

6. SENSIBILIZATORIŲ FOTOSTABILUMAS BEI FOTOTRANSFORMACIJOS IR JŲ REIKŠMĖ FOTOTERAPINĖMS DOZĖMS

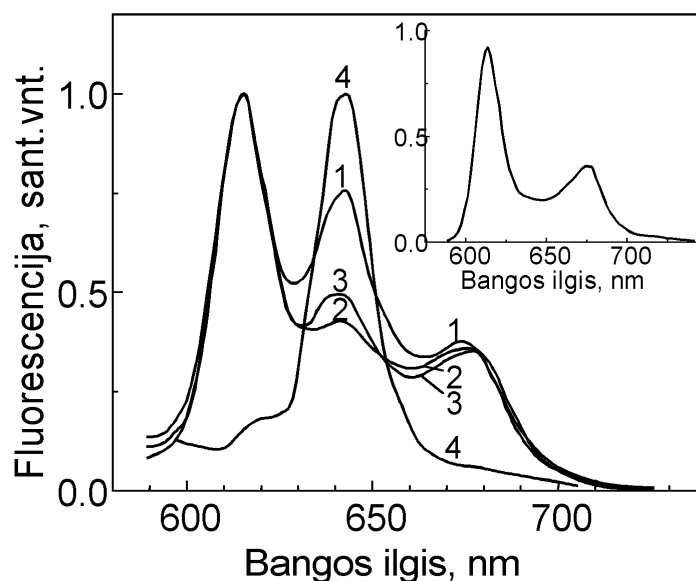
Žmonija jau seniai sprendžia įvairių dažiklių ir pigmentų fotostabilumo problemą. Ir chemikai, ir dailininkai dar viduramžiais stengėsi įminti dažų patvarumo mįslę, tikėdamiesi ateities kartoms palikti neblunkančius audinius ir paveikslus.

Fotosensibilizuotoje navikų terapijoje buvo tiek daug kitų problemų, kad į sensibilizatorių fotostabilumą dėmesys atkreiptas tik pastaraisiais metais, nors šis parametras yra labai svarbus vertinant jų efektyvumą FNT. Fotosensibilizatoriui yrant švitinimo metu mažėja sugeriamos šviesos kiekis, bet sensibilizatoriaus irimas FNT metu gali būti ir trūkumas, ir privalumas. Jei jis suyra labai greitai, naviko destrukcija bus nepakankama. Tačiau, tinkamai parinkus sensibilizatoriaus koncentracijas ir švitinimo dozes, galima padidinti FNT efektyvumą ir kartu maksimaliai apsaugoti aplinkinius sveikus audinius nuo pažeidimų. Sensibilizatorių fotostabilumas – esminis parametras parenkant gydymui tinkamiausias sensibilizatorių ir švitinimo dozes. Svarbią reikšmę turi ir švitinimo metu susidarantys fotoproduktai, nes jie gali turėti įtakos FNT efektyvumui: jeigu susiformavę fotoproduktai sugeria švitinimui naudojamą spinduliuotę ir pasižymi sensibilizaciniu aktyvumu, jie taip pat gali inicijuoti navikų suirimą.

6.1. Pirmosios kartos sensibilizatorių fotostabilumo tyrimai

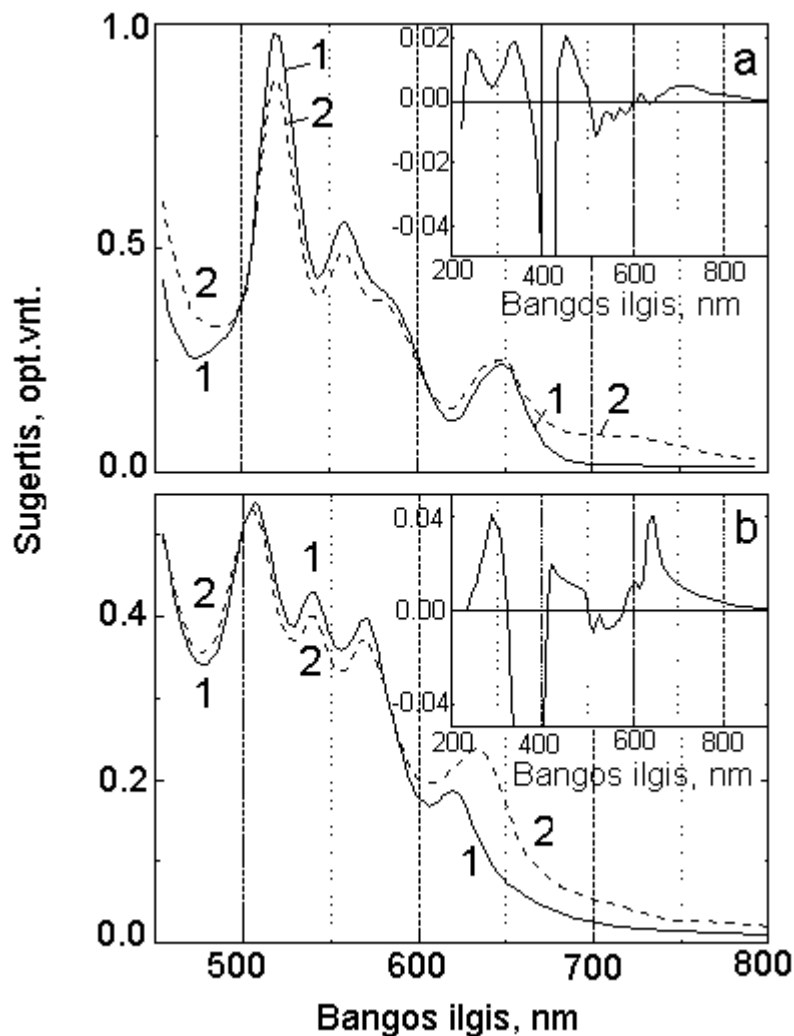
Pirmas pastebėtas reiškinys, paskatinęs tolesnius fotostabilumo tyrimus, buvo ląstelėse susikaupusio HpD fluorescencijos juostų blukimas (Moan, 1986). Vėliau toks blukimas buvo užregistruotas ir fotosensibilizuotame navikiniame audinyje (Mang ir kt., 1987).

Pradiniai porfirino tipo sensibilizatorių vandeniniuose tirpaluose fotostabilumo tyrimai parodė, kad švitinimo metu ne tik blunka fluorescencijos ir sugerties juostos, bet ir formuojasi naujos tiek fluorescencijos, tiek sugerties juostos (6.1 ir 6.2 pav.) (Rotomskienė ir kt., 1988; Rotomskis ir kt., 1996).



6.1 pav. Hp fluorescencijos spektrai. $C_{Hp} = 10^{-4}$ M. Tirpalas švitintas 300 min. Ar jonų lazerio spinduliuote ($\lambda = 514$ nm; intensyvumas 100 mW/cm^2): 1 kreivė - $\lambda_{\text{žad}} = 495$ nm; 2 kreivė - $\lambda_{\text{žad}} = 510$ nm; 3 kreivė - $\lambda_{\text{žad}} = 500$ nm. Chromatografiškai išskirto fotoproducto fluorescencijos spektras (4 kreivė): $\lambda_{\text{žad}} = 495$ nm; tirpiklis – CH_3OH . Intarpas: nešvitinto Hp tirpalo fluorescencijos spektras ($\lambda_{\text{žad}} = 495$ nm)

Skirtuminiuose spektruose matomas sugerties padidėjimas 240-320 nm srityje ir ties 640 nm bei porfirininių pigmentų sugerties juostų blukimas (6.2 pav.) (Rotomskienė ir kt., 1989; Rotomskis ir kt., 1996). Švitinimo metu spektre atsirandanti nauja juosta atspindi raudonos spektro srities šviesą sugeriančio fotoproducto susidarymą (Rotomskienė ir kt., 1988). Išsamūs chromatografiniai tyrimai ir atskirų frakcijų sugerties, fluorescencijos bei fluorescencijos žadinimo spektrų analizė parodė, kad, švitinant porfirino tipo fotosensibilizatorius FNT naudojamomis švitinimo dozėmis, fotosensibilizatorius suyra į kelių rūšių fotoproductus (Rotomskienė ir kt., 1990; Rotomskis ir kt., 1997a). Sugerties padidėjimas ties 240-340 nm rodo (6.2 pav.), kad porfirino makrociklas švitinimo metu suskyla į nedidelius darinius, sugeriančius šviesą UV spektro srityje. Tie dariniai gali būti atskiri porfirino molekulę sudarantys pirolų žiedai ar jų junginiai.

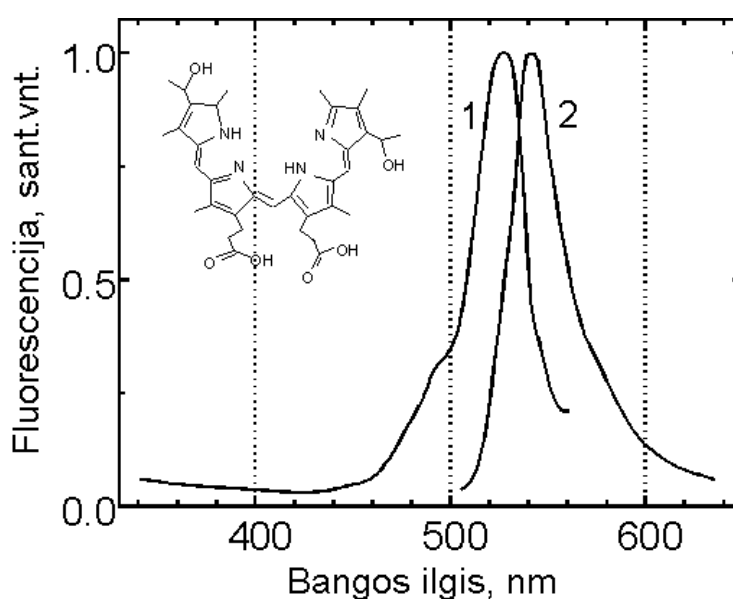


6.2 pav. Nešvitintų (1) ir švitintų (2) porfirinų tirpalų sugerties spektrai ($C = 10^{-4}$ M; pH 7,1): (a) TPPS₄ (švitinta 205 min. Ar jonų lazerio spinduliuote, intensyvumas 50 mW/cm²); (b) HpD (švitinta 100 min., intensyvumas 100 mW/cm²). Intarpai: skirtuminiai sugerties spektrai (iš švitinto tirpalo spektro atimtas nešvitinto): (a) TPPS₄ ($C = 3 \cdot 10^{-6}$ M); (b) Hp ($C = 10^{-5}$ M)

Sugerties padidėjimą ties 640–660 nm sąlygoja chlorino ir bakteriochlorino kilmės pigmentų susidarymas švitinimo metu. Tokie produktai jau buvo gauti oksiduojant ir/arba redukuojant porfirino tipo pigmentus chemiškai arba šviesa, tirpale esant specifiniams oksidatoriams ar reduktoriams. Manoma, kad švitinimo metu redukuojamos dvigubos jungtys porfirino ciklo 3–4 ir 7–8 padėtyse (Smith, 1975). Tiesa, panašūs spektriniai pokyčiai buvo matomi ir protoporfirino tirpaluose, tačiau fotoprotoporfirino susidarymas šiuo atveju aiškinamas specifine deguonies sąveika su porfirino makrociklo šoninėmis grupėmis, kuriose suardomos dvigubos vinilo grupių jungtys ir susidaro ciklas, įjungiantis deguonies molekulę (Inhoffen ir kt., 1969; Cox ir Whitten, 1982).

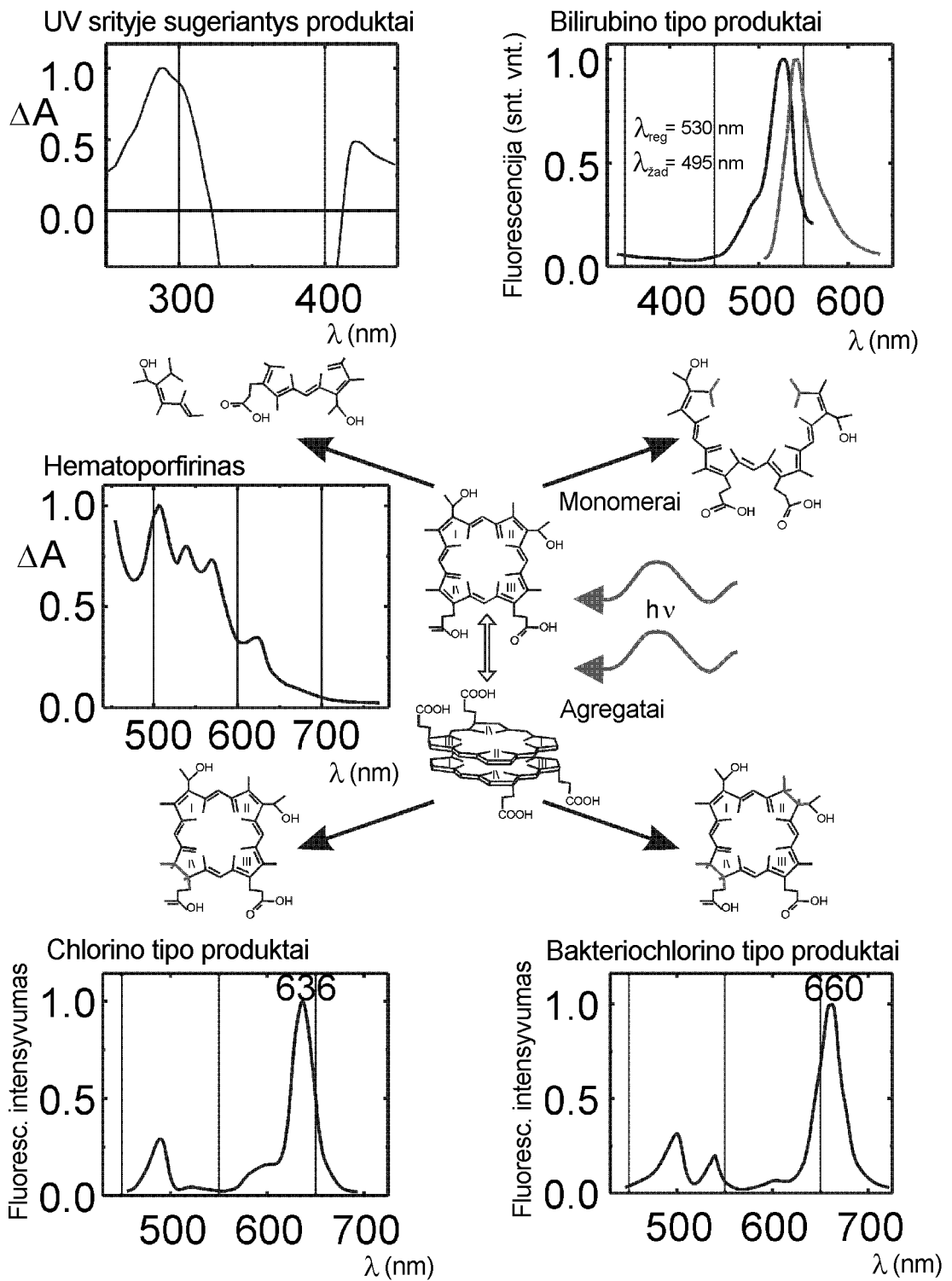
Hematoporfirino ir kitų tirtų porfirino tipo molekulių fototransformacijų tiesiogiai paaiškinti šiuo modeliu neįmanoma, kadangi jų šoniniai pakaitai neturi vinilo grupių, tad fototransformacija galima tik per tarpines stadijas.

Atidžiai ištyrus iš švitintų porfirinų tirpalų chromatografiškai išskirtas frakcijas paaiškėjo, kad egzistuoja ir trečias fotoproduktas, panašus į bilirubino tipo pigmentus (6.3 pav.) (Rotomskis ir kt., 1997a). Šie pigmentai yra labai nestabilūs, egzistuoja tik trumpą laiką ir greitai suyra į UV srityje šviesą sugeriančias atskirų pirolų žiedų kombinacijas. Bilirubino tipo pigmentai susidaro vienoje vietoje nutrūkus porfirino ciklui ir iš jo susiformavus atvirai keturių pirolų žiedų grandinėlei.



