių odos, virškinimo trakto ir plaučių navikų FNT (Regula ir kt., 1995; Fromm ir kt., 1996; Peng ir kt., 1995; Awadh ir Lam, 1996). Tiriant, kur ir kiek kaupiasi PpIX, susidarančio organizmuose po sisteminio (intraperitoninio, intraveninio ar oralinio) ALA panaudojimo, dažniausiai taikomas spektrofluorimetrinis metodas, leidžiantis išmatuoti PpIX fluorescenciją *in vivo*. Pelių, šunų ir žmonių odoje sistemiškai panaudojus ALA didžiausias PpIX kiekis būna po 3–8 valandų, o po 24 val. jo visiškai nebelieka (Peng ir kt., 1993; Pottier ir kt., 1986). Panašių rezultatų gauta ir kitais metodais – fluorescencine mikroskopija (Peng ir kt., 1992) ir cheminiu ekstrahavimu (Henderson ir kt., 1995).

Žmogaus odos vėžio gydymas FNT panaudojant išorinę ALA. Labiausiai paplitusios dvi odos vėžio rūšys: bazoląstelinis vėžys (BCC) ir plokščialąstelinis (spinoceliulinis) (SCC) vėžys. Odos vėžys dažniausiai gydomas chirurginiais, kriochirurginiais metodais, spinduline terapija ar išorine chemoterapija. FNT su HpD ar fotofrinu taip pat taikoma odos vėžiui (ne melanomoms) gydyti (Dougherty, 1993; Fisher ir kt., 1995; Schuitmaker ir kt., 1996). Gerų rezultatų gauta gydant paviršinį BCC FNT su TPPS (Sacchini ir kt., 1987; Santoro ir kt., 1990). Pirmieji paviršinių BCC gydymo ALA-FNT rezultatai paskelbti 1990 metais (Kennedy ir kt., 1990). Šiuo metu pasaulyje atliekami labai platūs ALA-FNT klinikiniai tyrimai gydant odos vėžį.

Levulanas[®] (DUSA Pharmaceuticals, Kanada) bus, matyt, pirmasis ALA preparatas, leistas naudoti gydymui. Taikant ALA-FNT ant navikų tepamas tepalas, turintis ALA. Įprasta ALA koncentracija tirpale yra 20%, tačiau gali būti ir kitokia – nuo 2 iki 40%. Iš tepalo, kurio sudėtyje yra 2–5% ALA ir kuris užtepamas 8-12 valandų, susidaro maždaug tiek pat PpIX kaip ir iš tepalo, turinčio 20% ALA per 3 valandas. Užteptas tepalas uždengiamas plėvele, o praėjus reikiamam laikui (nuo 3 iki 8 valandų) navikai švitinami arba 630 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote, arba nekoherentinės

šviesos šaltinių (volframo, ksenono ar halogeninių lempų) spinduliuote panaudojant raudonus filtrus. Švitinant lazeriu švitinimo dozės būna nuo 60 iki 250 J/cm² esant lazerio šviesos intensyvumui 50–150 mW/cm²; švitinant lempomis – atitinkamai 30–540 J/cm² ir 50–300 mW/cm². Kai švitinimo šviesos intensyvumas yra apie 100 mW/cm², švitinamos vietos temperatūra pakyla iki 39,5–42,5°C (Orenstein ir kt., 1995 b).

Bazoląstelinio ir plokščialąstelinio vėžio gydymas. 7.1 lentelėje apibendrinti literatūroje paskelbti paviršinio bazoląstelinio vėžio (pBCC) gydymo rezultatai (pagal Peng ir kt., 1997 b). Gydymo efektyvumas vertintas pagal tokius kriterijus: navikas visiškai išnyko, t.y. nėra jokių klinikinių naviko požymių gydytoje vietoje; dalinai išnyko – navikas sumažėjo 50% ir daugiau; neišnyko – navikas sumažėjo mažiau nei 50%. Visų 826 gydytų paviršinių bazoląstelinio navikų (pBCC) apibendrinti gydymo rezultatai tokie (pagal vidurkių santykius): visiškai išnyko – 87%, dalinai išnyko – 5% ir neišnyko – 8%. Mazgelinių bazoląstelinio (mBCC) navikų (gydyti 208 navikai) gydymo rezultatai – atitinkamai 53%, 35% ir 12%.

7.1 lentelė. Literatūroje paskelbti bazoląstelinio vėžio gydymo FNT panaudojant išorinę ALA rezultatai

Literatūros šaltinis	Bendras navikų skaičius (pBCC ir mBCC)	ALA koncentracija tepale; užtepimo trukmė, val.	Švitinimo šaltinis ir bangos ilgis (nm)	Švitinimo dozė J/cm ² (mW/cm ²)	Atsakas, navikų skaičius (%)			Stebėjimo trukmė (mėn.)
					visiškai išnyko	dalinai išnyko	neišnyko	
Kennedy ir kt., 1990	80	20%;3-6	Volframo lempa >600	31,5-540 (150-300)	72(90)	6(7,5)	2(2,5)	2-3
Kennedy ir Pottier, 1992	>300	20%;3-6	Volframo lempa >600	31,5-540 (150-300)	237(79)	-	63(21)	3
Warloe ir kt., 1992	94	20%;3	Vario garų dažų lazeris, 630	100 (100-150)	90(96)	4(4)	-	3
Svanberg ir kt., 1992	21 10*	20%;6	Nd:YAG DL, 630	40-100(100)	21(100) 4(40)	-	- 6(60)	3-5
Wolf ir kt., 1993	37 10*	20%; 4-8	Volframo lempa >570	30-100 (50-100)	36(97) 1(10)	1(3) 9(90)	- -	3-12
Cairnduff ir kt., 1994	16	20%;3-6	Vario garų dažų lazeris, 630	125-250 (150)	8(50)	8(50)	-	4-21

Svanberg ir kt., 1994	55 25*	20%; 4-6	Nd:YAG DL, 630	60(110)	55(100) 25(100)	- -	- -	<14
Warloe ir kt., 1995	141 4 ^a 56 ^b	20%; 3	Vario garų dažų lazeris, 630	40-200(150)	130(92) 16(67) 19(34)	11(8) 7(29) 35(62)	- 1(4) 2(4)	3-12
Calzavara-Pinton, 1995	23 30*	20%; 6-8	ArDL, 630	60-80(100)	20(87) 15(50)	3(13) 9(30)	- 6(20)	24-36
Lui ir kt., 1995	8	20%; 3	Volframo lempa >570	100(19-44)	4(50)	3(37)	1(13)	3
Orenstein ir kt., 1995	17 31*	20%ALA+2 %DMSO+2 %EDTA, 4-5	Ksenono lempa, 600-720	100(?)	17(100) 24(77)	- 7(23)	-	3
Fijan ir kt., 1995	34 22*	20%ALA+3 %DFO,20	Halogeno lempa, 570-690	180-300(50-300)	30(88) 7(32)	3(9) 6(27)	1(3) 9(41)	3-20
Vidurkiai	826 208*	*			720(87) 111(53)	39(5) 73(35)	67(8) 24(12)	

Nd:YAGDL – Nd:YAG dažų lazeris; ArDL – argono jonų dažų lazeris; EDTA – etilendinitrilotetraacto rūgštis;

DMSO – dimetilsulfoksidai; DFO – dezferioksaminas

^a<2 mm mBCC

^b>2 mm mBCC

Plokščialąstelinio vėžio (SCC) gydymo rezultatai apibendrinti 7.2 lentelėje (pagal Peng ir kt., 1997 b). Gydymo rezultatų vidurkių santykiai, įvertinus 41 naviko gydymą, yra 81% – visiškai išnyko, 14% – dalinai išnyko ir 5% neišnyko. Taigi rezultatai panašūs kaip ir gydant pBCC.

7.2 lentelė. Literatūroje paskelbti plokščialąstelinio vėžio gydymo FNT panaudojant išorinę ALA rezultatai

Literatūros šaltinis	Bendras navikų skaičius (pSCC ir *mSCC)	ALA koncentracija tepale; užtepimo trukmė, val.	Švitinimo šaltinis ir bangos ilgis (nm)	Švitinimo dozė J/cm ² (mW/cm ²)	Atsakas, navikų skaičius (%)			Stebėjimo trukmė (mėn.)
					visiškai išnyko	dalinai išnyko	neišnyko	
Kennedy ir kt., 1990	8	20%;3-6	Volframo lempa >600	31,5-540 (150-300)	6 (75)	2 (25)	-	2-3
Svanberg ir kt., 1992	5	20%;6	Nd:YAG DL, 630	40-100 (100)	5(100)	-	-	3-5
Wolf ir kt., 1993	6	20%; 4-8	Volframo lempa >570	30-100 (50-100)	5 (83)	1(17)	-	3-12

Calzavara-Pinton, 1995	12 6*	20%; 6-8	ArDL, 630	60-80 (100)	10(84) 2(33) ^c	1(8) 2(33)	1(8) 2(34)	24-36
Lui ir kt., 1995	5	20%; 3	Volframo lempa >570	100 (19-44)	2(40)	2(40)	1(20)	3
Orenstein ir kt., 1995	5 2*	20% ALA+ 2% DMSO +2% EDTA , 4-5	Ksenono lempa, 600-720	100(?)	5(100) -	- 2(100)	- -	3
Vidurkiai	41 8*				33(81) 2(25)	6(14) 4(50)	2(5) 2(25)	

Nd:YAGDL – Nd:YAG dažų lazeris; ArDL – argono jonų dažų lazeris; EDTA – etilendinitrilotetraacto rūgštis; DMSO – dimetilsulfoksidas; DFO – dezferioksaminas

Mazgelinių bazolastelinių ir plokščialastelinių navikų gydymas FNT panaudojant išorinę ALA nebuvo labai sėkmingas (7.1 ir 7.2 lentelės). Viena iš priežasčių, matyt, yra ribotas ALA įsiskverbimas į gilesnius mazgelinių navikų sluoksnius. Kita priežastis gali būti skirtingas PpIX sintezės iš ALA pajėgumas skirtingų histologinių tipų navikuose. Todėl metodo optimizavimui būtina ALA-indukuoto PpIX lokalizacijos navikiniuose audiniuose analizė. Pastebėta, kad į gilesnius bazolastelinių navikų sluoksnius daugiau ALA įsiskverbia, kai užteptas tepalas laikomas ilgiau – iki 12–48 valandų (Peng ir kt., 1995; Szeimes ir kt., 1994). ALA skvarbumas ir PpIX sintezės išeiga padidėja į tepalą pridėjus DMSO ar DFO (Fijan ir kt., 1995). Reikia pažymėti, kad vartojant ALA peroraliai ar intraveniškai PpIX gaminasi visame naviko tūryje (Peng ir kt., 1995), tad šis vartojimo būdas turi privalumų išorinio atžvilgiu.

FNT panaudojant išorinę ALA efektyvumo didinimas. Vienas iš būdų geresniems rezultatams gauti yra gydymo kartojimas. Pakartotinis gydymas paprastai būna kur kas rezultatyvesnis, ypač mazgelinių bazolastelinių navikų atveju. Gydant mBCC, po vienkartinio gydymo visiškai išnyko tik 16 iš 25 navikų (64%), o pakartojus gydymą visiškai išnyko visi gydyti navikai (100%) (Svanberg ir kt., 1994). Geresnių mazgelinių bazolastelinių ir plokščialastelinių navikų gydymo rezultatų gauta į tepalą pridėjus DMSO arba EDTA, medžiagų, padidinančių ALA skverbimąsi per odą (Warloe ir kt., 1995; Orenstein ir kt., 1995 a).

Gydymo rezultatų po trumpalaikių ir ilgalaikių stebėjimų palyginimas. Literatūroje skelbiami ALA-FNT gydytų odos navikų gydymo rezultatai paprastai atspindi tik trumpalaikius, 1–2 mėnesio po gydymo, stebėjimo laikotarpius, todėl sunku

daryti apibendrinančias išvadas. 7.3 lentelėje (pagal Peng ir kt., 1997b) pateikiami trumpalaikių ir ilgalaikių stebėjimų rezultatai, vertinimo kriterijumi pasirinkus visišką naviko išnykimą. Dažniausiai ilgalaikių stebėjimų rezultatai nedaug skiriasi nuo trumpalaikių, tačiau yra atvejų, kai po paviršinių ir mazgelinių bazolastelinių navikų gydymo visiško navikų išnykimo procentas po 17–36 mėnesių stebėjimo sumažėjo beveik dvigubai (navikai recidyvavo) (Cairnduff ir kt., 1994; Calzvara-Pinton ir kt., 1995; Lui ir kt., 1995).

7.3 lentelė. Odos vėžio gydymo FNT panaudojant išorinę ALA rezultatai po trumpalaikio ir ilgalaikio stebėjimo

Literatūros šaltinis	Navikas	Ben- d- ras navi- kų skai- čius	ALA koncen- tracija tepalė; užtepimo trukmė, val.	Švitini- mo šaltinis ir bangos ilgis (nm)	Švitini- mo dozė J/cm ² (mW/ cm ²)	Navikai visiškai išnyko (%) - trumpa- laikio stebėji- mo rezultatai	Stebė- jimo truk- mė (mėn.)	Navikai visiškai išnyko (%) - ilgalai- kio stebėji- mo rezultatai	Stebėji- mo trukmė (mėn.)
Wolf ir kt., 1993	pBCC	37	20%; 4-8	Volfra- mo lempa >570	30-100 (50-100)	37(100)	1-2	36(97)	Vidutiniš- kai 7
Cairnduff ir kt., 1994	pBCC	16	20%;3-6	Vario garų dažų lazeris, 630	125-250 (150)	14(88)	2	8 (50)	Vidutiniš- kai 17 Vidutiniš- kai 18
	Boweno liga	36				35(97)		32(89)	
Calzavara -Pinton, 1995 ^a	pBCC	23	20%;6-8	ArDL, 630	60-80 (100)	23(100)	1	20(87)	24-36
	mBCC	30				24(80)		15(50)	
	pSCC	21				11(92)		10(83)	
	mSCC	6				4(67)		2(33)	
	Boweno liga	6				6(100)		6(100)	
Spindu- linė keratozė	Kerato- akantoma	50	50(100)	42(84)					
		4	4(100)	4(100)					
Morton ir kt., 1995	Boweno liga	20	50mg/cm ² , 4	Ksenono lempa, 630±15	94-156 (55-158)	20(100)	2	18(90)	12
Warloe ir kt., 1995	pBCC	393	Tik ALA arba ALA/ DMSO/ED TA, ^b 3	Vario garų dažų lazeris, 630	40-200 (150)	369(94)	3	360(92)	7-18 Vidutiniš- kai 10
	mBCC	326				245(75)		233(71)	

ArDL – argono jonų dažų lazeris; EDTA – etilendinitrilotetraacto rūgštis; DMSO – dimetilsulfoksidas