6.3 pav. Bilirubino tipo pigmentų fluorescencijos žadinimo spektras, registruotas ties 545 nm (1), ir fluorescencijos spektras ($\lambda_{\text{žad}}=495$ nm) (2)

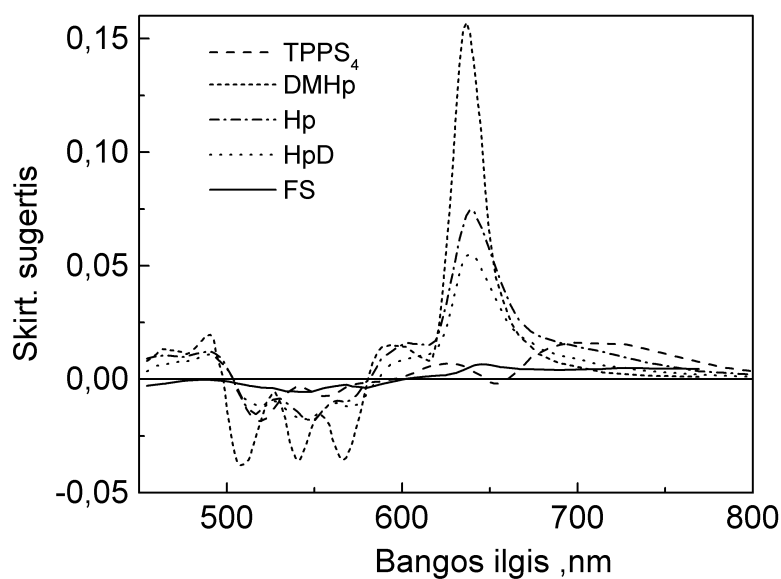
Kaip žinoma, porfirinai vandeniniuose tirpaluose sudaro agreguotus darinius (4 skyrius). Skirtingo agreguotumo laipsnio porfirinus šviesa modifikuoja skirtingai. Atlikti tyrimai parodė, kad monomerinės porfirinų formos dažniausiai modifikuojamos į UV srityje šviesą sugeriančius fotoproduktus, o agregatai linkę modifikuoti į chlorino ar bakteriochlorino tipo fotoproduktus (Rotomskis ir kt., 1996). Apibendrinta švitinimo metu susidarančių fotoproduktų schema ir juos atitinkantys spektrai pateikti 6.4 paveiksle.



6.4 pav. Porfirino tipo pigmentų švitinimo matoma šviesa metu susidarantys fotoproduktai

FNT naudojami porfirino tipo fotosensibilizatoriai turi skirtingus šoninius pakaitus, kurių prigimtis nulemia tiek skirtingą jų kaupimąsi navikiniuose audiniuose, tiek

ir skirtingą sensibilizacinį aktyvumą. Natūralu tikėtis, kad jų fotostabilumas irgi bus skirtingas ir švitinant tomis pačiomis šviesos dozėmis susidarys skirtingi fotoproduktų kiekiai. Įvairių porfirino tipo sensibilizatorių skirtuminiai sugerties spektrai pavaizduoti 6.5 paveiksle. Kaip matyti, švitinimo metu dimetoksihematoporfirino (DMHp) tirpale susidaro didžiausias kiekis chlorino tipo fotoproduktų, o mezo-tetrafenil-tetrasulfonatporfino (TPPS₄) molekulė, neturinti pirolo žieduose šoninių pakaitų, fotomodifikuojasi mažiausiai.



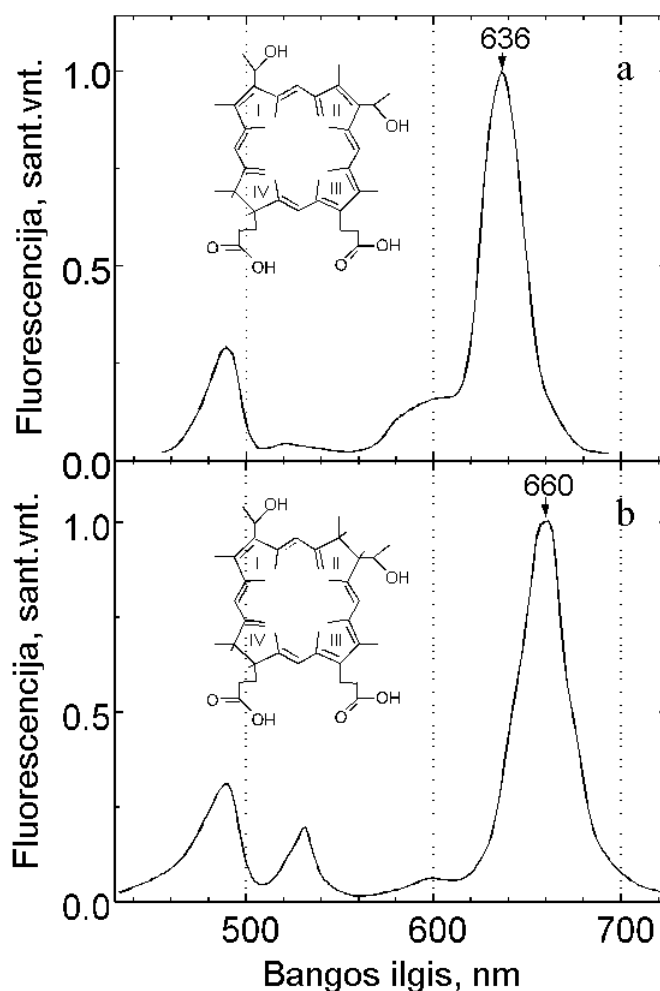
6.5 pav. Švitintų porfirinų tirpalų skirtuminiai sugerties spektrai. Tirpalų koncentracija 10^{-4} M, pH 7,2. Švitinimo dozės: TPPS₄ – 90 J, Hp – 150 J, DMHp, HpD, FS – 120 J

Švitinimo metu vykstanti sensibilizatorių destrukcija mažina fotosensibilizacinį efektą, nes suyrant sensibilizatoriui sugeriamas vis mažesnis šviesos kvantų kiekis ir inicijuojama vis mažiau navikinių audinių suirimą užtikrinančių fotodinaminių aktų. Jeigu švitinimo metu susidaro fotoproduktai, gali iš esmės pasikeisti fotosensibilizacijos eiga ir efektyvumas. UV šviesą sugeriančių fotoproduktų formavimasis didelės įtakos sensibilizaciniam efektui neturėtų daryti. Dėl jo mažėja fotosensibilizatoriaus koncentracija navikiniame audinyje, tačiau pats fotoproduktas nepaveikia sensibilizacijos, nes nesugeria FNT naudojamos matomos arba artimos infraraudonos šviesos. Šių fotoproduktų šalutinis poveikis galimas tik tuo atveju, jeigu jie yra toksiški biologiniam objektui.

Bilirubino tipo fotoproduktai yra labai nestabilūs, jų aptinkama maži kiekiai, jie

egzistuoja tik trumpą laiką ir labai greitai net ir tamsoje modifikuojasi į UV fotoproduktus, tad jie irgi nepaveikia fotosensibilizacinio proceso.

Situacija kitokia susidarant chlorino ir bakteriochlorino tipo fotoproduktams. Kaip matyti 6.6 paveiksle, šie fotoproduktai turi intensyvias sugerties juostas toje spektrinėje srityje, kuri FNT naudojama švitinimui. Tad švitinimo metu susidarę fotoproduktai gali sugerti šviesos kvantą ir inicijuoti papildomą fotosensibilizacinį vyksmą, padidinantį arba bent kompensuojantį pagrindinio sensibilizatoriaus destrukcijos sąlygotą terapinio efektyvumo sumažėjimą.

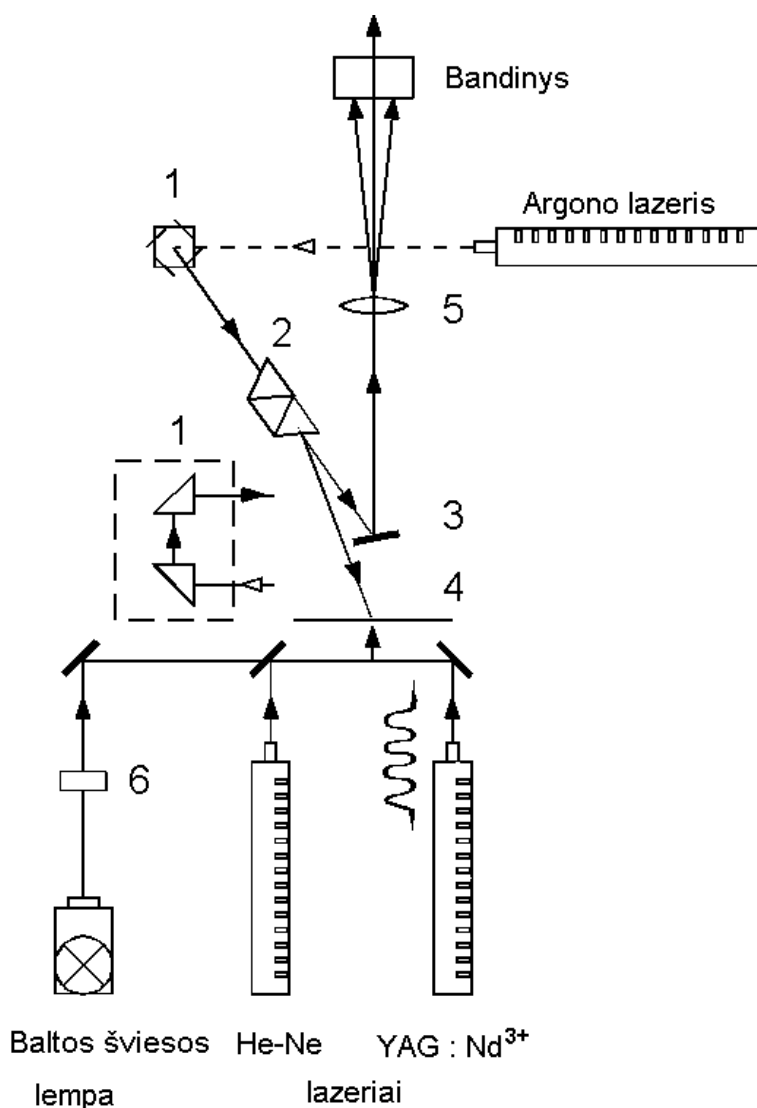


6.6 pav. Sumodeliuoti fotoproduktų sugerties spektrai

Yra žinoma, kad navikuose terpės pH vertės mažesnės nei normalių audinių (Wike-Hooley ir kt., 1984). Todėl porfirino tipo sensibilizatorių fotostabilumo priklausomybės nuo terpės pH tyrimai (ypač tirpaluose, kurių pH vertės (4÷8) atitinka esančias gyvuose organizmuose ar artimos joms) taip pat yra svarbūs nuodugnesniam šių

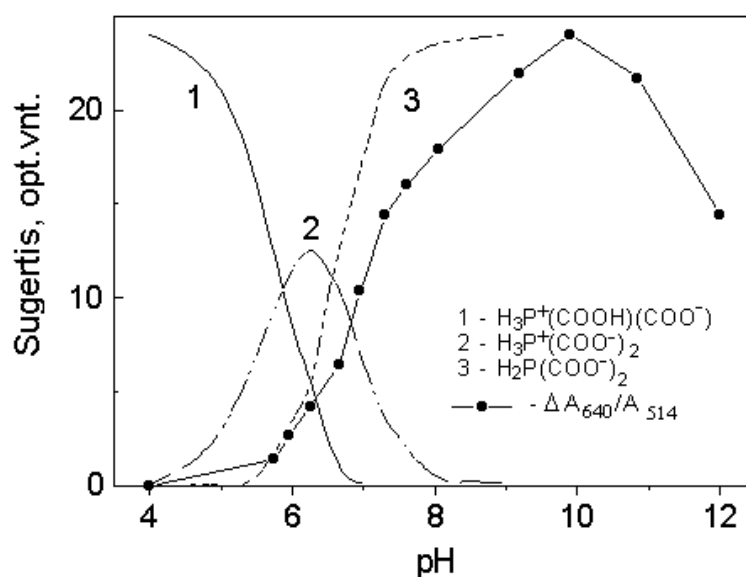
junginių sąlygotų vyksmų navikuose supratimui.

Nuostoviosios sugerties bei fluorescencijos spektroskopijos metodais ištyrėme Hp ir HpD, ištirpintų įvairaus rūgštingumo tirpaluose, fotovyksmus (Rotomskis ir kt., 1996). Tiriant Hp ir HpD fotostabilumą, tirpalai 10 mm pločio kvarcinėse kiuvetėse (bendras tirpalo tūris $V=2\text{ cm}^3$) švitinti nuolatinės veikos Ar jonų lazeriu ($\lambda=514\text{ nm}$). Tolydžiam 1 cm^2 ploto apšvietimui panaudotas lęšis, išfokusuojantis lazerio spindulį. Kritusios į kiuvetę šviesos galios tankis visų eksperimentų metu buvo $\approx 100\text{ mW/cm}^2$ (paklaidos neviršijo 5%). Švitinimo schema pavaizduota 6.7 paveiksle.



6.7 pav. Bandinių švitinimo schema: 1 – visiško atspindžio prizmės, 2 – dispersinė sistema, 3 – veidrodis, 4 – ekranas, 5 – glaudžiamieji lęšiai, 6 – vandens filtras

Tyrimai parodė, kad porfirino tipo sensibilizatorių fotomodifikacija priklauso nuo aplinkos pH. Įvairios porfirinų joninės formos, susidarančios tirpalo pH kintant nuo 4 iki 8, pasižymi skirtingu fotostabilumu ir fotoproduktų formavimosi efektyvumu. Teoriškai septynios Hp joninės formos gali susiformuoti kintant tirpalo pH (Pottier ir Kennedy, 1990). Tačiau tik keturios iš jų (di- ir mono- katijonai, neutrali molekulė ir dianijonas) buvo pastebėtos spektroskopiškai (Pottier ir Truscott, 1986). 6.8 paveiksle pavaizduoti hematoporfirino (Hp) joninių formų koncentracijų pokyčiai kintant pH nuo 4 iki 8.

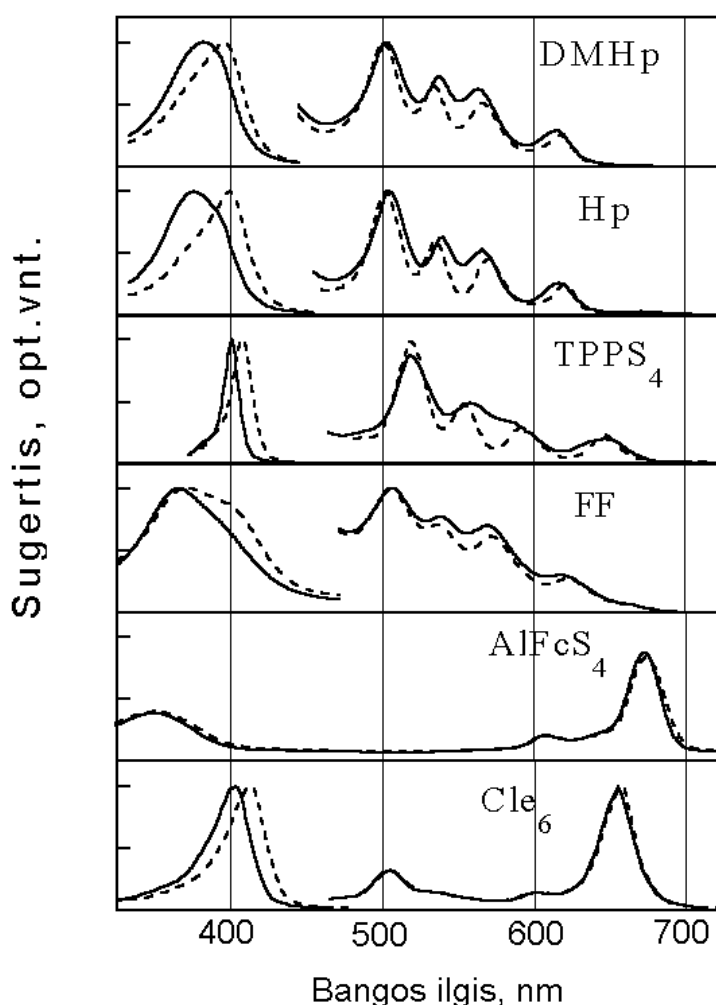


6.8 pav. Hp joninių formų pasiskirstymas vandeninėje terpėje (Pottier ir Kennedy, 1990) (1-3 kreivės) ir HpD fotoproducto susidarymo efektyvumo priklausomybė nuo pH

Kai aplinkos pH 4 – tirpale vyrauja neutrali Hp forma $H_3P^+(COOH)(COO^-)$, tad Hp fotostabilumą esant šiai pH vertei sąlygos šios formos fotomodifikacinės savybės. Didinant terpės pH matomas šios formos koncentracijos mažėjimas ir esant neutraliai terpei (pH 7) ji visiškai išnyksta, tiksliau, transformuojasi į monoanijoną $H_3P^+(COO^-)_2$ ir dianijoną $H_2P(COO^-)_2$. Hp fotomodifikacijos efektyvumo kitimo kreivė (6.8 pav.) rodo, kad esant rūgštinei terpei Hp yra stabilus. Kai $pH > 5,5$ ir tirpale pradeda vyrėti anijoninė Hp forma, ima formuotis chlorino tipo fotoproduktas. Jo susidarymo efektyvumo kreivė artima anijoninės formos atsiradimo kreivei. Taigi fotoproduktų formavimuisi didelės įtakos turi aplinkos pH. Jei sensibilizatorius susikaupęs skirtingą pH turinčiose ląstelių organelėse, jo fotomodifikacijos greitis jose bus skirtingas, ir švitinimo

laikas, būtinas visiškam naviko suardymui, skirtingoms mikrolokalizacijoms taip pat turėtų būti skirtingas.

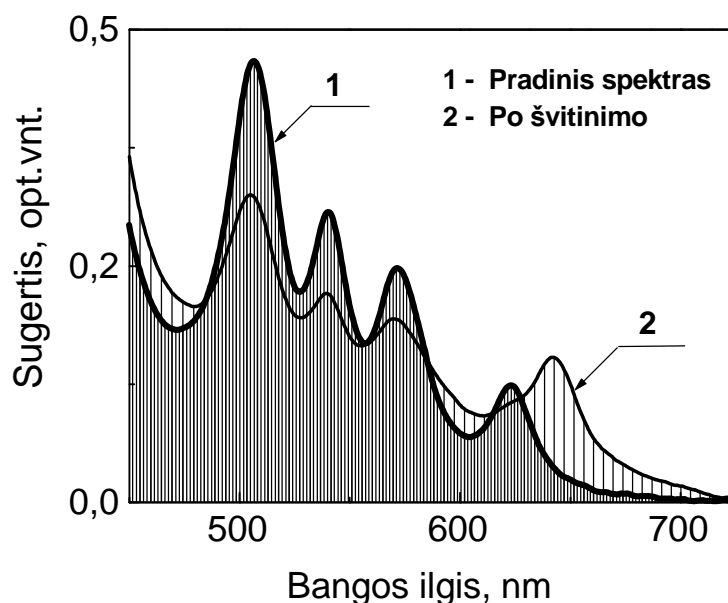
Porfirino tipo sensibilizatorių fotomodifikacijos vyksmai tirti vandeniniuose tirpaluose, kurie negali būti realios biologinės aplinkos modeliu. Biologiniuose audiniuose fotosensibilizatoriai gali pasiskirstyti ląstelių citoplazmoje, sąveikauti su baltymais arba įsikomponuoti į lipidines membranas. Aplinkos terpė gali turėti įtakos ne tik fotosensibilizaciniam vyksmui, bet ir keisti sensibilizatorių fotomodifikacijos procesą. Todėl buvo atlikti sensibilizatorių fotomodifikacijos tyrimai modelinėse sistemose (Jasaitis ir kt., 1996; Bagdonas ir kt., 1996). Pridėjus į vandeninį fotosensibilizatoriaus tirpalą žmogaus serumo albumino (HSA), matomi pokyčiai sensibilizatorių sugerties spektruose (6.9 pav.).



6.9 pav. Normuoti DMHp, Hp, TPPS₄, FF, AlFcS₄ ir Cle₆ vandeninių tirpalų be HSA (ištisinė linija) ir su HAS (trūki linija) spektrai. Sensibilizatoriaus ir HSA molinis santykis – 1:1

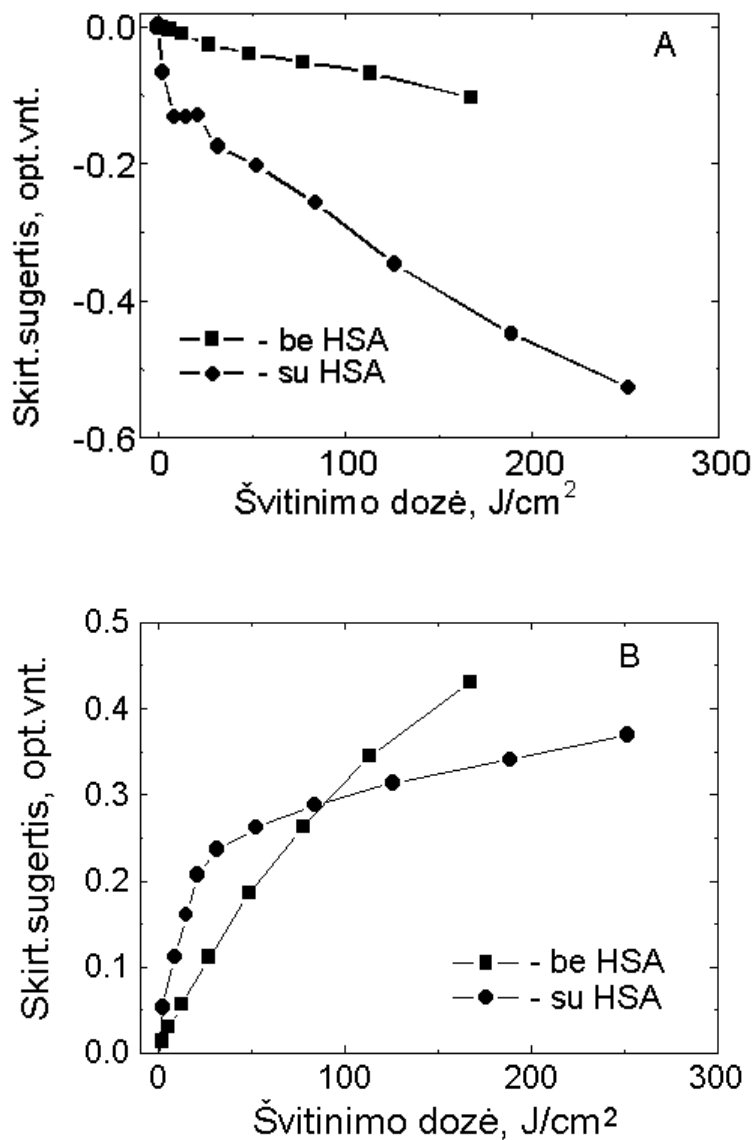
Pokyčius lemia sensibilizatoriaus sąveika su baltymu. Susidarant porfirino ir baltymo kompleksui keičiasi fotosensibilizatoriaus sugerties spektras, tad tikėtina, kad pasikeis ir porfirino fotomodifikacijų vyksmai, – mat baltyminė aplinka suardo agregatų ir monomerų pusiausvyrą.

Švitinant sensibilizatoriaus ir baltymo kompleksą matomi panašūs kaip ir vandeninėse terpėse fotomodifikacijų sąlygoti spektriniai pokyčiai (6.10 pav.).



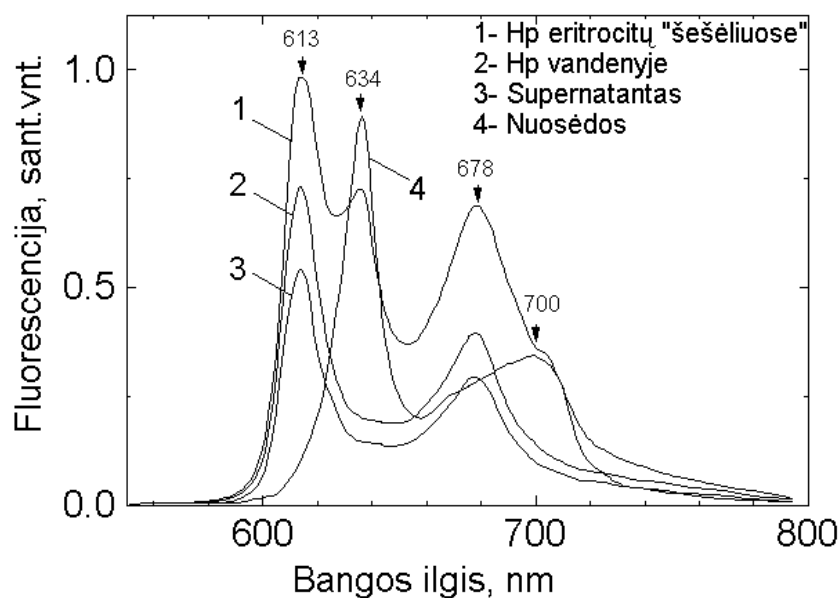
6.10 pav. Hp (koncentracija 10^{-4} M) ir HSA mišinio (moliniu santykiu 1:1) sugerties spektrai prieš ir po švitinimo

Regimosios spektro srities juostų intensyvumas silpnėja, o raudonoje spektro srityje ties 650 nm formuojasi chlorino tipo fotoproducto sugerties juosta. Lyginant Hp fotostabilumo kinetikas (6.11 pav.) matyti, kad Hp fotoblukimo ir fotoproducto formavimosi greitis baltyminėje aplinkoje pradinėje stadijoje yra didesnis negu vandeninėje aplinkoje (Bagdonas ir Jasaitis, 1997). Todėl tikėtina, kad fotomodifikacija biologinėje terpėje gali vykti netgi efektyviau.



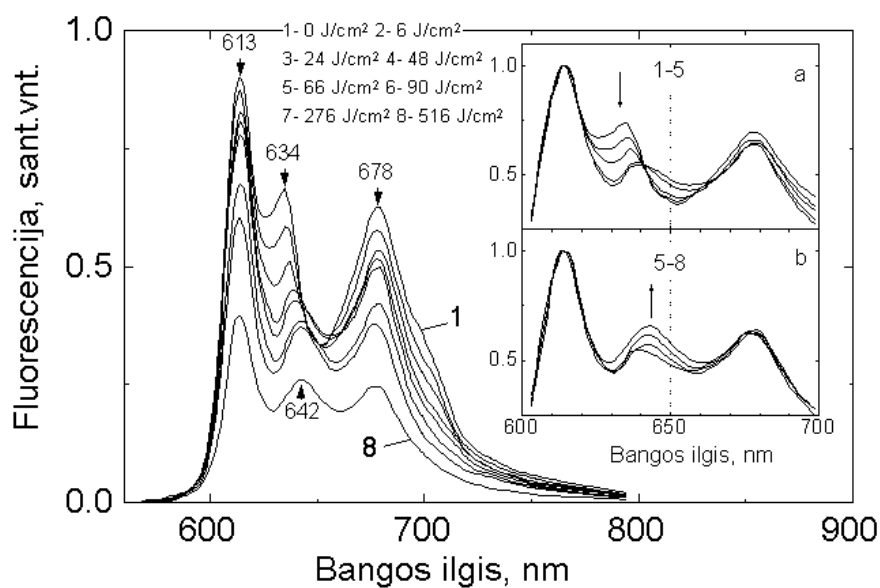
6.11 pav. Hp trečiosios Q juostos intensyvumo silpnėjimas (A) ir fotoproducto sugerties juostos ties 640 nm formavimasis (B)

Porfirino tipo pigmentai pasižymi tiek hidrofilinėmis, tiek hidrofobinėmis savybėmis, tad jie gali kauptis ir biomembranose. Buvo ištirtos šių sensibilizatorių fotomodifikacijos eritrocitų “šešėliuose” (Bagdonas ir kt., 1996). Eritrocitų šešėliai – membraninės struktūros, tad tikėtina, kad sensibilizatorių fotomodifikacines savybes lems jų sąveika su lipidais, kurie sudaro membranos pagrindą. Kadangi tokia aplinka stipriai sklaido šviesą, porfirinų fotomodifikacijos dėsningumai buvo tiriama fluorescencinės spektroskopijos metodu. Hp fluorescencijos spektrai, palyginti su jų vandeniniais tirpalais, eritrocitų šešėliuose yra pasislinkę į raudonąją spektro sritį (6.12 pav.).



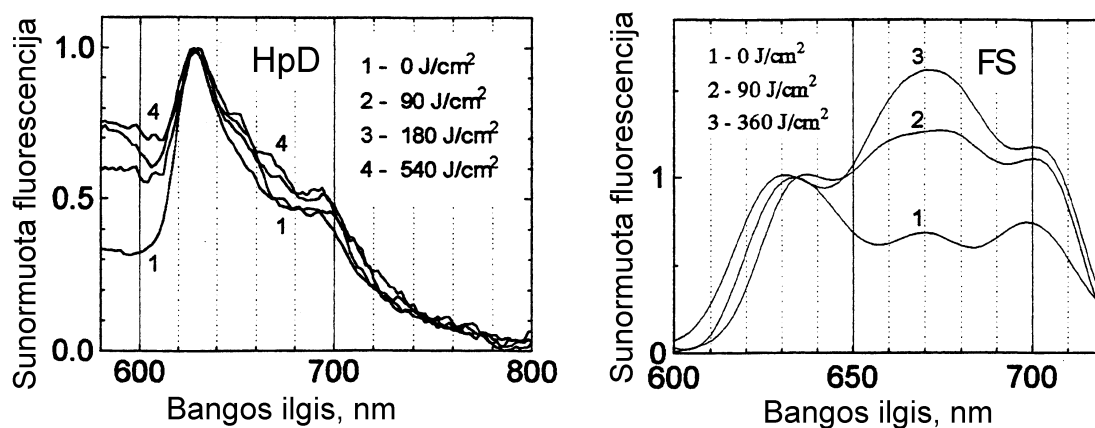
6.12 pav. Hp ($C = 10^{-4}M$) inkubuoto eritrocitų šešėliuose 24 val. (1), Hp ($C = 10^{-4}M$) vandenyje (2), supernatanto po pirmo centrifūgavimo (3), nuosėdų po keturių centrifūgavimų (4) fluorescencijos spektrai

Tai reiškia, kad porfirinai gerai kaupiasi membranose. Švitinimo metu porfirinų fluorescencijos spektruose formuojasi nauja juosta su maksimumu ties 650 nm (6.13 pav.), ir tai rodo, kad švitinimo metu, taip pat kaip ir vandeniniuose tirpaluose, susidaro chlorino tipo fotoproduktai.



6.13 pav. Hp ($C = 10^{-4}M$) inkubuoto eritrocitų šešėliuose fluorescencijos spektrų pokyčiai švitinimo metu. Intarpai: tie patys spektrai sunormuoti į 1 ties 613 nm

Sensibilizatorių fotomodifikacija modelinėse sistemose kai kuriais atvejais vyksta efektyviau negu vandeninėse terpėse, tačiau neaišku, ar tokios fotomodifikacijos taip pat vyksta navikiniuose audiniuose. Kaip žinoma, navikiniai audiniai pasižymi rūgštine aplinka, kurioje fotomodifikacijos procesas lėtesnis. Fluorescencinės spektroskopijos metodu buvo patvirtinta, kad ir eksperimentiniams gyvūnams įskiepytuose navikuose švitinimo metu išryškėja fotoproducto fluorescencijos juosta (6.14 pav.) (Juzėnas ir kt., 1996).

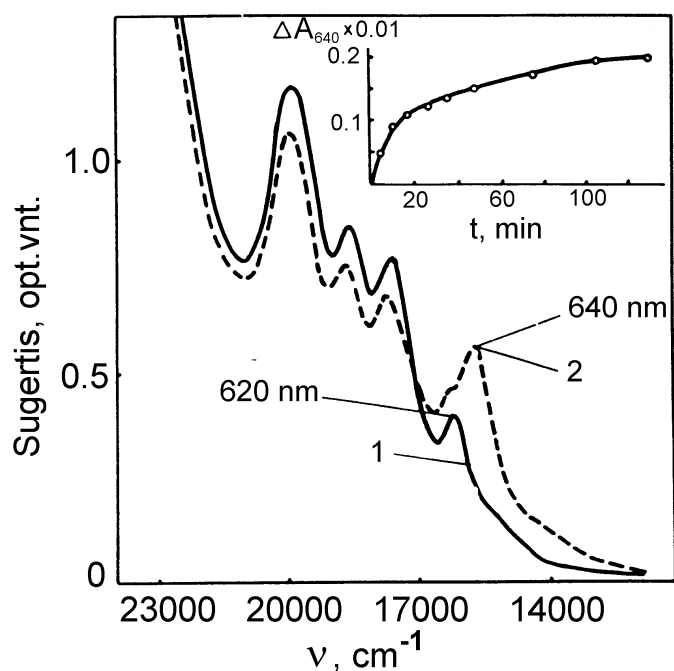


6.14 pav. HpD ir FS sensibilizuotų navikų fluorescencijos spektrų pokyčiai švitinant Ar jonų lazeriu ($\lambda = 514 \text{ nm}$). Spektrai sunormuoti į 1 ties fluorescencijos maksimumu

Aptartuose darbuose pagrindinis dėmesys buvo sutelktas į FNT naudojamų pirmosios kartos sensibilizatorių fotomodifikacijas, kadangi jos tiesiogiai susijusios su FNT naudojamomis sensibilizatorių ir šviesos dozėmis. Gydytojai, taikantys šią naują metodiką navikiniams susirgimams gydyti, norėtų gauti konkrečių rekomendacijų fototerapinių dozių skaičiavimui. Tačiau, daugėjant fundamentaliųjų FNT mechanizmų tyrimų, vis labiau aiškėja, kad veiksmingos gydymo dozės vertinimas yra labai sudėtingas (žr.6.3 sk.).