^a – visi navikai gydyti pakartotinai

^b – viso buvo gydyti 393 pBCC, 141 atveju naudotas tepalas, turintis 20% ALA; 125 atvejais tepalo sudėtyje, be ALA, buvo 2-20% DMSO/2-4% EDTA, 127 atvejais prieš užtepant tepalą gydoma vieta 15 min. paveikta 50-90% DMSO tirpalu. Buvo gydyti 326 mBCC, 80 atvejų naudotas tepalas, turintis tik ALA; 110 atvejų tepalo sudėtyje, be ALA, buvo 2-20% DMSO/2-4% EDTA, 136 atvejais prieš ALA naudotas DMSO

ALA-FNT ir HpD/fotorino-FNT palyginimas. Nemelanomos odos vėžio gydymo ALA-FNT ir HpD/fotorino-FNT rezultatus palyginti gana sunku, kadangi nėra bendro gydymo protokolo. Gydymo FNT rezultatai priklauso nuo panaudoto sensibilizatoriaus, jo dozės ir kaupimosi navike, švitinimo spinduliuotės bangos ilgio, švitinimo galios, šviesos skvarbumo į audinius gylio. Skiriasi navikų dydis ir pigmentacijos laipsnis. Dėl to labai sudėtinga palyginti ir apibendrinti įvairiomis gydymo sąlygomis gautus rezultatus. Abiejų metodų – FNT su išorine ALA ir FNT sistemškai taikant HpD arba fotofriną – privalumai ir trūkumai apibendrinti 7.4 lentelėje (Peng ir kt., 1997b). Nors abu metodai yra tinkami paviršiniam odos vėžiui gydyti, tačiau fotofrinas kol kas yra vienintelis leistas naudoti klinikoje vaistas ir pagal šiuo metu turimus rezultatus fotofrino-FNT yra kiek efektyvesnė už ALA-FNT gydant odos vėžį. Didžiausias fotofrino-FNT trūkumas – ilgalaikis odos jautrumas šviesai.

7.4 lentelė. Odos vėžio gydymo FNT panaudojant išorinę ALA ir HpD/fotofriną palyginimas

ALA-FNT	HpD/fotofrino-FNT
Patogus, galima taikyti ambulatoriniams ligoniams	Santykinai nepatogus, pacientas turi keletą dienų gulėti ligoninėje
Pigus (ALA kur kas pigesnė už fotofriną; švitinimui tinka paprastos lempos su tinkamais filtrais)	Brangus (švitinimui paprastai naudojami lazeriai)
Netoksiškas, nėra sąveikos su kitais gydymo metodais	Netoksiškas, nėra sąveikos su kitais gydymo metodais
Didelis selektyvumas, nepažeidžiama aplinkinė oda	Selektyvus, aplinkinė sveika oda nepažeidžiama
Keli atskiri navikai gali būti gydomi vienu metu	Keli atskiri navikai gali būti gydomi vienu metu
Tas pats navikas gali būti pakartotinai gydomas kelis kartus	Tas pats navikas gali būti pakartotinai gydomas kelis kartus
Kosmetiniai rezultatai geresni negu gydant įprastais metodais	Dažniausiai kosmetiniai rezultatai panašūs arba geresni negu gydant įprastais metodais
Odos jautrumas šviesai pranyksta po 24 valandų	Odos jautrumas šviesai išlieka 4-6 savaites
Švitinimo metu dažnai reikalingas vietinis nuskausminimas	Švitinimo metu kartais reikalingas nuskausminimas
Efektyvus išoriniams navikams	Efektyvesnis už ALA-FNT gydant mazgelinius navikus

Kai kurie autoriai nurodo, kad FNT rezultatams įtakos turi naviko lokalizacija. Pavyzdžiui, gydant BCC ant nosies ar akies voko FNT su fotofrinu rezultatai buvo prastesni negu gydant BCC kitose vietose (Wilson ir kt., 1992; Hintschich ir kt., 1993).

"Lokalizacijos efektas" buvo pastebėtas ir gydant odos navikus ALA-FNT (Wolf ir kt., 1996; Szeimies, 1996). Matyt, ALA indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumas ir pasiskirstymas audiniuose skirtingose odos vietose (Kennedy ir Pottier, 1992) ir skirtinguose navikuose (Wolf ir kt., 1996) yra nevienodas. Pažymėtina, kad FNT dažnai taikoma kaip paliatyvus gydymas. Taigi prieš FNT pacientai paprastai jau būna gydyti įvairiais tradiciniais metodais ir dėl to FNT poveikis yra silpnesnis, ypač ALA-FNT atveju. Išorinė ALA-FNT turi keletą privalumų tradicinių gydymo metodų atžvilgiu. Gydymas neinvazinis, duoda puikius kosmetinius rezultatus, liekamasis jautrumas šviesai trumpalaikis, gydymą galima kartoti keletą kartų.

ALA-indukuoto PpIX fluorescencijos panaudojimas navikams diagnozuoti.

Geresnis ALA-indukuotų endogeninių porfirinų kaupimasis navikinėse ląstelėse teikia galimybių registruoti navike susikaupusio sensibilizatoriaus fluorescenciją. Tuo pagrįsti fluorescenciniai diagnostavimo metodai, ypač tinkami ankstyvų stadijų navikams ir kai kuriems ikinavikiniam dariniams nustatyti. Po išorinio ar sisteminio ALA arba ALA esterių panaudojimo fluorescencinėmis vaizdinimo sistemomis galima susekti ankstyvų stadijų navikus, nustatyti išplitimą, matmenis bei išryškinti naviko kraštus.

Ankstyvų stadijų šlapimo pūslės urotelio pažeidimai įprasta baltos šviesos cistoskopija dažnai būna sunkiai pastebimi. Intravezikaliai instiliavus 3% ALA tirpalą ir po 2-3 valandų atlikus fluorescencinę cistoskopiją, žadinant ALA-indukuotą PpIX kriptono jonų lazerio spinduliuote (406,7 nm), urotelio pažeidimai švytėjo raudona šviesa (Kriegmair ir kt., 1994; Kriegmair ir kt., 1995). Pažeistos vietos ir normalaus urotelio fluorescencijos intensyvumų santykis buvo 17:1. Tiriant 104 pacientus, sergančius šlapimo pūslės karcinoma, naviko diagnostavimas fluorescencine cistoskopija buvo, palyginti su įprasta baltos šviesos cistoskopija (72,7%), gerokai tikslesnis (96,9%) (Kriegmair ir kt., 1996).

Siekiant ankstyvo plaučių vėžio diagnostavimo taikyta fluorescencinė bronchoskopija. Septyniems pacientams, kuriems buvo įtariamas plaučių vėžys, tačiau nepatvirtintas įprasta bronchoskopija, buvo inhaliuotas 5-10% ALA NaCl tirpalas ir po 3 valandų atlikta fluorescencinė bronchoskopija. ALA-indukuoto PpIX fluorescencija padėjo tiksliai nustatyti pažeistas vietas (Baumgartner ir kt., 1996). Intensyvi PpIX fluorescencija buvo matoma navikų, epitelio displazijos ar stipraus uždegimo vietose tiriant kitą septynių pacientų, įtariamų plaučių navikais, grupę praėjus 3 valandoms po ALA tirpalo inhaliacijos (Huber ir kt., 1996). Sveiki audiniai fluorescavo labai silpnai.

Operuojant smegenų navikus labai svarbu tiksliai apibrėžti naviko ribas. Trims

pacientams, sergantiems polimorfine glioblastoma, 3 valandas prieš operaciją buvo duota išgerti ALA tirpalo (10mg/kg) (Stummer ir kt., 1996). Sveiki smegenų audiniai ne fluorescavo visiškai, o naviko audiniai, infiltravę aplinkinius sveikus audinius, švytėjo raudona šviesa. Histopatologiniam tyrimui buvo paimtos 35 biopsijos iš fluorescuojančių, aplinkinių ir ne fluorescuojančių audinių. Metodus pasirodė 100% specifiskas diagnozuojant gliomos infiltracijas.

Ateities perspektyvos. Nors gydant odos vėžį ALA-FNT gauta gerų rezultatų ir metodas jau taikomas gana plačiai, gydymo protokolas dar nėra optimalus (Peng ir kt., 1997b). Nehomogeniškas pasiskirstymas ar nepakankamai selektyvus ALA-indukuoto PpIX kaupimasis odos navikuose rodo, kad išorinio ALA panaudojimo procedūra dar nėra pakankamai tobula. ALA-FNT efektyvumą galėtų padidinti:

- Tinkamai parinkti priedai, pagerinantys ALA skvarbumą į gilesnius navikinio audinio sluoksnius. Skvarbumą galėtų padidinti ir kai kurie fizikiniai metodai, pavyzdžiui, ultragarsas, švitinimas mikrobangomis, jontoforezė.
- Daugiau PpIX sintetinti ląsteles galėtų priversti ferrochelatazės ir protoporfirinogeno oksidazės inhibitoriai. Iki klinikiniai tyrimai parodė, kad kai kurie junginiai (DMSO, EDTA, DFO, 1,10-fenantrolinas) skatina didesnę ALA-indukuotų porfirinų kaupimąsi.
- Optimalios, užtikrinančios maksimalaus PpIX kiekio visuose naviko sluoksniuose susikaupimą, laiko trukmės išoriniam ALA tepalo išlaikymui parinkimas.
- Kai kuriais atvejais ALA galėtų būti suleista tiesiai į naviką.
- Pasinaudojant PpIX fotoblukimu galima padidinti ALA-FNT poveikio selektyvumą.
- Trūkus (frakcionuotas) švitinimas ir pakartotinis gydymas gali pagerinti rezultatus.

ALA-FNT gali būti taikoma kaip pagalbinis būdas po chirurginės operacijos likusioms navikinėms ląstelėms sunaikinti. Fluorescencinio vaizdinimo metodai žada geras perspektyvas ankstyvam navikų diagnozavimui, ypač panaudojant ALA-esterius, nes jų indukuotas PpIX selektyviau kaupiasi navikiniuose dariniuose.

Literatūra

Aveline B., O. Delgado, D. Brault (1988) Reaction of singlet oxygen with vinyl-

substituted porphyrins. *J.Chem.Soc.Faraday Trans.*, 88, 1971-1976.

Awadh N., S. Lam (1996) Photodetection and PDT for early lung cancer using aminolevulinic acid. 6th IPA meeting. Abstract book.

Bagdonas S., L.-W. Ma, V. Iani, R. Rotomskis, P. Juzenas, J. Moan (2000) Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro: spectroscopic study. *Photochem.Photobiol.*, 72, 186-192.

Baumgartner R., R.M. Huber, H. Schulz, H. Stepp, K. Rick, F. Gamarra, A. Leberig, C. Roth (1996) Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J.Photochem.Photobiol.B.:Biol.*, 36, 169-174.

Bonkovsky H.L., J.F. Healey, P.R. Sinclair, J.F. Sinclair (1985) Conversion of 5-aminolaevulinate into haem by homogenates of human liver. Comparison with rat and chick-embryo liver homogenates. *Biochem.J.*, 227, 893-901.

Cairnduff F., M.R. Stringer, E.J. Hudson, D.V. Ash, S.B. Brown (1994). Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br.J.Cancer*, 69, 605-608.

Calzavara-Pinton P.G. (1995) Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid as an appropriate approach to the route treatment of superficial non-melanoma skin tumors. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.*, 29, 53-57.

Cox G.S., D.G. Whitten (1982) Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. *J.Am.Chem.Soc.*, 104, 516-521.

Dietel W., K. Bolsen, E. Dickson, C. Fritsch, R. Pottier, R. Wendenburg (1996) Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.*, 33, 225-231.

Dougherty T.J. (1993) Photodynamic therapy. *Photochem.Photobiol.*, 58, 895-900.

El-Far M., M. Ghoneim, E. Ibraheim (1990) Biodistribution and selective in vivo tumour localization of endogenous porphyrins induced and stimulated by 5-aminolevulinic acid: a newly developed technique, *J.Tumor Marker Oncol.*, 5, 27-34.

El-Sharabasy M.M.H., A.M. El-Wassel, M.M. Hafez, S.A. Salim (1992) Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br.J.Cancer*, 65, 409-412.

Fijan S., H. Honigsmann, B. Ortel (1995) Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. *Br.J.Dermatol.*, 133, 282-288.

Fink-Puches R., A. Hofer, J. Smolle (1997). Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, V. 41, P. 145.

Fisher A.M.R., L. Murphree, C.J. Gomer (1995) Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg.Med.*, 17, 2-31.

Fritsch C., B. Homey, W. Stahl, et al. (1998). Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of aminolevulinic acid methylester. *Photochem.Photobiol.*, 68, 218.

Fromm D., D. Kessel, J. Webber (1996) Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitization for colon cancer. *Arch.Surg.*, 131, 667-669.

Gaullier J.-M., K. Berg, Q. Peng (1997). Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Research.*, 57, 1481-1486.

Gibson S.L., M.L. Nguyen, J.J. Havens, A. Barbarin, R. Hilf (1999) Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, 265, 315-321.

Goff B.A., A.R. Bachor, N. Kollias, T. Hasan (1992) Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless quinea pigs. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 15, 239-251.

Gorman A.A., M.A.J. Rodgers (1989) Singlet Oxygen. *Handbook of Organic Photochemistry*, J.C.Scaiano (ed.), CRC Press, Boca Raton, Vol.II, 229-247.

Gudgin Dickson E.F., R.H. Pottier (1995) On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 29, 91-93.

Healey J.F., H.L. Bonkowsky, P.R. Sinclair, J.F. Sinclair (1981) Conversion of 5-aminolevulinic acid into heme by liver homogenates. Comparison of rat and chick embryo. *Biochem.J.*, 198, 595-604.

Henderson B. W., L. Vaughan, D.A. Bellnier H. vanLeengoed, P.G. Johnson, A.R. Oseroff (1995) Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. *Photochem.Photobiol.*, 62, 780-789.

Hintschich C., J. Feyj, C. Beyer-Machule, K. Riedel, K. Ludwig (1993) Photodynamic laser therapy of basal-cell carcinoma of the lid. *Ger.J.Ophthalmol.*, 2, 212-217.

Huber R.M., F. Gamarra, A. Leberig, H. Stepp, K. Rick, R. Baumgartner (1996) Inhaled 5-aminolevulinic acid (ALA) for photodynamic diagnosis and early detection of

bronchial tumors: first experience in patients. Abstract book of 6th IPA meeting.

Inhoffen H.H., H.Jr. Brockmann, K.-M. Bliesener (1969) Photoporphyrine und ihre Umwandlung in Spirographis- sowie Isospirographisporphyrin. Liebigs Annalen der Chemie, 730, 173-185.