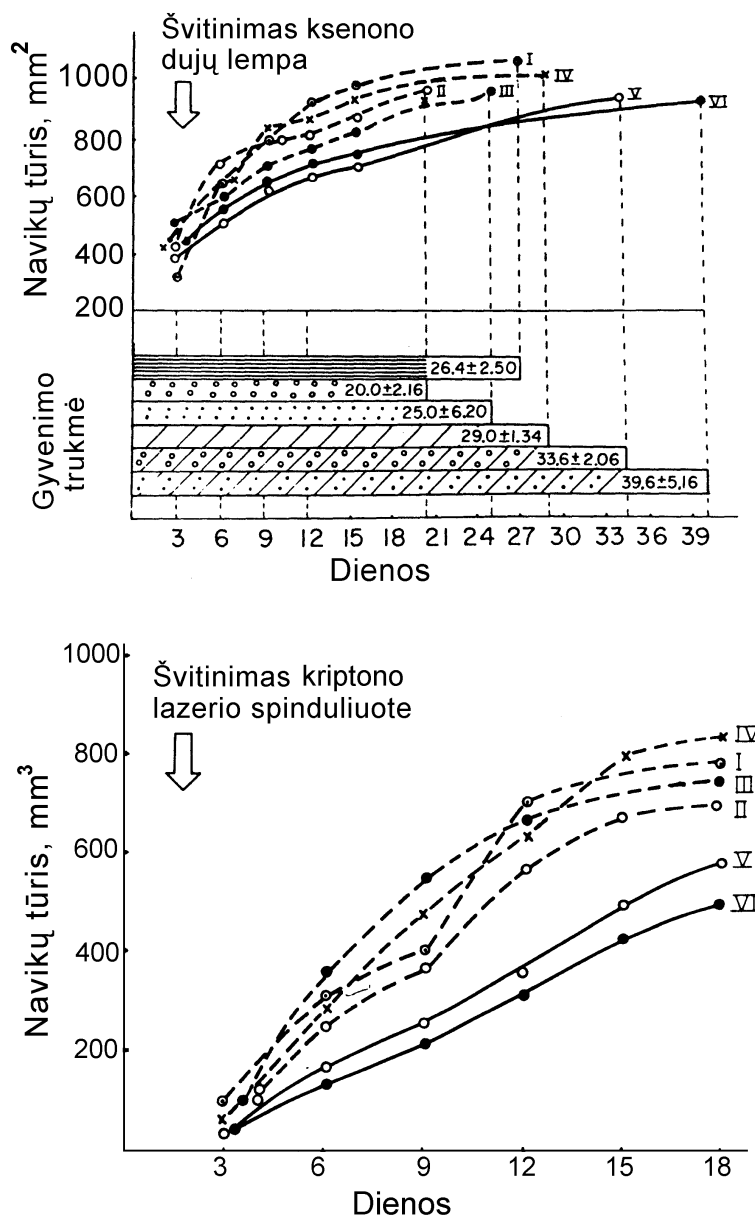
Jei švitinimo metu susidaro fotoproductai, reikia žinoti, ar jie aktyvūs FNT. Pirmieji spektroskopiniai tyrimai parodė, kad fotoproductai yra chlorino arba bakteriochlorino tipo junginiai. Tarp FNT siūlomų antrosios kartos sensibilizatorių (4 sk.) yra chlorino ir bakteriochlorino kilmės junginių, tad, priklausydami tai pačiai sensibilizatorių grupei, ir fotoproductai turėtų pasižymėti fotosensibilizaciniu aktyvumu. Jeigu chlorino tipo fotoproductai yra neaktyvūs, tai, skaičiuojant fototerapinę dozę, tektų įvertinti tik į organizmą suleidžiamo fotosensibilizatoriaus koncentracijos mažėjimą švitinimo metu. Jeigu jie aktyvūs – tektų įskaičiuoti ir jų sukeltą fotosensibilizacinį

efektą. Todėl buvo pabandyta išsiaiškinti, ar fotoproduktai pasižymi fotosensibilizaciniu poveikiu (Giniūnas ir kt., 1991). Vienai eksperimentinių gyvūnų grupei buvo išvirkšta farmakokinetiniuose tyrimuose nustatyta optimali Hp dozė. Kitai panaudotas toks pat Hp kiekis, tačiau prieš išvirkštimą sensibilizatoriaus tirpalas buvo apšvitintas. Švitinant dalis sensibilizatoriaus buvo fotomodifikuota, tad į organizmą pateko ir švitinimo metu susidariusio fotoprodukto. Paprastai FNT su porfirino tipo sensibilizatoriais naudojama 630 nm bangos ilgio šviesa, kadangi šių sensibilizatorių ilgabangės sugerties juostos maksimumas audiniuose yra ties šiuo bangos ilgiu. Fotoprodukto efektyvumo įvertinimo eksperimente gyvūnai buvo švitinami kriptono jonų lazerio spinduliuojama šviesa, kurios bangos ilgis 647 nm, arba ksenono dujų lempa su filtru, praleidžiančiu tik ilgesnių nei 610 nm bangų šviesą. Ši šviesa žadina fotoproduktą, nes jo ilgabangė sugerties juosta yra ties 640–650 nm. Jeigu fotoproduktas būtų neaktyvus, poveikis pelėms, kurioms buvo išvirkštas nešvitintas Hp tirpalas, turėtų būti didesnis nei toms, kurioms buvo išvirkštas apšvitintas Hp, kadangi šiame tirpale dalis Hp švitinimo metu buvo suardyta, t.y. modifikuota į fotoproduktą (6.15 pav).



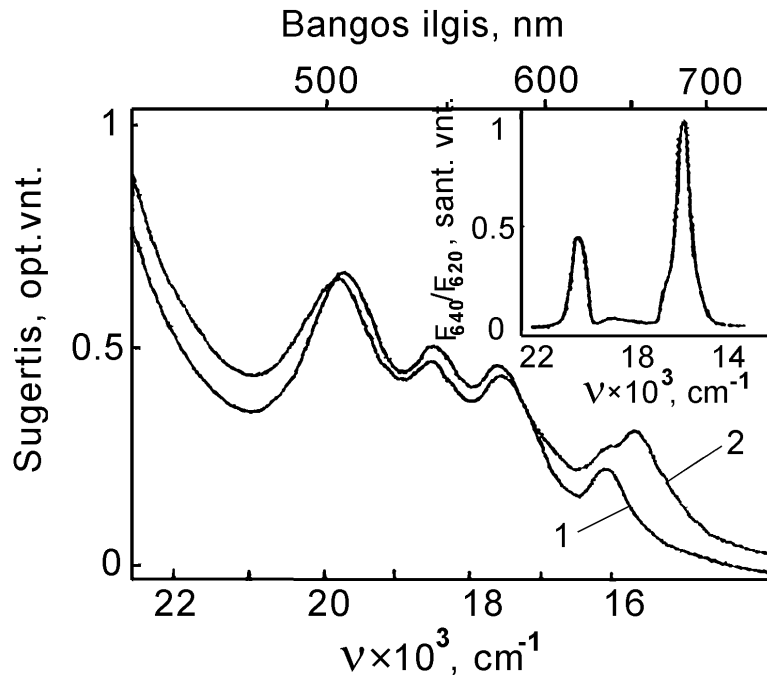
6.15 pav. HpD tirpalų sugerties spektrai prieš (1) ir po švitinimo (2) Ar jonų lazeriu. Intarpas: sugerties intensyvumo pokyčiai ties 640 nm švitinimo metu

Tačiau navikų augimas pelių grupėje, kuriai buvo išvirkštas Hp su fotoproduktu, buvo lėtesnis, o gyvūnų gyvenimo trukmė ilgesnė (6.16 pav.). Tai rodo, kad fotoproduktas yra aktyvus ir jo įtaką reikia įvertinti skaičiuojant optimalią fototerapinę dozę.



6.16 pav. Plokščialąstelinio prieskrandžio naviko OJ-5 augimo dinamika ir eksperimentinių gyvūnų gyvenimo trukmė (A) ir storosios žarnos adenokarcinomos augimo dinamika (B). I – kontrolė; II, – HpD; III – HpD fotoproduktas; IV – švitinimas; V – HpD ir švitinimas; VI – HpD fotoproduktas ir švitinimas

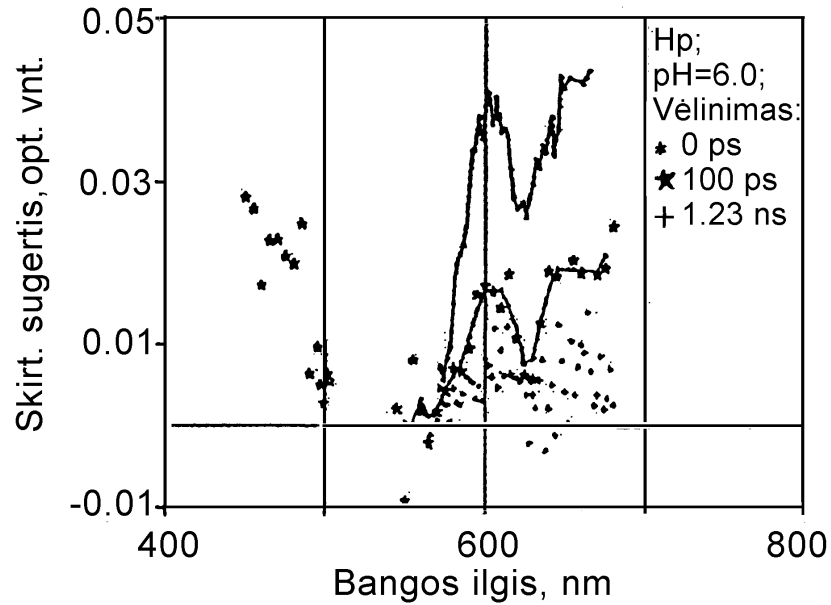
Tiksli fotoprodukto cheminė formulė ir jo spektrinės charakteristikos, kaip ir tai, kiek jo susidaro navikiniuose audiniuose švitinimo metu, dar lieka nenustatyta. Jeigu susiformuojančio fotoprodukto kiekis nėra didelis, fotosensibilizacinį efektyvumą sąlygos tik fotosensibilizatoriaus savybės.



6.17 pav. Nešvitinto (1) ir švitinto (2) HpD vandeninių tirpalų sugerties spektrai ($C = 10^{-4} \text{ M}$). Intarpas: fotoproducto spektras sumodeliuotas iš švitinto HpD fluorescencijos žadinimo spektrų

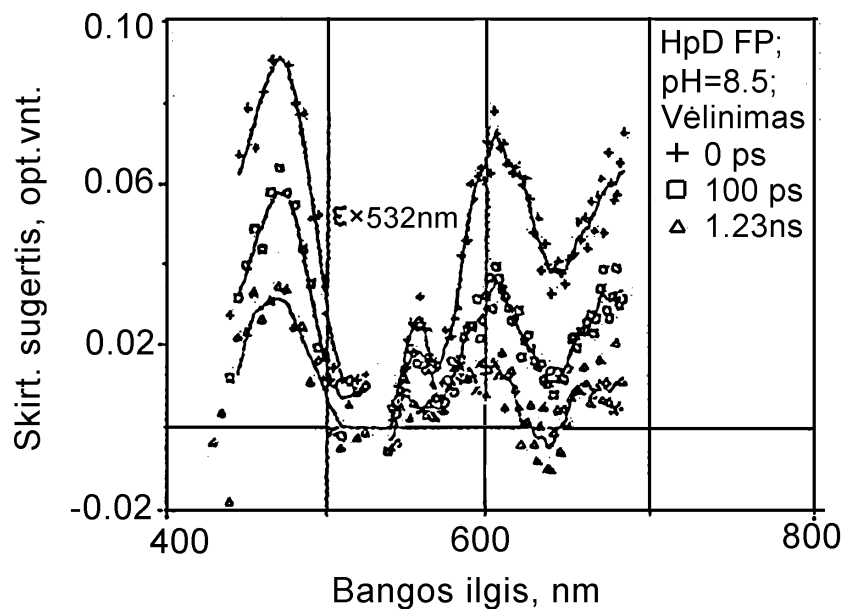
Porfirino tipo fotosensibilizatorių fluorescencijos juosta persikloja su fotoproducto sugerties juosta, tad tenkinamos sužadavimo energijos pernašos tarp fotosensibilizatoriaus ir fotoproducto sąlygos. Esant pakankamai mažam atstumui tarp jų galima Försterio tipo sužadavimo energijos pernaša. Chromatografiniai tyrimai parodė (Rotomskis ir kt., 1997a), kad susiformavęs fotoproductas sunkiai atskiriamas nuo sensibilizatoriaus ir gali būti, kad švitinimo metu formuojasi sensibilizatoriaus ir fotoproducto konglomeratas. Esant tokioms sąlygoms fotoproductas gali gesinti sužadintą fotosensibilizatoriaus molekulę ir taip sumažinti paties sensibilizatoriaus fotosensibilizacinį efektyvumą arba pakeisti fotosensibilizacinio vyksmo grandinę. Norint išsiaiškinti tokio vyksmo galimybę buvo atlikti sužadavimo energijos pernašos tyrimai švitinto hematoporfirino darinio (HpD) tirpaluose (Rotomskis ir kt., 1993).

Iš HpD ir modelinio fotoproducto sugerties spektrų matyti (6. 17 pav., intarpas), kad, žadinant bandinį antrąja pikosekundinio Nd:YAG lazerio harmonika, selektyviai sužadinamas HpD, nes šio bangos ilgio šviesos nesugeria fotoproductas. Taigi bandinyje pikosekundiniu šviesos impulsu bus sužadintos tik HpD molekulės. Zonduojančiu pikosekundinio spektrometro spinduliu galima ištirti spektrinius pokyčius 600-700 nm srityje ir išsiaiškinti, ar vyksta sužadavimo energijos pernaša tarp HpD ir fotoproducto.



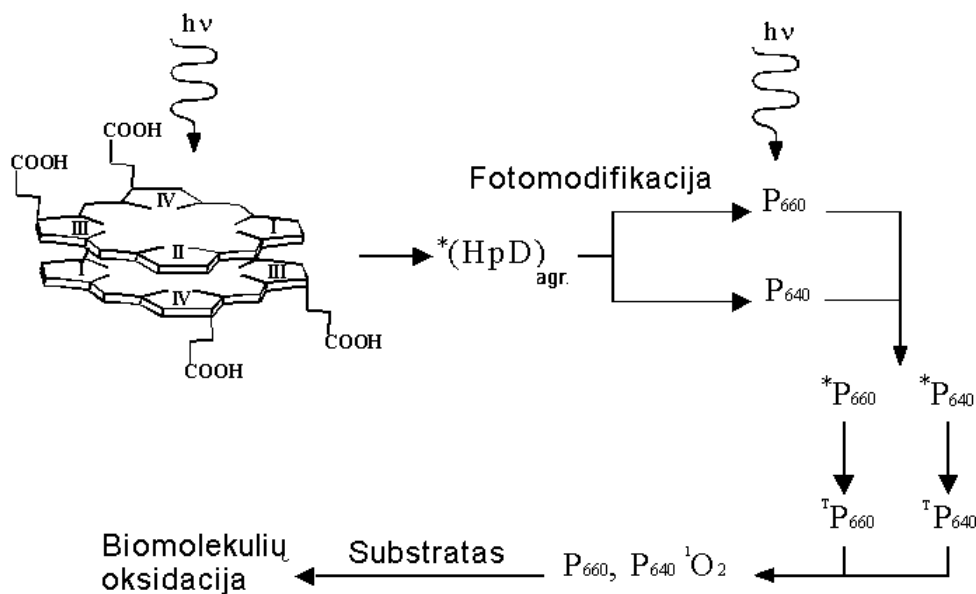
6.18 pav. HpD skirtuminis sugerties spektras. Koncentracija $10^{-4}M$, $\lambda_{\text{žad}}=532$ nm, vėlinimas 0, 100 ir 1230 ps

Kaip matyti 6.18 paveiksle, gryno HpD skirtuminiuose sugerties spektruose 600-700 nm srityje praskaidrėja labiausiai ilgabangė sugerties juosta su maksimumu ties 620 nm.



6.19 pav. Švitinto HpD skirtuminis sugerties spektras. Koncentracija $10^{-4}M$, $\lambda_{\text{žad}}=532$ nm, vėlinimas 0, 100 ir 1230 ps

Jeigu sužadavimo energijos pernaša iš HpD į fotoproduktą yra negalima, tai ir bandinyje, kuris gautas švitinant HpD tirpalą ir kuriame susiformavo fotoproduktas, turi skaidrėti HpD sugerties juosta ties 620 nm, nes fotoproduktas nesugeria žadinimo šviesos ties 532 nm. Žadinant tokį tirpalą ties 532 nm, 600–700 nm srityje skaidrėja fotoprodukto sugerties juosta su maksimumu ties 640 nm (6.19 pav.). Tai rodo, kad sužadinta HpD molekulė efektyviai perduoda sužadimą fotoproduktui. Susiformavęs fotoproduktas blokuoja HpD fotosensibilizacinį vyksmą ir, matyt, apriboja jo sugebėjimą generuoti singuletinį deguonį. Susidarant fotoproduktui, modifikuojama klasikinė sensibilizacinio vyksmo grandinė – į ją įsikomponuoja fotoproduktas (6.20 pav.). FNT metu navikiniame audinyje šalia bendros fotosensibilizacinio vyksmo grandinės galimos papildomos šakos. Jeigu šviesos kvantą sugėrusį fotosensibilizatorių aktyviai gesina fotoproduktas, vyksta sužadavimo energijos pernaša į fotoproduktą ir jis toliau vykdo sensibilizaciją, generuodamas aktyvias deguonies formas. Kadangi ir pats fotoproduktas sugeria šviesą ties 630 nm, galimas ir tiesioginis fotoprodukto sužadavimas bei aktyvių deguonies formų generavimas.



6.20 pav. Fotoproduktų įnašas į fotosensibilizaciją

Apibendrinant gautus rezultatus, galima pasakyti, kad FNT metu vyksta į organizmą įšvirkšto fotosensibilizatoriaus irimas, kartu formuojasi ne tik neaktyvus UV srityje šviesą sugeriantis fotoproduktas, bet ir chlorino tipo fotoproduktas, gerai sugeriantis FNT naudojamų šviesos šaltinių spinduliuotę. Šio fotoprodukto susidarymas gali turėti įtakos fotosensibilizaciniam vyksmui, todėl skaičiuojant fototerapinę dozę (sk.