Juzėnas P., S. Bagdonas, G. Streckytė, J. Moan, R. Rotomskis (1999 a) Endogenous photosensibilizing protoporphyrins IX photosensitizing agents for therapy, Medicina, 35, 189-195.

Juzėnas P., R. Sorensen, V. Iani, J. Moan (1999 b). Clearance of protoporphyrin IX from mouse skin after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester. In: Photochemotherapy of Cancer and Other Diseases. B. Ehrenberg, K. Berg (eds). Proc. SPIE., 3563, P. 161.

Kennedy J.C., R.H. Pottier, D.C. Pross (1990) Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principle and present clinical experience, J.Photochem.Photobiol.B:Biol., 6, 143-148.

Kennedy J.C., R.H. Pottier (1992) Endogenous protoporphyrin IX: a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. J.Photochem. Photobiol.B:Biol., 14, 275-292.

Kloek J., W. Akkermans, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen (1998). Aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. Photochem. Photobiol., 67, 150-154.

Kondo M., T. Hirota, T. Takaoka, M. Kajiwara (1993) Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell line of rats. Cell Biol.Toxicol., 9, 95-105.

Konig K., H. Meyer, H. Schneckenburger, A. Ruck, (1993 a) The study of endogenous porphyrins in human skin and their potential for photodynamic therapy by laser induced fluorescence spectroscopy. Lasers Med.Sci., 8, 127-132.

Konig K., H. Schneckenburger, A. Ruck, R. Steiner (1993 b) In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. J.Photochem.Photobiol.B:Biol., 18, 287-290.

Krasnovskij Jr., A.A., Ye.A. Venediktov, O.M. Chernenko (1982) Quenching of singlet oxygen by the chlorophylls and porphyrins. Biophysics, 27, 1009-1016.

Krieg M., D.G. Whitten (1984a) Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related free-base porphyrins in natural and model membrane systems. Evidence for novel photooxidation pathways involving amino acids. J.Am.Chem Soc., 106, 2477-

2479.

Krieg M., D.G. Whitten (1984b) Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocyte ghosts and microemulsions: a novel photooxidation pathways involving singlet oxygen. *J.Photochem.*, 25, 235-252.

Kriegmair M., R. Baumgartner, R. Knuechel, H. Stepp, F. Hofstadter, A. Hofstadter (1996) Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced fluorescence. *J.Urol.*, 155, 105-110.

Kriegmair M., H. Stepp, P. Steinbach, W. Lumper, A. Ehsan, H.G. Stepp et al. (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*, 44, 836-841.

Kriegmair M., H. Stepp, P. Steinbach, W. Lumper, A. Ehsan, H.G. Stepp (1995) Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. *Urol.Int.*, 55, 190-196.

Lui H., S. Salasche, T. Ariz, N. Kollias, J. Wimberly et al. (1995) Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical aminolevulinic acid: a clinical histologic study. *Arch.Dermatol.*, 131, 737-738.

Malik Z., G. Kostenich, L. Roitman (1995) Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA:protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, V. 28, P. 213.

Menon I.A., M.A. Becker, S.D. Persad, H.F. Haberman (1990) Quantitation of hydrogen peroxide formed during UV-visible irradiation of protoporphyrin, coproporphyrin and uroporphyrin. *Clin.Chim.Acta*, 186, 375-381.

Meijnders J. N., W.M. Star, R.S.de Bruijn, A.D.Treurniet-Donker, M.J.M. van Mierlo, S.J.M. Wijnhoff, B. Naafs, H. Beerman, P.C. Levendag (1996) Clinical results of photodynamic therapy for superficial skin malignances or actinic keratosis using topical 5-aminolevulinic acid. *Lasers Med.Sci.*, 11, 123-131.

Moan J., E. Hoydalsvik, Q. Peng, L.W. Ma, T. Warloe, H. Heyerdal (1995) Measurements of sensitizer fluorescence in patients by means of an ordinary fluorescence spectrometer. *Proc.SPIE*, 2625, 516-519.

Moan J., V. Iani, L.W. Ma, Q. Peng (1996) Photodegradation of sensitizers in mouse skin during PCT. *Proc.SPIE*, 2371, 187-192.

Morton C.A., C. Whitehurst, H. Moseley, J.V. Moore, R.M. Mackie (1995) Development of an alternative light source to lasers for photodynamic therapy. 1.

Clinical evaluation in the treatment of pre-malignant non-melanoma skin cancer. *Lasers Med.Sci.*, 10, 165-171.

Orenstein A., G. Kostenich, H. Tsur, L. Roitman, B. Ehrenberg, Z. Malik (1995 a) Photodynamic therapy of human skin tumors using topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA. In: D. Brault, G. Jori, J. Moan, B. Ehrenberg (eds.) *Photodynamic therapy of cancer II. Proc.SPIE*, 2325, 100-105.

Orenstein A., G., Kostenich, H. Tsur, H. Kogan, Z. Malik (1995b) Temperature monitoring during photodynamic therapy of skin tumors with topical 5-aminolevulinic acid application. *Cancer Lett.*, 93, 227-232.

Peng Q., K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J.M. Nesland (1997 a) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem.Photobiol.*, 65, 235-251.

Peng Q., J. Moan, T. Warloe, V. Iani, H.B. Steen, A. Bjorseth, J.M. Nesland (1996) Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.*, 34, 95-96.

Peng Q., J. Moan, T. Warloe, J.M. Nesland, C. Rimington (1992) Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int.J.Cancer*, 52, 433-443.

Peng Q., T. Warloe, J. Moan, H. Heyerdal, H. Steen, J.M. Nesland et al. (1995) Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem.Photobiol.*, 62, 906-913.

Peng Q., T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K.-E. Giercksky, J.M. Nesland (1997b) 5 - aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer*, 79, 2282-2308.

Peng Q., T. Warloe, J. Moan, H. Steen, K.E. Giercksky, J.M. Nesland (1993) Localization of ALA-induced porphyrins in normal and malignant tissues of mice, dogs and patients. Conference on photosensitization and photochemotherapy of cancer, Oslo, March 16-17, 1993, Abstract book, S4.

Pottier R.H., Y.F.A. Chow, J.P. LaPlante, T.G. Truscot, J.C. Kennedy, L.A. Beiner (1986) Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem.Photobiol.*, 44, 679-687.

Regula J., A.J. MacRobert, A. Gorchein, G.A. Buonaccorsi, S.M. Thorpe, G.M. Spencer et al. (1995) Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal and colorectal tumors using 5 aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX: a

pilot study. *Gut.*, 36, 67-75.

Robinson D.J., H.S. de Bruijn, N.van der Veen, M.R. Stringer, S.B. Brown, W.M. Star (1998) Fluorescence photobleaching of ALA-induced PpIX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochem.Photobiol.*, 67,140-149.

Sacchini V., E. Melloni, R. Marchesini, A. Luini, G. Bandieramonte, P. Spinelli et al. (1987) Preliminary clinical studies with PDT by topical TPPS administration in neoplastic skin lesions. *Lasers Surg.Med.*, 7, 6-11.

Santoro O., G. Bandieramonte, E. Melloni, R. Marchesini, F. Zunino, P. Lepera, G.D. Palo (1990) Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 50, 4501-4503.

Schuitmaker J.J., P. Baas, H.L.L.M. van Leengoed, F.W. van der Meulen, W.M. Star, N. van Zandwijk (1996) Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 34, 3-12.

Sinclair P.R., S. Granick (1975) Heme control on the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in cultured chick embryo liver cells, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 244, 509-520.

Smith A. (1987) Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins: role of porphyrin-protein interactions. *Ann. NY Acad.Sci.*, 514, 309-322.