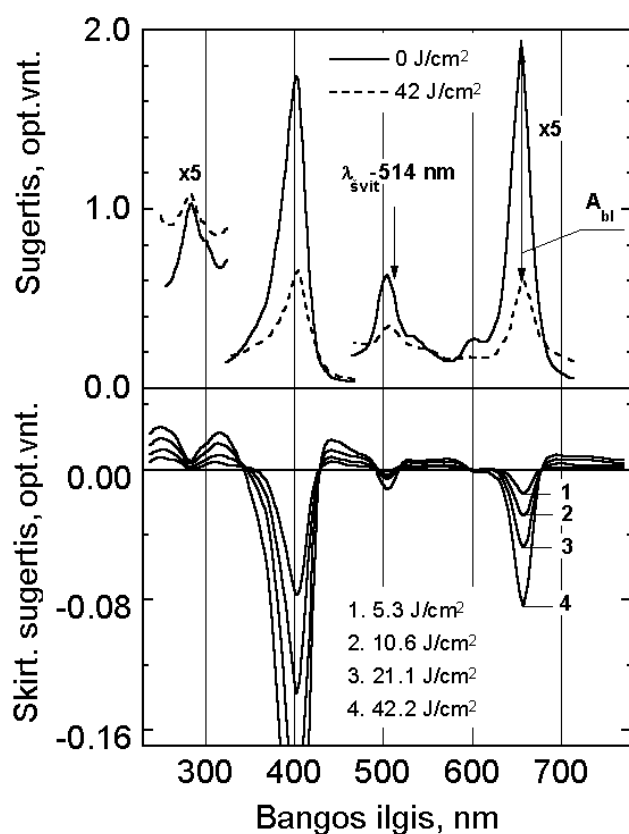
6.3) reikia atsižvelgti į tai, kad fotosensibilizacija gali vykti kita seka (6.20 pav.) ir į dozės skaičiavimą būtina įskaityti fotoproducto susidarymą.

6.2 Antrosios kartos sensibilizatorių fotostabilumo tyrimai

Nors porfirino tipo fotosensibilizatorių pagrindu sukurtas vaistas fotofrinas II sėkmingai diegiamas klinikoje ir septyniose pasaulio šalyse jau aprobuotas įvairių navikinių susirgimų gydymui, mokslininkai bei medikai ir toliau ieško efektyvių fotosensibilizatorių, galinčių užimti deramą vietą kovoje su navikiniais susirgimais.

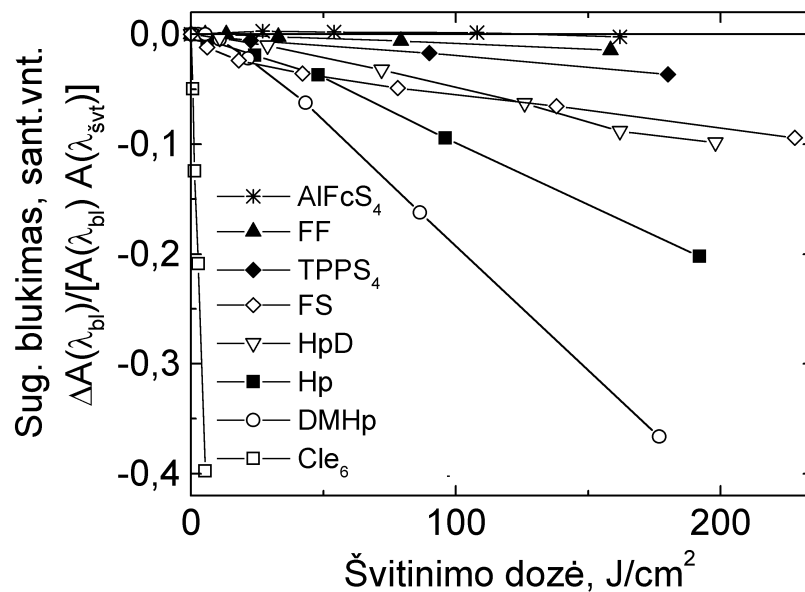
Antrosios kartos fotosensibilizatoriai pasižymi geresnėmis spektrinėmis savybėmis, stipresne šviesos sugertimi raudonoje spektro srityje, jų ilgabangė sugerties juosta yra didesnio audinių pralaidumo spektrinėje srityje, todėl natūralu, kad jų fotostabilumo tyrimai susilaukė tyrinėtojų dėmesio. Tiek chlorinai, tiek ftalocianinai turi sudėtingą molekulinę struktūrą, kuri veikiamą šviesos gali suirti arba modifikuotis į įvairius darinius.

Ištyrėme trijų antrosios kartos fotosensibilizatorių – chlorino e_6 (Cl_e6), aliuminio ftalocianino tetrasulfonato ($AlFcS_4$) ir mezo-tetrafeniltetrasulfonato porfino ($TPPS_4$) fotostabilumą (Rotomskis ir kt., 1997b). Gauti rezultatai buvo lyginami su anksčiau ištirtų pirmosios kartos fotosensibilizatorių – hematoporfirino (Hp), dimetoksihematopofirino (DMHp), hematoporfirino darinio (HpD) fotostabilumo tyrimų rezultatais.



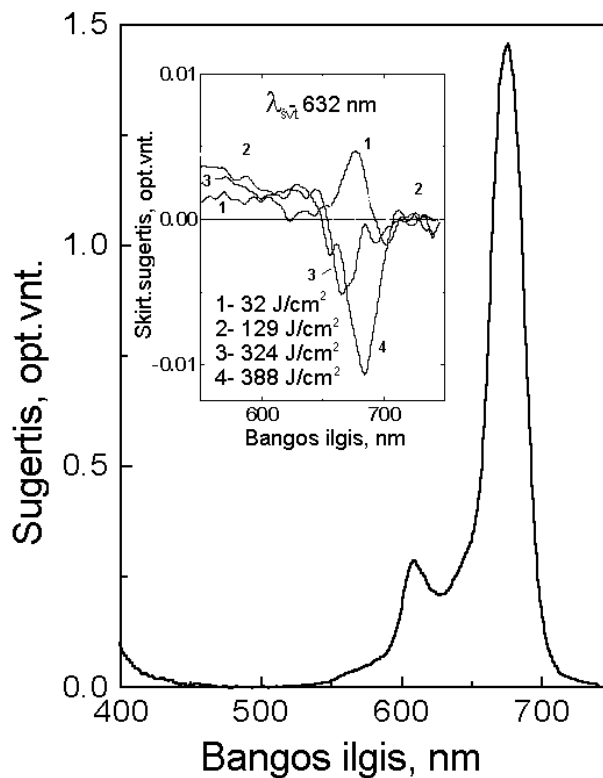
6.21 pav. Švitinto ir nešvitinto Cle_6 tirpalo sugerties ir skirtuminiai sugerties spektrai ($C = 10^{-4} \text{ M}$)

Jau esant mažoms švitinimo dozėms chlorino e_6 (Cle_6) tirpalų sugertis greitai silpnėja, taigi jis vandeninėje terpėje yra labai nestabilus (6.21 pav.). Tolesni lyginamieji tyrimai parodė, kad Cle_6 yra labiausiai nestabilus iš tirtųjų sensibilizatorių, o TPPS_4 pasižymi panašiu fotostabilumu kaip fotofrinas (FF) ir HpD, fotosensibilizatoriai, kurių sudėtyje yra dideli kiekiai kovalentiniais ryšiais sujungtų struktūrų (6.22 pav.).



6.22 pav. Fotosensibilizatorių blukimo kinetikos

Priešingai negu Cle_6 , AIFcS_4 pasižymi dideliu fotostabilumu. Vandeniniuose tirpaluose, netgi esant 388 J/cm^2 švitinimo dozei, jo sugerties juostų intensyvumas sumažėja tik 1% (6.23 pav.).



6.23 pav. Švitinto ir nešvitinto AIFcS_4 tirpalo sugerties ir skirtuminiai sugerties spektrai ($C = 10^{-4} \text{ M}$)

AlFcS₄ yra daug stabilesnis už Hp ir DMHp (6.22 pav.), kurie vandeniniuose tirpaluose egzistuoja monomerų ir pusiausvirųjų agregatų pavidalu.

Tiek Cle₆, tiek AlFcS₄ skirtuminiuose sugerties spektruose pastebimas tik sugerties juostų blukimas, parodantis molekulės makrociklo irimą, tačiau fotoproduktų susidarymą liudijančios naujos sugerties juostos nesusiformuoja. Vieno iš tirtų fotosensibilizatorių, gana atsparaus šviesos poveikiui TPPS₄, skirtuminio sugerties spektro raudonojoje srityje atsiranda nauja juosta, rodanti fotoproduktų susidarymą (6.5 pav.). Reikia pažymėti, kad šiuo atveju fotoproduktų sugerties juosta yra gana plati ir neišreikšta. Tai galėtų būti ne chlorino tipo sensibilizatorių formavimosi, o kovalentinių struktūrų, surišančių dvi ar kelias TPPS₄ molekules, susidarymo pasekmė. Tiksliam šio fotoprodukto prigimties išaiškinimui reikia papildomų tyrimų.

Spektroskopiniai tyrimai rodo, kad antrosios kartos sensibilizatorių fotostabilumas priklauso nuo jų struktūros, tačiau, palyginti su pirmosios kartos sensibilizatoriais, galima išskirti ir vieną pagrindinių skirtumų. Antrosios kartos sensibilizatoriai, veikiami šviesos, nesudaro fotoproduktų, sugeriančių šviesą raudonoje spektro srityje, tad skaičiuojant fototerapines dozes reikia atsižvelgti tik į jų suirimą.

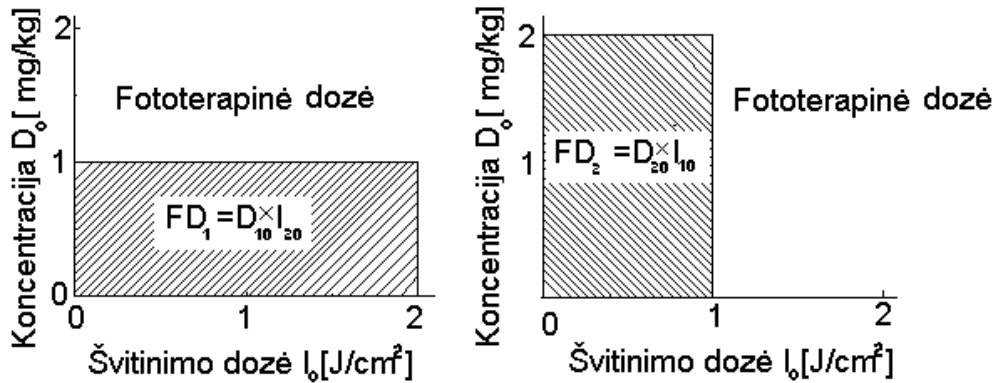
6.3. Fototerapinių dozių skaičiavimas

Geram FNT gydymo rezultatui pasiekti labai svarbu tinkamai apskaičiuoti fototerapinę dozę. Ji priklauso ne tik nuo sensibilizatoriaus koncentracijos, bet ir nuo švitinimo trukmės, kadangi terapinis efektas inicijuojamas tik fotosensibilizatoriui sugėrus šviesos kvantą. Todėl fototerapinė dozė (FD) apskaičiuojama kaip sensibilizatoriaus koncentracijos ir švitinimo dozės, arba paprasčiau, – švitinimo trukmės esant tiems patiems švitinimo šaltinio parametrams, sandauga:

$$FD = \text{sensibilizatoriaus koncentracija (mg/kg)} \times \text{švitinimo dozė (J/cm}^2\text{)}.$$

Galioja dozės ekvivalentiškumo principas – mažesnę sensibilizatoriaus koncentraciją gali kompensuoti didesnė švitinimo dozė ir atvirkščiai (6.24 pav.).

Ekvivalentiškumo principas $FD_1 = FD_2$



6.24 pav. Fototerapinės dozės geometrinė išraiška (Potter ir kt., 1987)

Paprastai sensibilizatoriaus koncentracija parenkama tokia, kuri užtikrina didžiausią sensibilizatoriaus kontrastą sveikame ir navikiniame audinyje. Nors sensibilizatorius nėra toksiškas ir į organizmą jo galima įšvirkšti gana daug, problemų kyla dėl atsirandančio odos jautrumo šviesai ir per didelės sensibilizatoriaus koncentracijos sveikuose audiniuose, nes jie gali būti pažeisti švitinimo metu.

Pagrindinis dėmesys optimizuojant FD skiriamas švitinimo trukmei (dozei). Fotosensibilizacinį efektą sąlygoja sensibilizatoriaus sugertų kvantų skaičius, kuris priklauso (jei koncentracija pastovi) nuo sensibilizatoriaus sugerties savybių. Sensibilizatoriaus sugertis nesunkiai ištiriama spektroskopiniais metodais, tačiau problemų iškyla tuo atveju, jei sensibilizatorius yra nestabilus, švitinimo metu suyra ir suformuoja sugeriančius švitinimo šviesą ir turinčius fotosensibilizacinį aktyvumą fotoproduktus.

Fotostabiliems sensibilizatoriams, tokiems kaip AlF_cS_4 , naudojama klasikinė FD vertinimo formulė:

$$FD = \int D(j) dj, \quad (6.1)$$

čia: j – švitinimo dozė (J/cm^2), sugerta bet kuriame švitinamo audinio taške; $D(j)$ – sensibilizatoriaus koncentracija tame taške, sužadinama tą audinio tašką pasiekiančios šviesos dozės j (Potter ir kt., 1987).

Kai sensibilizatorius nestabilus ir švitinimo metu yra, o irimas aprašomas eksponentiniu dėsnio, galima naudoti tą irimą įskaitančią dozės vertinimo formulę:

$$FD = D_0/\beta [1 - \exp(-\beta J_0)], \quad (6.2)$$

čia: D_0 – fotosensibilizatoriaus koncentracija prieš švitinimą, J_0 – krintančios

šviesos dozė (J/cm^2), β – sensibilizatoriaus suirimo greičio konstanta ($J^{-1}cm^{-2}$).

Porfirino kilmės sensibilizatoriai švitinimo metu ne tik suyra, bet ir sudaro švitinimo spinduliuotę sugeriančius fotoproduktus. Šie produktai yra aktyvūs FNT ir geri sužadavimo energijos akceptorai. Remiantis nauja, fotoproduktų dalyvavimą apimančia FNT vyksmų schema (6.20 pav.), išvesta fototerapinės dozės skaičiavimo formulė (R. Rotomskis ir kt., 1998). Jei sensibilizatoriaus koncentracija švitinimo metu mažėja eksponentiniu dėsnio (sensibilizatoriaus suirimo greitis β) ir jo suirimas sąlygotas sensibilizatoriaus destrukcijos (fotodestrukcijos greitis α) ir FNT aktyvių produktų susidarymu (fotoproduktų formavimosi greitis k), tai šviesos sukeltus vyksmus galima aprašyti lygčių sistema:

$$dD_1/dj = -\beta D_1 \quad \text{sensibilizatoriaus koncentracijos mažėjimas} \quad (6.3)$$

$$dD_2/dj = \phi k D_1 \quad \text{aktyvių fotoproduktų susidarymas} \quad (6.4)$$

$$dD_3/dj = \alpha D_1 \quad \text{fotodestrukcija}$$

$$D_1 + D_2 + D_3 = 1,$$

čia: D_1, D_2 ir D_3 yra atitinkamai sensibilizatoriaus, aktyvaus fotoprodukto ir fotodestrukcijos produktų koncentracijos; β , k ir α – atitinkamų fotovyksmų greičio konstantos; ϕ – fotodinamiškai aktyvaus fotoprodukto formavimosi kvantinis našumas. Tada fototerapinė dozė išreiškiama:

$$FD = \int D(j) dj = \int D_1(j) + D_2(j) dj = \int D_1(j) dj + \int D_2(j) dj = FD_1 + FD_2, \quad (6.5)$$

nes ne tik sensibilizatorius, bet ir fotoproduktas turi fototerapinį poveikį.

Suintegravus (6.3) lygtį, gaunamas eksponentinis D_1 mažėjimas:

$$D_1 = D_{10} \exp(-\beta j), \quad (6.6)$$

čia D_{10} yra sensibilizatoriaus koncentracija prieš švitinimą.

Ištačius (6.6) išraišką į (6.4) lygtį, apskaičiuojamas D_2 koncentracijos pokytis:

$$dD_2/dj = \phi k D_{10} \exp(-\beta j)$$

$$dD_2 = \phi k D_{10} \exp(-\beta j) dj$$

$$D_2 = -\phi k/\beta D_{10} \exp(-\beta j) + C$$

čia C – integravimo konstanta. Pradiniu momentu $j = 0$, o $D_2 = D_{20}$, kur

$$D_{20} = -\phi k/\beta D_{10} + C$$

$$C = D_{20} + \phi k/\beta D_{10}$$

Jei $D_{20} = 0$ (pradiniu momentu fotoprodukto nėra), tai

$$D_2 = \phi k/\beta D_{10} (1 - \exp(-\beta j)) \text{ arba}$$

$$D_2 = \phi k/\beta (D_{10} - D_1(j)), \quad (6.7)$$

čia $\phi k/\beta$ – koeficientas, parodantis, kuri sensibilizatoriaus dalis fotomodifikuojasi į fotoproduktą.

Suintegravus (6.6) lygtį gaunama pirmosios fototerapinės dozės FD_1 išraiška:

$$FD_1 = D_{10}/\beta (1 - \exp(-\beta j_0)) \quad (6.8)$$

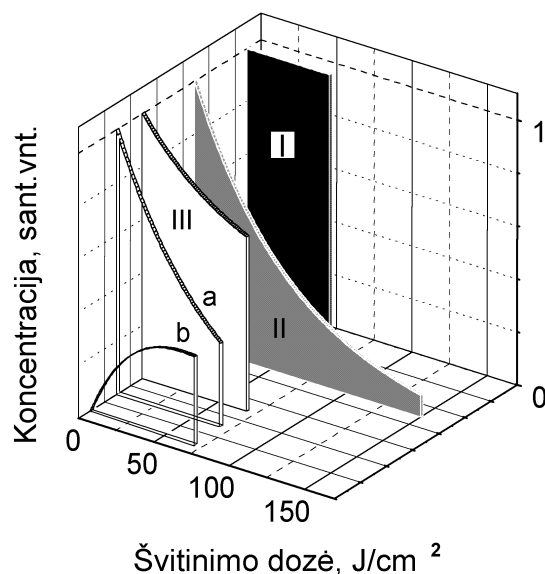
Suintegravus (6.7) lygtį gaunama antrosios fototerapinės dozės FD_2 išraiška:

$$FD_2 = \phi k/\beta D_{10} j_0 - \phi k/\beta D_{10}/\beta (1 - \exp(-\beta j_0)) \quad (6.9)$$

Pagal (6.5) bendra fototerapinė dozė yra pirmosios ir antrosios dozių suma:

$$FD = D_{10}/\beta [1 - \phi k/\beta][1 - \exp(-\beta j_0)] + \phi k/\beta D_{10} j_0 \quad (6.10)$$

Navikų destrukcijos procesui inicijuoti reikia, kad šviesa sužadintų navikinėse ląstelėse susikaupusį fotosensibilizatorių. Manoma, kad FNT poveikis yra proporcingas sensibilizatoriaus koncentracijos ir švitinimo dozės sandaugai. Santykis tarp sensibilizatoriaus koncentracijos ir švitinimo dozės (6.25 pav.(I)) abipusiai pakeičiamas – svarbus tinkamas jų sandaugos dydis (Grossweiner, 1986; Fingar ir kt., 1987). Tačiau ši nuostata neįskaito sensibilizatoriaus suirimo švitinimo metu. Sensibilizatoriaus suirimą turi kompensuoti didesnė švitinimo dozė (6.25 pav.(II)). Kai sensibilizatoriui yrant susidaro aktyvūs fotoproduktai, tokiam pat efektui pasiekti reikiama dozė gali būti net mažesnė (6.25 pav.(III)), nes sudaryta iš dviejų veiksnių sumos: pradinės sensibilizatoriaus koncentracijos (D) mažėjimą (III a) iš dalies gali kompensuoti fotoprodukto susidarymas (III b).



6.25 pav. Trys būdai vienodai fototerapinei dozei gauti: I – fotostabilus sensibilizatorius; II – nestabilus sensibilizatorius (eksponentiškai blunka); III – nestabilus sensibilizatorius (a) ir fotoproduktas (b)

6.4 Naujas dozių vertinimo modelis

FNT klinikiniai protokolai į dozių vertinimą įskaito tris parametrus – sensibilizatoriaus dozę (mg kūno svorio kg), švitinimo šviesos dozę (J/cm^2) ir laiko trukmę tarp sensibilizatoriaus įšvirkštimo ir švitinimo, nors yra daug kitų faktorių, kurie turi įtakos **veiksmingajai** dozei – tai, kuri iš tikrųjų patenka į gydomą vietą. Tie papildomai veikiantys faktoriai yra:

a. atskiriems pacientams skirtingas sensibilizatoriaus kaupimasis navike (Braichotte ir kt., 1995; Braichotte ir kt., 1996);

b. įvairių audinių skirtingi optiniai sugerties ir sklaidos koeficientai, apsprendžiantys šviesos skvarbumą ir pasiskirstymą švitinamame tūryje (Cheong ir kt., 1990);

c. skirtingas deguonies kiekis audiniuose (Stone, 1993);

d. šviesos skvarbumo pokyčiai švitinimo metu, atsiradę dėl FNT sukeltų kraujotakos pokyčių (Van Geel ir kt., 1994);

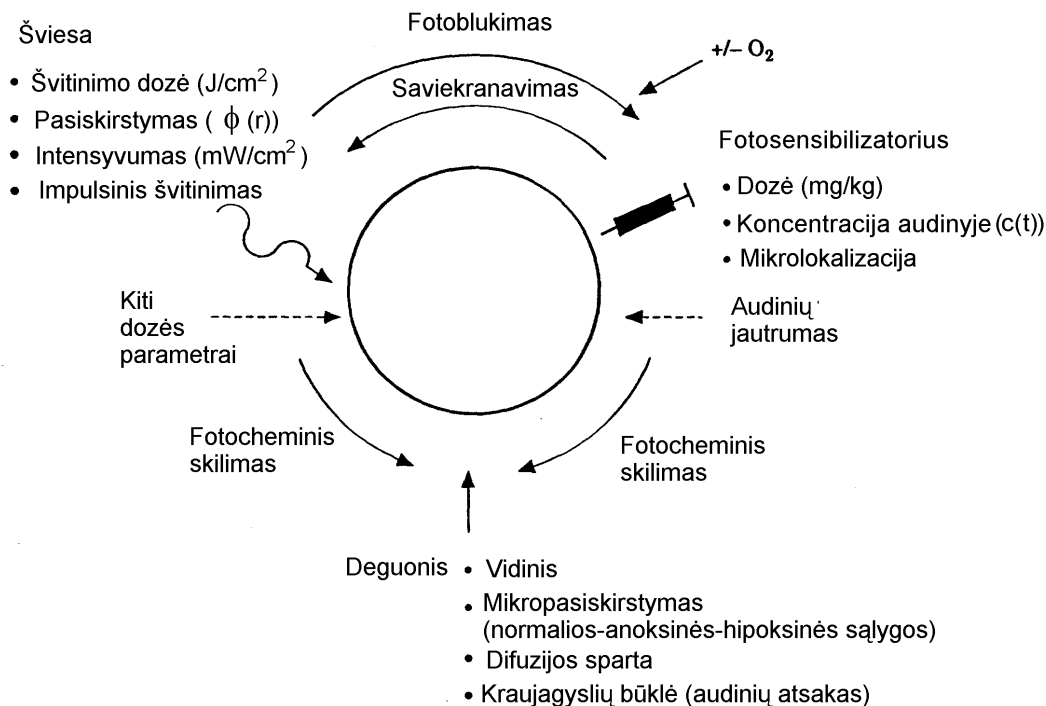
e. “saviėkranavimas”, atsirandantis naudojant antrosios kartos sensibilizatorius, kurie, turėdami didelius ekstinkcijos koeficientus, gerai sugeria šviesą ir taip riboja jos skvarbumą į gilesnius audinių sluoksnius (Wilson ir kt., 1986);

f. sensibilizatoriaus suirimas (fotoblukimas), dėl kurio sumažėja sensibilizatoriaus koncentracija švitinamame audinyje;

g. fotocheminis deguonies nuskurdimas audiniuose, atsirandantis švitinant didelio intensyvumo šviesa ir silpninantis fotosensibilizacinį poveikį (Foster ir Gao, 1992)).

Taigi yra nemažas atotrūkis tarp gydymo reikmėms skaičiuojamų dozių ir realiai vykstančio sudėtingo FNT proceso. Optimizuojant ir standartizuojant gydymą su naujais fotosensibilizatoriais turėtų tobulėti ir dozių įvertinimas, o jis neįmanomas be platesnio supratimo, kaip dozę modifikuojantys faktoriai sąveikauja tarp savęs, nulemdami veiksmingąją, taikinį pasiekiančią dozę ir kaip ji koreliuoja su gydymo atsaku.

Paaikšėjus naujiems dozę modifikuojantiems faktoriams ir glaudžiai jų tarpusavio priklausomybei ir svarstant jų poveikį veiksmingajai dozei, pradėtos vartoti naujos sampratos – **numanoma** dozė ir **tiksli** dozė (Wilson ir kt., 1997).



6.26 pav. Dozės faktorių (fotosensibilizatoriaus, šviesos ir deguonies), susijusių su FNT atsaku *in vivo*, tarpusavio priklausomybė. Lenktos rodyklės nurodo tarp savęs susijusius mechanizmus: šviesa veikia sensibilizatorių per fotoblukimą, šviesa ir fotosensibilizatorius drauge veikia audinių deguonį per fotocheminį skilimą (pagal (Wilson ir kt., 1997))

Dozės faktorių tarpusavio priklausomybė. Svarbiausios trijų pagrindinių FNT veiksmų – šviesos, fotosensibilizatoriaus ir deguonies – tarpusavio priklausomybės pavaizduotos 6.26 paveiksle. Kiekvienam jų gali būti taikomi įvairūs matai. Šviesai apibūdinti galimi tokie parametrai: švitinimo šviesos dozė, šviesos intensyvumas, erdvinis šviesos pasiskirstymas švitinamo audinio tūryje, laikinės šviesos charakteristikos (impulsinis ar tolydus švitinimas). Sensibilizatoriui apibūdinti svarbus ne tik įšvirktas kiekis (mg kūno svorio kg), bet ir jo koncentracija navikiniame audinyje bei mikropasiskirstymas tarp navikinių ir aplinkinių sveikų audinių. Kalbant apie deguonį svarbi jo koncentracija audiniuose prieš gydymą, taip pat ir kraujagyslių būklė prieš gydymą ir gydymo metu, nes nuo jos priklauso, koks deguonies kiekis gali dalyvauti FNT procese. Ruošiant FNT protokolus buvo laikoma, kad visi trys veiksniai yra tarpusavyje nepriklausomi. Tačiau iš tikro kiekvienas iš jų gali veikti kitą ir/ar būti veikiamas kito (arba jame įvykusio pokyčio).

Šviesos poveikis sensibilizatoriui. Šviesos veikiamas sensibilizatorius “blunka”. Šis terminas nusako ir sensibilizatoriaus fotocheminę destrukciją, ir sugerties ir/ar

fluorescencijos intensyvumo sumažėjimą, nesusijusį su molekulių suirimu. Aptariamame kontekste fotoblukimas suprantamas kaip sensibilizatoriaus fluorescencijos intensyvumo mažėjimas, kuris atitinka fotosensibilizacinio poveikio silpnėjimą. Kadangi dėl riboto šviesos skvarbumo į audinius susidaro ženklūs šviesos intensyvumo gradientai, fotoblukimas visame naviko tūryje bus nevienodas.

Kai fototerapines dozes vertinant fotoblukimas naudojamas kaip matas, svarbiausia problema – ar fotoblukimas priklauso nuo deguonies ir/ar singuletinio deguonies.

Sensibilizatoriaus poveikis šviesai. Antrosios kartos sensibilizatoriai, kurių ekstinkcijos koeficientai ties švitinimo bangos ilgiu dideli, susilpnina šviesos skvarbumą į audinius dėl savo pačių sugerties (“saviiekranavimo” efektas). Dėl to šviesa pasiekia mažesnę gydomų audinių tūrį. Šį efektą iš dalies silpnina sensibilizatoriaus fotoblukimas, tad švitinimo metu tarp sensibilizatoriaus ir šviesos yra sudėtinga sąveika (galinti priklausyti ir nuo deguonies), kuri nėra įskaityta į jų pradinius matus.

Šviesos ir sensibilizatoriaus poveikis deguonies kiekiui audiniuose. Ir teoriškai, ir praktiškai įrodyta (Foster ir Gao, 1992), kad esant pakankamai sensibilizatoriaus koncentracijai ir šviesos intensyvumui audiniuose gali vykti fotocheminis deguonies nuskurdinimas. Jei fotosensibilizacija priklauso nuo deguonies – poveikis susilpnės. Kiek jis susilpnės priklausys taip pat nuo to, kaip audinys aprūpinamas deguonimi. Nuskurdinimo poveikį gali susilpninti mažesnis šviesos intensyvumas arba trūkus švitinimas, leidžiantis per tamsos fazę deguoniui redifunduoti.

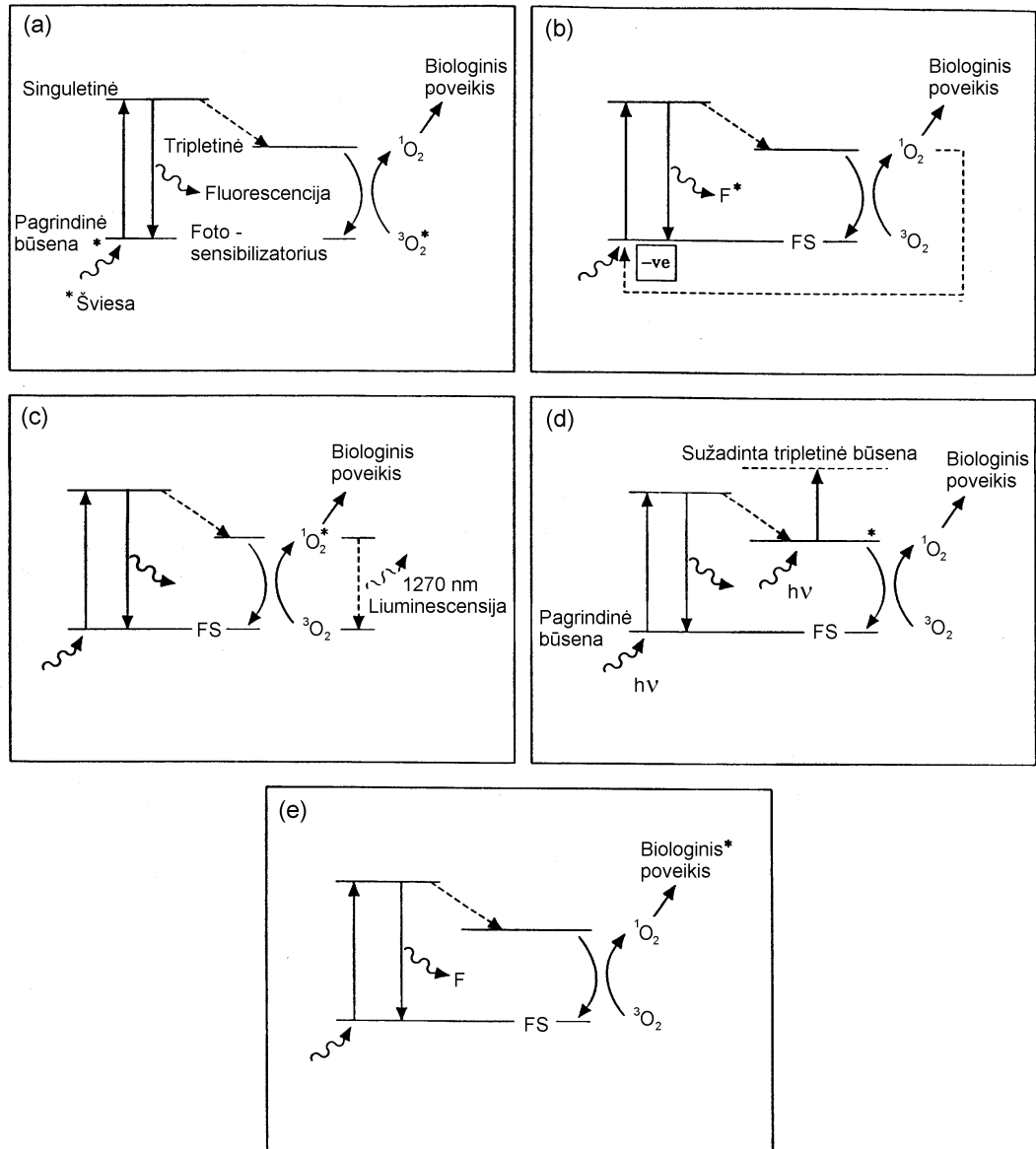
Deguonies kiekio audiniuose poveikis šviesai ir sensibilizatoriui. Sensibilizatoriaus fotoblukimas gali priklausyti nuo deguonies, tad fotoblukimo greitis keisis, jei deguonies kiekis audiniuose dėl fotocheminio nuskurdinimo arba kraujotakos pokyčių pakis. Pakitęs kraujo tūris audiniuose (keičiasi (oksi)hemoglobino kiekis) gali pakeisti šviesos skvarbumą dėl padidėjusios ar sumažėjusios šviesos sugerties.

Taigi pradiniai dozės parametrai ir audinio atsakas FNT metu vieni kitus veikia įvairiais būdais. Kaip visos šios tarpusavio priklausomybės turėtų būti įskaitytos į fototerapines dozes? Vienas iš būdų būtų išmatuoti kiekvieną parametą atskirai ir nepriklausomai ir nustatant galutinį dozės matą apimti visus parametrus į modelį, parodantį, kaip FNT atsakas priklauso nuo visų kintamųjų. Tokiu atveju, tai būtų “**tiksliai dozė**”, nes kiekvienas kintamasis būtų tiksliai išmatuotas. Kitas būdas – “**numanoma dozė**” – naudojant vieną matą, pavyzdžiui, fotoblukimą, kuris numanomai apima keletą

arba visus dozės parametrus, nors jie tiesiogiai nematuojami.

Abiejų būdų privalumai ir trūkumai pateikti 6.1 lentelėje ir aptariami toliau.