Spikes J.D. (1992) Quantum yield and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, photofrin II, tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and uroporphyrin. *Photochem.Photobiol.*, 55, 797-808.

Strechtye G., K. Berg, J. Moan (1994) Photomodification of ALA-induced protoporphyrin IX in cells in vitro. In: *Photodynamic therapy of cancer II*. D. Brault, G. Jori, J. Moan, B. Ehrenberg (eds.) *Proc. SPIE.*, 2325, 58-65.

Stummer W., H. Stepp, S. Stocker, R. Baumgartner (1996) Intra-operative fluorescence detection of human malignant glioma by 5-ALA induced protoporphyrin: first clinical experience. 6th IPA meeting, Abstract book.

Svanberg K., T. Andersson, D. Killander (1992) Photodynamic therapy of human skin malignancies and laser-induced fluorescence diagnostics utilizing Photofrin and delta-aminolevulinic acid. In: P. Spinelli, M.D. Fante, R. Marchesini. *Photodynamic therapy and biomedical lasers*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 449-452.

Svanberg K., T. Andersson, D. Killander, I. Wang, U. Stenram, S. Andersson-

Engels et al. (1994) Photodynamic therapy of nonmelanoma malignant tumors of the skin using topical δ -amino-levulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br.J.Dermatol.*, 130, 743-751.

Szeimies R.M., S. Karrer, A. Sauerwald, M. Landthaler (1996) Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study. *Dermatology*, 192, 246-251.

Szeimies R.M., T. Sassy, M. Landthaler (1994) Penetration potency of topically applied δ -aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem.Photobiol.*, 59, 73-76.

Voet D., J.G. Voet (1995) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 754.
Walters R.T., T.G. Gribble, H.C. Scharz (1963) Synthesis of haem in normal and leukemic leukocytes. *Nature*, 197, 1213-1214.

Warloe T., Q. Peng, J. Moan, H.L. Qvist, K.E. Giercksky (1992) Photochemotherapy of multiple basal cell carcinoma with endogenous porphyrins induced by topical application of 5-aminolevulinic acid. In: P. Spinelli, M.D. Fante, R. Marchesini (eds.) *Photodynamic therapy and biomedical lasers*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 449-453.

Warloe T., Q. Peng, H. Heyerdahl, J. Moan, H.B. Steen, K.E. Giercksky (1995) Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induced porphyrins and DMSO/EDTA for basal cell carcinoma. In: D.A.Cortese (ed.) *5th International Photodynamic Association Biennial Meeting*. Proc.SPIE, 2371, 226-235.

Wessels J.M., R. Sroka, P. Heil, H.K. Seidlitz (1993) Photodegradation of protoporphyrin-dimethylester in solution and in organized environments. *Int.J.Radiat.Biol.*, 64, 475-484.

Wilson B.D., T.S. Mang, H. Stoll, C. Jones, M. Cooper, T.J. Dougherty (1992) Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. *Arch.Dermatol.*, 128, 1597-1601.

Wolf P., R. Fink-Puches, A. Reimann-Weber, H. Kerl (1996) Site and surface fluorescence-dependent response of solar keratoses to topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) by UVA and/or different wavebands of visible bands. *Photochem.Photobiol.*, 63, 22S.

Wolf P., E. Rieger, H. Kerl (1993) Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid. *J.Am.Acad.Dermatol.*,

SUMMARY

7. ENDOGENOUS SENSITIZERS IN PHOTSENSITIZED TUMOUR THERAPY

The natural porphyrin, heme, is synthesized in every energy-producing cell and is the prosthetic group for hemoglobin, myoglobin and other hemoproteins. 5-Aminolevulinic acid (ALA) is a precursor of protoporphyrin IX (Pp IX) in the biosynthetic pathway for heme. Almost all types of cells of the human body, with the exception of mature red blood cells, are equipped with machinery to synthesize heme. In the first step of heme biosynthetic pathway (Fig.7.1. The heme biosynthetic pathway) ALA is formed from glycine and succinyl CoA. This step is under a negative feedback control by heme. The last step in the formation of heme is the incorporation of iron into PpIX and takes place in the mitochondria under the action of the enzyme, ferrochelatase. The addition of excess of exogenous ALA can bypass the negative feedback control and excessive amounts PpIX may accumulate because of the limited capacity of ferrochelatase. The activity of the enzyme porphobilinogen deaminase (PBGD), another enzyme active in heme synthesis, is higher in some tumours (Smith, 1987) while that of ferrochelatase is lower (El-Sharabasy et al., 1992), so that PpIX accumulates with some degree of selectivity in tumours. Because PpIX is an efficient photosensitizer, ALA has been extensively studied as a prodrug for the endogenous production and accumulation of PpIX in cancerous tissue and has been introduced as a photosensitizer for clinical PTT (Kennedy et al., 1990; Kenedy and Pottier, 1992). The tumour selectivity of ALA is influenced by a number of factors, including increased permeability of abnormal keratin, increased levels of porphobilinogen deaminase, decreased levels of iron and decreased activity of ferrochelatase in the tumour cells.

5-ALA is applied topically or systemically in PTT of skin tumours as well as in diagnostic evaluations of tumours of skin, bladder, gastrointestinal tract and lung (Regula et al., 1995; Kriegmair et al., 1996) The ALA is hydrophilic and does not easily penetrate through the skin (Goff et al., 1992) or cell membranes. Rather high concentrations are needed to induce sufficient PpIX levels for therapeutic purposes. Therefore number of lipophilic ALA derivatives – methyl-, ethyl-, propyl-, hexyl-, heptyl- and octyl-esters – are studied. Esters are more lipophilic and penetrate more

easily into cells and deeper into tumours than ALA itself (Peng et al., 1996). The esterase activity in cells and tissues leads to the formation of ALA.

Phototransformations of endogenous PpIX in cells. Photomodification of the sensitizer is an important factor to be considered in clinical PTT. It can be taken advantage of to calculate the appropriate light exposures and to choose relevant exposure regimens. PpIX is one of the most photolabile sensitizers (Gudgin Dickson and Pottier, 1995). Several photoproducts with absorption in the red spectral region have been detected after light exposure of PpIX in organic solvents, in cell cultures and in tissue *in vivo* (Konig et al., 1993; Wessels et al., 1993; Robinson et al., 1998).

The phototransformations of ALA-induced PpIX in human adenocarcinoma cells of the line WiDr were investigated. To induce production of PpIX the cells were incubated with different concentrations of ALA (Fig. 7.2. ALA-induced PpIX production). The amount of produced PpIX increases with increasing concentration of ALA up to 1 mM (Strečkyte et al., 1994).

Illumination of cells with red light (635 nm) resulted in a decay of the fluorescence of PpIX accompanied by the appearance of a spectral band around 675 nm (Fig.7.3. Fluorescence spectra of PpIX in a suspension of cells measured before (spectrum 1) and after (spectra 2 and 3) light exposure at 635 nm (fluence 43 J/cm²). Excitation wavelength was 407 nm for spectra 1 and 2, and 450 nm for spectrum 3). The ratio between the initial emission bands of PpIX and the band at 675 nm varied significantly with the excitation wavelength.

The fluorescence excitation monitored at 740 nm also revealed a band at 670 nm (Fig. 7.4. Fluorescence excitation spectra of PpIX in a suspension of cells measured at different emission wavelengths before (spectrum 1) and after (spectra 2–4) light exposure at 635 nm (fluence 39 J/cm²) (Bagdonas et al., 2000).

These spectral changes arise from a few possible photooxidation pathways. The process proceeds via the excited triplet state of porphyrins and depends on concentration of oxygen, and is probably caused by the formation of singlet oxygen (Aveline et al., 1988). The photoreaction in the presence of oxygen results in the formation of a mixture of isomeric hydroxyaldehydes, called “photoporphyrins” (Inhoffen et al., 1969). Hydroxyaldehyde product isomers arise from cycloaddition of singlet oxygen to one of the two vinyl groups of protoporphyrin and reduction of an adjacent double bond (Cox and Whitten, 1982).

The light-induced fluorescence decay clearly indicates that protoporphyrin macrocycle is being degraded (Fig.7.5. Decay of the fluorescence of ALA-induced PpIX in cells. Fluorescence intensity registered with excitation wavelength of 413 nm and emission wavelength of 635 nm. Concentration of ALA 0.2 mM (open symbols) and 1 mM (filled symbols)).

Singlet oxygen seems to be involved in the photoporphyrin formation. The efficiency of photoproduct formation was measured in cells suspended in phosphate buffered solution made of either D₂O or H₂O. The lifetime of ¹O₂ is approximately 13-fold greater in D₂O than in H₂O (Gorman and Rodgers, 1989). As is seen in Fig.7.6 (Kinetics of photoporphyrin formation. Fluorescence intensity registered with excitation wavelength of 445 nm and emission wavelength 670 nm. Cells were incubated with 1 mM ALA) the formation of photoproduct in phosphate buffered solution made of D₂O is more efficient (Strečkyte et al., 1994). Therefore it can be concluded that photoporphyrin formation is at least partly due to the formation of singlet oxygen.

Since many porphyrins appear to be photodegraded in reactions mediated by self-generated singlet oxygen (Krieg and Whitten, 1984 a, b; Cox and Whitten, 1982; Krasnovskij et al., 1982), it was of interest to compare the photoinduced decay of PpIX in cell suspension bubbled with N₂ and in air saturated suspension. The photodegradation at low oxygen concentration is significantly slower than in air saturated conditions (Fig.7.7. Decay of the fluorescence of ALA-induced PpIX in cells. Fluorescence intensity registered with excitation wavelength of 413 nm and emission wavelength 635 nm. The cells were incubated with 1 mM ALA) (Strečkyte et al., 1994). This suggests that photooxidation reactions are suppressed in environment unfavorable for ¹O₂ production.

The fluorescence decay rate of PpIX in cells during light exposure depended on the initial concentration of PpIX (Fig.7.8. Decay of PpIX fluorescence in suspension of cells. Cells were incubated with different ALA concentrations and exposed to 635 nm light. Fluorescence intensity was measured at the main peak 635 nm under excitation at 407 nm.) (Bagdonas et al., 2000).

To evaluate the formation of the main photoproduct, the fluorescence recorded after exposure was corrected for PpIX fluorescence bleaching according the formula (7.1). The kinetics obtained followed different patterns for the different ALA concentrations (Fig.7.9. Fluorescence kinetics of the photoproduct in a suspension of cells during 635 nm exposure. Fluorescence was measured at 675 nm under excitation at 407

nm. Cells were incubated with 0.1 mM (a) and 1 mM (b) ALA). The curve of the fluorescence intensity changes for the lower ALA concentration showed a steady increase during irradiation, while that of the changes of the fluorescence intensity at the highest ALA concentration revealed a maximum followed by a subsequent decay. For the evaluation of the further phototransformations of photoporphyrin, this photoproduct was selectively bleached with different wavelengths. The analysis of fluorescence spectra (Fig.7.10. Fluorescence spectra of PpIX recorded after light exposure at 635nm (curve 1) and subsequent exposure at 670nm (curve 2). Excitation wavelength was 450 nm. Difference spectra (b) reflects spectroscopic changes resulted by the formation of the photoproducts) demonstrated that phototransformation of PpIX in cells is complex process: during illumination not only photoporphyrin (Fig.7.10 b, curve 3) but also another photoproduct with a maximum around 650 nm is formed (Fig.7.10 b, curve 2) (Bagdonas et al., 2000).

Spectroscopic properties of ALA-induced PpIX in normal mouse skin.

ALA can be applied topically or systemically for PTT of skin and other tumours. It can be also used for diagnostic evaluation of tumours of skin, bladder, gastrointestinal tract and lung. Frequently, ALA is administered systemically and the concentration of produced endogenous PpIX reaches a maximum in various tissues within 1-6 h after administration of ALA. The ALA can also be administered topically in an ointment applied directly on the lesion. The penetration of ALA molecules through the skin can be enhanced using penetration enhancers which would facilitate the treatment of deeper lesions (Malik et al., 1995; Peng et al., 1995).

An important advantage of using ALA or some of its derivatives is that the photosensitizing effect of the ALA-induced PpIX on skin does not remain much longer than 48 hours and thus the patients do not suffer from prolonged skin sensitivity (Kennedy and Pottier, 1992). PpIX also accumulates in tumour tissue to a greater extent than most other sensitizers, minimizing damage to normal surrounding tissues during treatment (Peng et al., 1997).

Molecules of topically applied ALA have to diffuse through the skin and tissues and then be transported through the membranes into the cells. Nodular skin tumours are refractive to topical ALA-PTT because ALA does not penetrate to their base. A number of lipophilic ALA ester derivatives were studied since these may penetrate more easily and deeper into tumours than ALA itself (Peng et al, 1996).

The PpIX kinetics in nude mice skin, generated by topical application of

ALA and ALA methyl ester (ALA-Me) were studied (Juzenas et al., 1999 a; Juzenas et al., 1999 b).

Normal skin of nude mice was treated topically with ALA and ALA-Me for 24 hours. Approximately 0.1 gram of freshly prepared cream was applied to a spot of 1 cm² on the flank of the mice, which was then covered with a transparent dressing. The ALA induced PpIX was studied by means of a noninvasive fibre-optic fluorescence probe connected to a luminescence spectrometer. For the first hour a slight lag in PpIX production was observed for the mice treated with ALA-Me compared to the mice treated with ALA (Fig.7.12. Mean initial PpIX fluorescence dependence on time after topical application of ALA and ALA-Me on normal nude mice skin). This could be due to the fact that ALA esters needs some time to be converted into ALA before it can be used in the heme synthetic pathway (Kloek et al., 1998). After approximately 12 hours the ALA and the ALA-Me-treated mice showed the same PpIX fluorescence intensity.

It was also observed a systemic effect in the mice 6-8 hours after starting topical application of the 20% ALA cream: the skin of the whole mouse was fluorescing when illuminated with a UV lamp (Fig. 7.13. PpIX fluorescence in nude mice skin after continuously topical application of (1) 20% ALA cream and (2) 20% ALA-Me cream for 8 hours). On the other hand, even after 24 hours of continuously topical application of ALA-Me cream, PpIX fluorescence could be found only in the spot where ALA-Me cream had been applied (Fig. 7.13 (2). Studies in humans also indicate that ALA-Me accumulates more selectively in the lesions than ALA (Fritsch et al., 1998).

ALA-induced PpIX in mouse skin is photolabile. Under illumination with red light (635 nm) photobleaching of PpIX and formation of photoproduct is observed (Fig. 7.14. Decay of PpIX fluorescence under illumination (635 nm; 100 mW/cm²). Excitation wavelength was 407 nm). (Juzenas et al., 1999 a). Fluorescence kinetics indicates fast photobleaching of PpIX and formation of photoproduct (Fig.7.15. Kinetics of PpIX fluorescence decay and photoproduct formation in mouse skin under illumination (635 nm; 100 mW/cm²). Excitation wavelength was 407 nm).