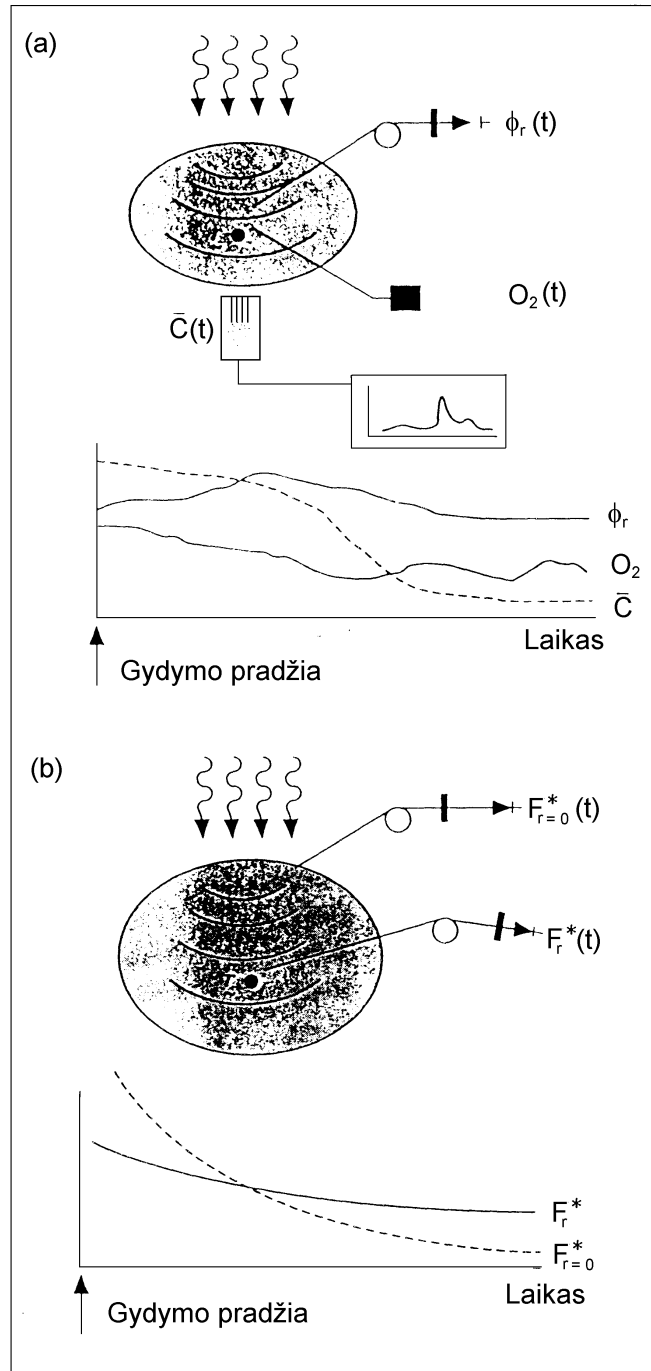
Tiksli dozė. Tikslios dozės matai, šiuo metu dažniausiai vartojami FNT, pavaizduoti 6.27 (a) ir 6.28 (a) paveiksluose. Paprasčiausiu atveju jie apima vidurkinės fotosensibilizatoriaus koncentracijos gydomame audinyje ir aplink jį nustatymą prieš švitinimą ir šviesos intensyvumo išmatavimą švitinamame tūryje ir aplink jį. Tokio įvertinimo privalumas “klasikinio” – pacientui paskirtos sensibilizatoriaus ir švitinimo dozės – atžvilgiu leidžia įvertinti kiekvieno paciento skirtingas sensibilizatoriaus farmakokinetikas ir audinių optines savybes. Šiuolaikinė technika leidžia tai atlikti invaziniais ar neinvaziniais metodais (Jones ir Grossweiner, 1996). Laikomasi išankstinės prielaidos, kad navike susikaupusio sensibilizatoriaus koncentracijos ir švitinimo intensyvumo sandauga atspindi numatomą audinių atsaką. Yra darbų (Patterson ir kt., 1990; Chen ir kt., 1996), teigiančių, kad slenkstinės dozės, apskaičiuotos pagal tikslus lokaliai sensibilizatoriaus koncentracijos ir švitinimo galios matavimus, specifiniams audinio-sensibilizatoriaus dariniais gana tiksliai nusako galutinį audinių atsaką – viso naviko tūrio nekrozę. Tačiau taip pat yra darbų, kurie parodė, kad sensibilizatoriaus koncentracijos ir šviesos intensyvumo sandauga nėra tinkamas gydymo rezultato pranašautojas tiek *in vivo* (Foster ir kt., 1991) tiek ir *in vitro* (Foster ir kt., 1993). Kai matuojama tik sensibilizatoriaus koncentracija ir švitinimo galia, nėra įskaitomas fotocheminis deguonies nuskurdinimas. Galima būtų atlikti deguonies kiekio audiniuose matavimą, tačiau tam reikia sudėtingos ir brangios aparatūros.



6.27 pav. Energijos lygmenų diagramos, kuriose nurodyti dozių matai (*): (a) šviesos intensyvumas, fotosensibilizatoriaus koncentracija, deguonis audiniuose; (b) sensibilizatoriaus fotoblukimas; (c) singuletinio deguonies koncentracija (pvz., matuojant liuminescenciją ties 1270 nm; (d) sensibilizatoriaus sužadavimo į tripletinę būseną parametrai; (e) biocheminių/biologinių pokyčių švitinimo metu įvertinimas (pagal (Wilson ir kt., 1997))

Tikslios dozės vertinimo privalumas yra toks, kad jį galima naudoti ir tuomet, kai nėra pastebimų sensibilizatoriaus pokyčių, tokių kaip fotoblukimas, kurie būtini vertinant numanomą dozę. Tikslios dozės vertinimą galima patobulinti, įskaitant tokius faktorius kaip sensibilizatoriaus fotoblukimas ar optinių savybių kitimas matavimo metu. Kompleksinis visų dozės parametrų matavimas yra labai komplikotas techniškai, o galutiniam atsakui įvertinti panaudojant visus matavimus reikalingas modelis, kurį sudėtingai biologinei sistemai sukurti labai sunku. Tačiau svarbiausias tikslios dozės

vertinimo ribotumas tas, kad į ją neįskaitomi fotofizikiniai/fotocheminiai FNT vyksmai. Jie yra įtraukti į **numanomą** dozės vertinimą.



6.28 pav. Tikslios (a) ir numanomoms (b) dozės matų schema. Matavimai atliekami arba audinio paviršiuje, arba reikiamame taške r . ϕ – šviesos intensyvumas, c – vidurkinė sensibilizatoriaus koncentracija audiniuose ir F^* – švitinimo metu matuojama sensibilizatoriaus fluorescencija (pagal (Wilson ir kt., 1997))

6.1 lentelė. Tikslios ir numanomos dozių vertinimo privalumai ir trūkumai

Tiksli	Numanoma
+Neturi griežtų išankstinių prielaidų	+Apima “visus” fotofizikinius /fotocheminius/fotobiologinius faktorius
+Sensibilizatoriaus fotoblukimas nėra būtinas faktorius	+Lengvai realizuojama techniškai, reikalingas tik fluorescencijos matavimas
– Reikia modelio, apimančio visus faktorius	– Neatskiria fotobiologinių ir fotosensibilizatoriaus fluorescencinių pokyčių
– Sudėtinga techniškai: visas duomenų rinkinys greičiausiai bus neįmanomas	– Kiekybinei informacijai gali prireikti papildomų duomenų (pvz., audinių optinės savybės)
– Neįskaito mikrofaktorių (pvz., deguonies nuskurdinimo)	– Neaišku, kaip apibrėžti veiksmingąją dozę

Numanomos dozės vertinimas. Šio dozės vertinimo tikslas – panaudoti matą, kuris apimtų kiek įmanoma visus atsaką nulemiančius gydymo faktorius ir jų tarpusavio priklausomybes. Tada nereikėtų tų faktorių atskirai matuoti ir kurti juos apimančių modelių. Kaip matyti 6.27 (b) ir 6.28 (b) paveiksluose, dozės matuose turi atsispindėti fotofizikiniai/fotocheminiai/fotobiologiniai parametrai.

Vertinant numanomą dozę svarbiausias matas yra sensibilizatoriaus fotoblukimas. Jį gana paprasta sekti *in vivo*, nes fluorescencinis metodas yra labai jautrus, tad tinkamas net ir tuo atveju, kai sensibilizatoriaus koncentracija ar fluorescencijos kvantinis našumas maži. Taigi FNT metu yra registruojamas matas F^* , t. y. fotosensibilizatoriaus fluorescencija *in vivo* (sunormuota į žadinančios šviesos intensyvumą). Sensibilizatoriaus fotoblukimas susijęs su jo fotocheminiu sužadinimu, taigi ir su fotobiologiniu poveikiu audiniams. Čia turėtų būti aptarti du galimi atvejai: ar fotoblukimą sukelia singuletinis deguonis 1O_2 , kuris yra atsakingas už fotodinaminį poveikį, ar ne. Šiems atvejams atskirti bus naudojami terminai “susijęs” ir “nesusijęs”. Susijimo laipsnis nusako sensibilizatoriaus fotoblukimo dalį, vykstančią dėl sensibilizatoriaus susidūrimų su 1O_2 , palyginti su fotoblukimu, vykstančiu dėl kitokių procesų, nedalyvaujančių fotodinaminiame poveikyje. Susijęs fotoblukimas 6.27 (b) paveiksle pažymėtas trūkia linija, rodančia neigiamą grįžtamąjį 1O_2 poveikį sensibilizatoriaus pagrindinei būsenai.

Susijimo laipsnis reikalauja išskirti du atvejus, kaip fotoblukimo matavimas turėtų būti interpretuojamas ir taikomas kaip FNT dozės matas. Iliustracijai panaudojami du kraštutiniai atvejai. Jei sensibilizatoriaus fotodestrukcija yra visiškai nesusijusi, tai

fotoblukimas reiškia sužadinto sensibilizatoriaus praradimą švitinimo metu. Iš to aiškėja, kad veiksmingoji FNT dozė tokiu atveju bus išreiškiama švitinimo šviesos intensyvumo φ_0 , integruotos fluorescencijos $\int F^*(\varphi)d\varphi$ ir deguonies kiekio audiniuose sandauga ($D \sim \varphi_0 \times \int F^*(\varphi)d\varphi \times O_2$). Kiekvienam iš faktorių didėjant, dozė didėja. Žymus fotoblukimas silpnina fotodinaminį poveikį, nes prarandamas fotoaktyvus sensibilizatorius. Esant visiškam susijimui (grįžtamasis ryšys – 100%), kuo intensyvesnis singuletinio deguonies generavimas (tuo pačiu ir fotodinaminis poveikis), tuo greitesnis fotoblukimas. Šiuo atveju intensyvus fotoblukimas atitinka stiprų fotodinaminį poveikį. Praktiškai visada egzistuos tik tam tikras susijimo laipsnis, nes 1O_2 gali dalyvauti reakcijose su daugeliu kitų cheminių junginių.

Svarbu pažymėti, kad nepaisant to, ar fotoblukimas yra susijęs, ar nesusijęs, jis turi būti įtrauktas į dozės matą kaip audinių atsako atitikmuo. Taigi abu atvejus skiria tik su audinių atsaku koreliuojančio dozės mato forma.

Pateikiamas pavyzdys, kaip gali būti išvestas numanomos dozės matas, pasinaudojant sensibilizatoriaus pagrindinėje būsenoje $[S_0]$ ir biologinių taikinių $[A]$ koncentracijomis (Wilson ir kt., 1997) ir taikant pasiūlytas (Georgakoudi ir kt., 1997) formules:

$$d[S_0]/dt = -k_{os} [S_0][^1O_2] \quad (6.11)$$

ir

$$d[A]/dt = -k_{oa} [A][^1O_2] \quad (6.12)$$

čia: $[^1O_2]$ – singuletinio deguonies koncentracija t momentu, k_{os} ir k_{oa} – singuletinio deguonies sąveikos su sensibilizatoriumi ir biologiniais taikiniais greičio konstantos. Iš 6.11 ir 6.12 seka:

$$[A](t)/[A](0) = \{ [S_0](t)/[S_0](0) \}^{k_{oa}/k_{os}} \quad (6.13)$$

Tariant, kad registruojamas fluorescencijos signalas $F^*(t)$ yra proporcingas $[S_0](t)$,

$$[A](t)/[A](0) = \{ F^*(t)/F^*(0) \}^{k_{oa}/k_{os}} \quad (6.14)$$

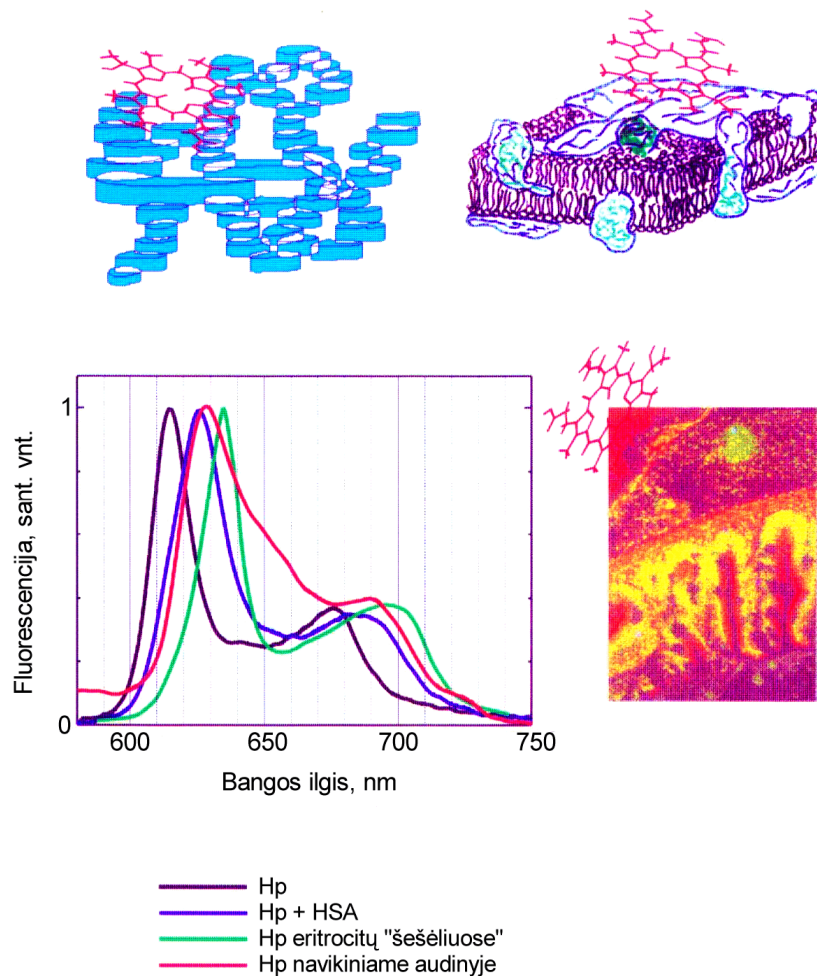
Taigi jei “išgyvenusių” taikinių dalis yra galimo biologinio atsako atitikmuo, tai po gydymo išmatuotos fluorescencijos santykis su pradine būtų tinkamas susijusio fotoblukimo dozės matas. Naudojantis šiomis supaprastinančiomis prielaidomis nereikia tiksliai matuoti šviesos intensyvumo, deguonies koncentracijos ar absoliučios

sensibilizatoriaus koncentracijos, audinių atsako atitikmeniu galima naudoti fluorescencijos signalo silpnėjimą. Tačiau dar lieka empiriškai nustatyti, koks fluorescencijos signalo silpnėjimas atitinka pageidaujamą biologinį atsaką reikiamam sensibilizatoriui ir audiniui – nuo to priklausys, kaip šis paprastas numanomos dozės vertinimo matas tiks klinikinėje praktikoje.

Svarbus šio dozės vertinimo būdo privalumas yra tai, kad jis apima sudėtingus fotofizikinius/fotocheminius ir fotobiologinius FNT vyksmo faktorius. Jei sensibilizatorius yra visiškai susijęs, išmatuotas fluorescencijos pokytis F^* gali būti tinkamas dozės matas. Iš dalies susijusio arba nesusijusio fotoblukimo atveju reikia kartu išmatuoti kai kuriuos kitus tikslios dozės faktorius, pavyzdžiui, pradinę sensibilizatoriaus koncentraciją arba švitinimo dozę. Nors F^* matavimas techniškai yra gana paprastas, patikimų kiekybinių fluorescencijos *in vivo* matavimo rezultatų gavimo praktikoje uždavinys dar nėra iki galo išspręstas.