The readiness with which ALA-induced PpIX is photobleached may be advantageous for PTT. Since the photosensitizer is photobleached so early in the course of the treatment that normal tissue experience no more damage from large light dose, it is possible to choose such a sensitizer doses and light exposures that tumour tissue is destroyed while normal tissue is undamaged.

ALA-based PTT: clinical trials. In 1990 the first report on the successful treatment of basal cell carcinoma (BCC) using topical ALA-PTT appeared (Kennedy et al., 1990). ALA-PTT is now widely applied in the treatment of cutaneous tumours. During the past few years many articles have reported the use of topically ALA-based PTT for the treatment of primary nonmelanoma skin tumours (Warloe et al., 1992; Svanberg et al., 1992; Svanberg et al., 1994; Wolf et al., 1993; Cairnduff et al., 1994; Calzavara-Pinton P.G., 1995; Fijan et al., 1995;).

In a total of 826 superficial skin basal cell carcinomas treated with topically ALA-PTT in nine hospitals in Europe and Canada the weighted average rates of complete response, partial response, and no response were 87%, 5% and 8% respectively. In addition, promising clinical results have been obtained for a variety of skin superficial malignant and nonmalignant lesions such as squamous cell carcinoma, Bowen's disease, psoriasis, etc. (Peng et al., 1997).

Generally, PTT with topical application of ALA has several potential advantages over conventional treatments: it is noninvasive, convenient and well tolerated by patients; can be applied repeatedly; and produces excellent cosmetic results regardless of lesion size.

A preferential accumulation of ALA-induced porphyrins in cancerous cells provides the possibility of photodetection of the porphyrin fluorescence in tumour cells. Detection can be performed by means of fiberoptic point monitoring systems or of fluorescence imaging systems after topical, local internal or systemic administration of ALA. A sharply marked red fluorescence induced by ALA in the urothelial carcinoma after intravesical instillation of a pH-neutral 3% ALA for 2-3 hours were observed (Kriegmair et al., 1994; Kriegmair et al., 1995). ALA-induced porphyrin fluorescence may also be used for photodetection of early-stage lung carcinoma and malignant glioma (Peng et al., 1997).

References

- Aveline B., O. Delgado, D. Brault (1988) *J.Chem.Soc.Faraday Trans.*, 88, 1971-1976.
- Bagdonas S., L.-W. Ma, V. Iani, R. Rotomskis, P. Juzenas, J. Moan (2000) *Photochem.Photobiol.*, 72, 186-192.

- Cairnduff F., M.R. Stringer, E.J. Hudson, D.V. Ash, S.B. Brown (1994) *Br.J.Cancer*, 69, 605-608.
- Calzavara-Pinton P.G. (1995) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 29, 53-57.
- Cox G.S., D.G. Whitten (1982) *J.Am.Chem.Soc.*, 104, 516-521.
- El-Sharabasy M.M.H., A.M. El-Wassel, M.M. Hafez, S.A. Salim (1992) *Br.J.Cancer*, 65, 409-412.
- Fijan S., H. Honigsmann, B. Ortel (1995) *Br.J.Dermatol.*, 133, 282-288.
- Fritsch C., B. Homey, W. Stahl et al. (1998) *Photochem.Photobiol.*, 68, 218.
- Goff B.A., A.R. Bachor, N. Kollias, T. Hasan (1992) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 15, 239-251.
- Gorman A.A., M.A.J. Rodgers (1989) In: *Handbook of organic photochemistry*, II, 229-247.
- Gudgin Dickson E.F., R.H. Pottier (1995) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 29, 91-93.
- Inhoffen H.H., H.Jr. Brockmann, K.-M. Bliesener (1969) *Liebigs Annalen der Chemie*, 730, 173-185.
- Juzėnas P., S. Bagdonas, G. Streckytė, J. Moan, R. Rotomskis (1999 a) *Medicina*, 35, 189-195.
- Juzėnas P., R. Sorensen, V. Iani, J. Moan (1999 b) In: *Photochemotherapy of cancer and other diseases. Proc. SPIE*, 3563, P. 161.
- Kennedy J.C., R.H. Pottier, D.C. Pross (1990) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 6, 143-148.
- Kennedy J.C., R.H. Pottier (1992) *J.Photochem. Photobiol.B:Biol.*, 14, 275-292.
- Kloek J., W. Akkermans, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen (1998) *Photochem. Photobiol.*, 67, 150-154.
- Krasnovskij Jr., A.A., Ye.A. Venediktov, O.M. Chernenko (1982) *Biophysics*, 27, 1009-1016.
- Krieg M., D.G. Whitten (1984a) *J.Am.Chem Soc.*, 106, 2477-2479.
- Krieg M., D.G. Whitten (1984b) *J.Photochem.*, 25, 235-252.
- Kriegmair M., H. Stepp, P. Steinbach, W. Lumper, A. Ehsan, H.G. Stepp et al. (1994) *Urology*, 44, 836-841.
- Kriegmair M., H. Stepp, P. Steinbach, W. Lumper, A. Ehsan, H.G. Stepp (1995) *Urol.Int.*, 55, 190-196.

Kriegmair M., R. Baumgartner, R. Knuechel, H. Stepp, F. Hofstadter, A. Hofstadter (1996) *J.Urol.*, 155, 105-110.

Konig K., H. Schneckenburger, A. Ruck, R. Steiner (1993) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 18, 287-290.

Malik Z., G. Kostenich, L. Roitman (1995) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, V. 28, P. 213.

Peng Q., K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J.M. Nesland (1997) *Photochem.Photobiol.*, 65, 235-251.

Peng Q., J. Moan, T. Warloe, V. Iani, H.B. Steen, A. Bjorseth, J.M. Nesland (1996) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 34, 95-96.

Peng Q., T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K.-E. Giercksky, J.M. Nesland (1997) *Cancer*, 79, 2282-2308.

Peng Q., T. Warloe, J. Moan, H. Heyerdal, H. Steen, J.M. Nesland et al. (1995) *Photochem.Photobiol.*, 62, 906-913.

Regula J., A.J. MacRobert, A. Gorchein, G.A. Buonaccorsi, S.M. Thorpe, G.M. Spencer et al. (1995) *Gut.*, 36, 67-75.

Robinson D.J., H.S. de Bruijn, N.van der Veen, M.R. Stringer, S.B. Brown, W.M. Star (1998) *Photochem.Photobiol.*, 67,140-149.

Smith A. (1987) *Ann. NY Acad.Sci.*, 514, 309-322.

Streckyte G., K. Berg, J. Moan (1994) In: *Photodynamic therapy of cancer II. Proc. SPIE*, 2325, 58-65.

Svanberg K., T. Andersson, D. Killander (1992) In: *Photodynamic therapy and biomedical lasers*, 449-452.

Svanberg K., T. Andersson, D. Killander, I. Wang, U. Stenram, S. Andersson-Engels et al. (1994) *Br.J.Dermatol.*, 130, 743-751.

Warloe T., Q. Peng, J. Moan, H.L. Qvist, K.E. Giercksky (1992) In: *Photodynamic therapy and biomedical lasers*, 449-453.

Wessels J.M., R. Sroka, P. Heil, H.K. Seidlitz (1993) *Int.J.Radiat.Biol.*, 64, 475-484.

Wolf P., E. Rieger, H. Kerl (1993) *J.Am.Acad.Dermatol.*, 28, 17-21.