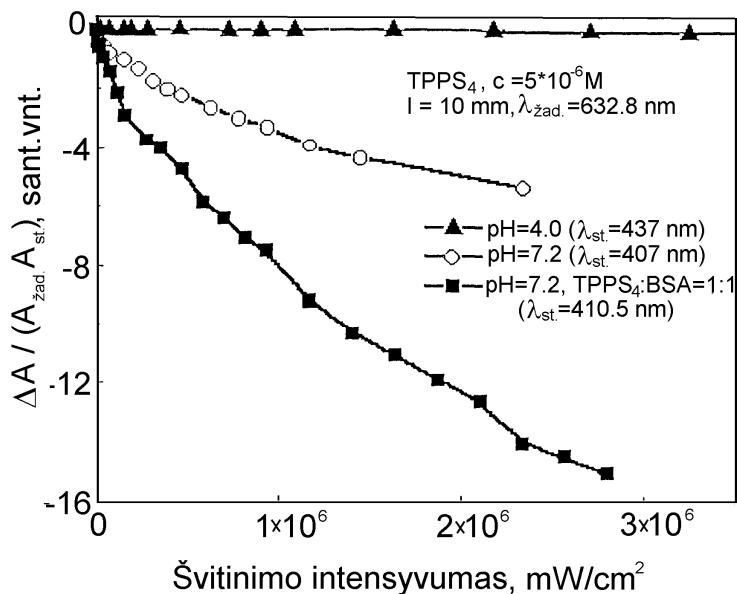
6.6. Sensibilizatoriaus fotofizikiniai parametrai ir dozės vertinimas

Sensibilizatoriaus fotoblukimo, kaip gydymo metu suteiktos veiksmingos dozės indekso, matavimas yra patrauklus ir patogus metodas, tačiau, kol jis taps visuotinai taikomas klinikinėje praktikoje, turės būti įvertinta daugelio faktorių įtaka jam. Remdamiesi mūsų eksperimentiniais rezultatais aptarsime, kaip sensibilizatorių fotostabilumas priklauso nuo aplinkos parametrų ir kokią įtaką šios priklausomybės gali turėti vertinant veiksmingą dozę pagal sensibilizatoriaus fotoblukimą FNT metu (Strečkytė ir kt., 1999).



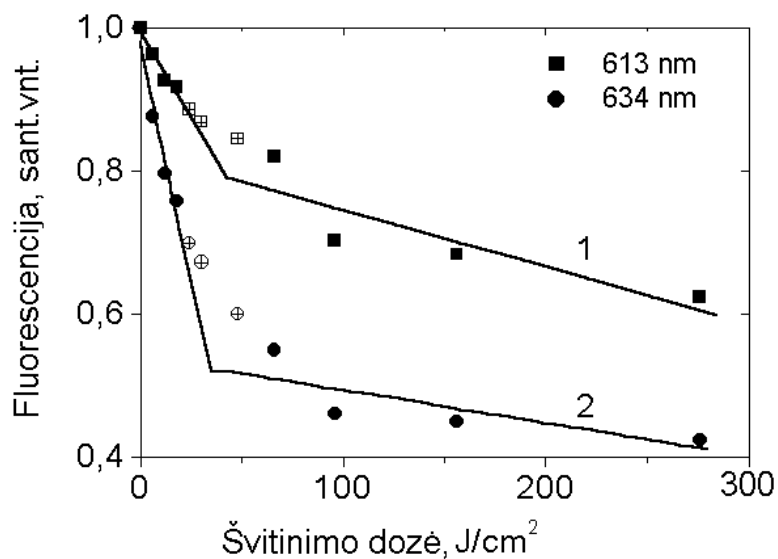
6.29 pav. Hp fluorescencijos spektrai įvairiose terpėse

FNT efektyvumas priklauso ir nuo sensibilizatoriaus viduląstelinio pasiskirstymo. Paprastai visi FNT naudojami sensibilizatoriai kaupiasi įvairiuose ląstelių kompartmentuose, išskyrus branduolį. Nuo sensibilizatoriaus sąveikos su specifine aplinka priklauso jo fotofizikinės savybės – šviesos sugertis, fotomodifikacijos greitis ir eiga. Dėl sąveikos su biologine aplinka (žmogaus serumo albuminu, eritrocitų "šešėliais" ir navikiniu audiniu) Hp fluorescencijos spektre atsiranda pokyčių (6.29 pav.): albumino aplinkoje Hp emisijos spektras pasislenka į ilgesnių bangų pusę, dėl sąveikos su eritrocitų šešėliais šis poslinkis dar ryškesnis ir išplatėja antra juosta. Dar ryškiau šie pokyčiai matomi navikiniame audinyje susikaupusio Hp fluorescencijos spektre. Baltymo aplinkoje sensibilizatoriaus blukimas ir fotoprodukto formavimasis vyksta greičiau (6.11 pav. ir 6.30 pav.).



6.30 pav. TPPS₄ fotoblukimo kinetikos įvairiose vandeninėse terpėse

Kai sensibilizatorius susikaupęs ląstelių membranose, jis sąveikauja su membranos komponentais – lipidais ir baltymais – ir dėl to kinta jo fotoblukimo greitis (6.31 pav.).

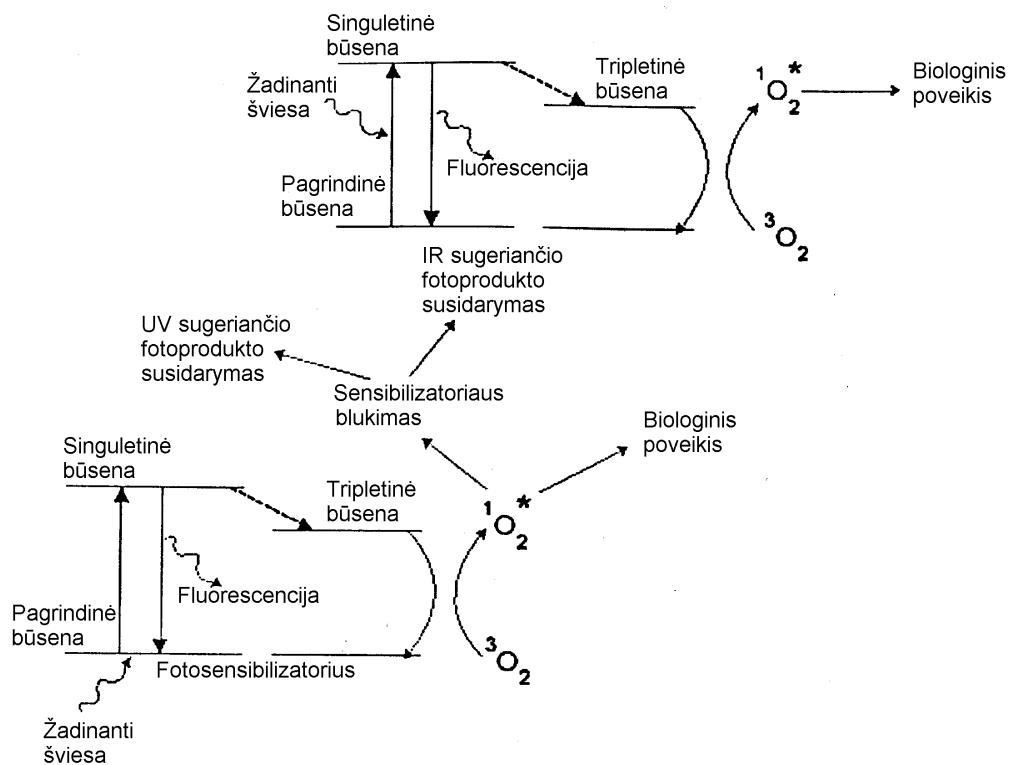


6.31 pav. Hp “eritrocitų šėšėliuose” fotoblukimo kinetikos

Laisvo Hp (tirpale), kurio fluorescencijos maksimumas ties 613 nm, fluorescencijos intensyvumas mažėja lėčiau negu su membranos komponentais sąveikaujančio Hp, kurio fluorescencijos maksimumas ties 634 nm. Taigi sensibilizatoriaus fotoblukimo sparta priklauso nuo aplinkos, kurioje jis lokalizuotas. Citozolyje susikaupę porfirininės kilmės sensibilizatoriai bluks mažiau negu susikaupę membranose ar sudarantys kompleksą su

baltymu. Sensibilizatoriaus blukimo sparta, taigi ir matas, naudojamas numanomos dozės skaičiavimui, priklausys nuo santykinio sensibilizatoriaus pasiskirstymo tarp ląstelės komponentų. Tad, naudojant fotoblukimą kaip numanomos dozės matą, reikalingos pataisos, atitinkančios sensibilizatoriaus kiekį kiekvienoje mikrolokalizacijoje. Vertinant fotoblukimo greitį kaip audinių atsako rodiklį, reikia atsižvelgti ir į tai, kad koreliacija nebus tiesioginė, o priklausys nuo deguonies koncentracijos ir singuletinio deguonies generavimo atskiruose ląstelės kompartmentuose kvantinio našumo, taip pat ir nuo pažaidoms jautrių taikinių kiekio arti singuletinio deguonies generavimo vietos. Pavyzdžiui, mitochondrijos membranoje generuotas $^1\text{O}_2$ sukels daug pavojingesnes pažaidas negu ląstelės citozolyje.

Sensibilizatorių fotoblukimo sparta kinta keičiantis terpės pH. Fotoblukimo kinetikose, sunormuotose į sugertų kvantų skaičių ir pradinę sugertį (Strečkytė ir kt., 1999), aiškiai matyti, kad rūgščioje terpėje sensibilizatorius yra daug stabilesnis negu neutralioje (6.30 pav.). Yra žinoma, kad kai kurie sensibilizatoriai, pavyzdžiui, TPPS₄ ar uroporfirinas (Berg ir Moan, 1994; Schneckenburger ir kt., 1995), geriausiai kaupiasi lizosomose, kur terpės pH < 5. Tad sensibilizatorių frakcijos, susikaupusios lizosomose ir kituose ląstelių kompartmentuose, bluks skirtingu greičiu.



6.32 pav. Energijos lygmenų diagrama, nurodanti galimą fotoproductų dalyvavimą sensibilizacijos procese

FNT metu fotosensibilizatorius ne tik blunka, bet ir sudaro fotoproduktus. Fotoproduktai turi įtakos sensibilizacijos procesui, todėl jų susidarymas turėtų būti įskaitytas vertinant FNT dozes (Rotomskis ir kt., 1998). Sąveika su biologine aplinka paprastai paspartina fotoproduktų susidarymą (6.11 pav.). Švitinimo metu susidaręs fotoproduktas, sugeriantis raudoną šviesą, gali dalyvauti sensibilizacijos procese. Pasinaudodami energijos lygmenų diagrama, vaizduojančia fotoblukimą kaip numanomos dozės matą (Wilson ir kt., 1997), siūlome schemą, kurioje matyti, kaip susidaręs fotoproduktas gali generuoti singuletinį deguonį (6.32 pav.).

Kaip matyti, dėl procesų sudėtingumo ir daugelio faktorių įtakos kol kas sunku labai preciziškai įvertinti veikliąją dozę. Labai svarbu suprasti įvairių dozės parametrų tarpusavio sąveikas ir įtakas bei surasti tokį FNT dozės matą, kuris gerai koreliuotų su audinių atsaku ir būtų gydymo efektyvumo pranašautojas. Būtina spręsti šias sudėtingas problemas siekiant gauti geresnius FNT rezultatus.

Literatūra

Bagdonas S., R. Wendenberg, W. Dietel, R. Rotomskis (1996) Photomodification of Hp accumulated in erythrocyte cell ghosts. Proc.SPIE, 2625, 339-355.

Bagdonas S., A. Jasaitis, Jr. (1997) Photostability of sensitizers in various model systems: a spectroscopic study. Biologija, Nr.1, 81-86.

Berg K., J. Moan (1994) Lysosomes as photochemical targets. Int.J.Cancer, 59, 814-822.

Braichotte D.R., J.F. Savary, P. Monnier et al (1996) Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinoma of the esophagus using fluorescence spectroscopy. Lasers Surg.Med., 19, 340-346.

Braichotte D.R., G.A. Wagnieres, R. Bays et al. (1995) Clinical pharmacokinetic studies of photofrin by fluorescence spectroscopy in the oral cavity, the esophagus, and the bronchi. Cancer, 75, 2768-2778

Chen Q., M. Chopp, L. Madigan (1996) Damage threshold of normal rat brain in photodynamic therapy. Photochem.Photobiol., 64, 163-167.

Cheong W.F., S.A. Prahl, A.J. Welch (1990) A review of the optical properties of biological tissues. IEEE J.Quant.Electr., 26, 2166-2185.

Cox G.S., D.G. Whitten (1982) Mechanisms for the photooxidation of

protoporphyrin IX in solution. *J.Am.Chem.Soc.*, 104, 516-521.

Fingar V.H., W.R. Potter, B.W. Henderson (1987) Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor cell clonogenicity and histologic changes. *Photochem.Photobiol.*, 45, 643-650.

Foster T.H., L. Gao (1992) Dosimetry in photodynamic therapy: oxygen and the critical importance of capillary density. *Radiat.Res.*, 130, 379-383.

Foster T.H., D.F. Hartley, M.G. Nichols et al. (1993) Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.*, 53, 1249-1254.

Foster T.H., R.S. Murant, R.G. Bryant et al. (1991) Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat.Res.*, 126, 296-303.

Georgakoudi I., M.G. Nichols, T.H. Foster (1997) The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem.Photobiol.*, 65, 135-144.

Giniūnas L., R. Rotomskis, V. Smilgevičius, A. Piskarskas, J. Didžiapetrienė, L. Bloznelytė, L. Gričiūtė (1991) Activity of haematoporphyrin derivative photoproduct in photodynamic therapy in vivo. *Lasers Med.Sci.*, 6, 425-428.

Grossweiner L.I.(1986) Optical dosimetry in photodynamic therapy. *Lasers Surg.Med.*, 6, 462-466.

Inhoffen H.H., H. Brockmann, Jr., K.M.Bliesener (1969) Photoprotoporphyrine und ihre Umwandlung in spirographis sowie isospirographis Porphyrin. *Liebigs Ann.Chem.*, 730, 173-185.

Jasaitis A., Jr., G. Streckyte, R. Rotomskis (1996) Photophysics of sensitizer-protein complexes. *Lith. Journal of Physics*, 36, 299-302.

Jones L.R., L.I. Grossweiner (1996) Effects of Photofrin on in vivo skin reflectivity. *J.Photochem.Photobiol., B:Biol.*, 33, 153-156.

Juzėnas P., J. Didžiapetrienė, L. Stačiokienė, V. Gudelis, J. Slavėnas, R.Rotomskis (1996) Photomodifications of photodrugs in tumor.*Proc.SPIE*, 2625, 499-506.

Mang T.S., T.J. Dougherty, W.R. Potter, D.G. Boyle, S. Sommer, J. Moan (1987) Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem.Photobiol.*, 45, 501-506.

Moan J. (1986) Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *Cancer Lett.*, 33, 45-53.

Patterson M.S., B.C. Wilson, R. Graff (1990) In vivo tests of the concept of

photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochem.Photobiol.*, 51, 343-349.

Potter W.R., T.S. Mang, T.J. Dougherty (1987) The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photo- destruction of sensitizer. *Photochem.Photobiol.*, 46, 96-101.

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

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

Rotomskienė J., T.Aartsma, T.M.A.R.Dubbelman, R.Rotomskis (1989) The spectral properties of hematoporphyrin photoproduct. *Lith.J.Physics*, 29, 477-482.

Rotomskiene J., R. Kapociute, R. Rotomskis, G. Jonusauskas, T. Szito, A. Nizhnik (1988) Light-induced transformations of hematoporphyrin diacetate and hematoporphyrin. *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 2, 373-379.

Rotomskienė J., R.Rotomskis, T.M.A.R.Dubbelman (1990) Structure of hematoprotein photoproducts in aqueous solutions. *Zh.prikl.spektroskopii*, 53, 829-834.

Rotomskis R., S. Bagdonas, G. Streckyte (1996) Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 33, 61-67.

R. Rotomskis, S. Bagdonas, G. Streckyte, R. Wendenberg, W. Dietel, J. Didziapetriene, A. Ibelhauptaite, L. Staciokiene (1998) Phototransformation of sensitizers: 3.Implications for clinical dosimetry. *Lasers Med Sci.*, 13, 271-278.

Rotomskis R., G. Streckyte, S. Bagdonas (1997 a) Phototransformations of sensitizers: 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins. *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 39, 172-175.

Rotomskis R., G. Streckyte, S. Bagdonas (1997 b) Phototransformations of sensitizers: 1. The significance of the nature of the sensitizer for photobleaching and photoproduct formation in aqueous solution. *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 39, 167-171.

Rotomskis R., V. Vaičaitis, A. Piskarskas (1993) Time-resolved absorption spectroscopy of hematoporphyrin and its photoproducts. *Chem.Phys.Lett.*, 202, 233-236.

Schneckenburger H., M.H. Gschwend, R.Sailer et al. (1995) Time-resolved pH-dependent fluorescence of hydrophilic porphyrins in solution and in cultivated cells,

J.Photochem.Photobiol., B: Biol., 27, 251-255.

Smith K.M. (1975) General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1-28.

Stone H.B., J.M. Brown, T.L. Philips et al. (1993) Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Rad.Res., 136, 422-434.

Strečkytė G., D. Frolov, S. Bagdonas, P. Juzėnas, R. Rotomskis (1999) Can photodynam-ic dose be predicted on sensitizer's photophysical parameters? www.photobiology.com/photobiology99

Van Geel I.P.J., H. Oppelaar, Y.G. Oussoren, F.A. Stewart (1994) Changes in perfusion of mouse tumours after photodynamic therapy. Int.J.Cancer, 56, 224-228.

Wike-Hooley J.L., J. Haveman, H.S. Reinhold (1984) The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. Radiother.Oncol., 2, 343- 366.

Wilson B.C., M.S. Patterson, D.M. Burns (1986) Effect of photosensitizer concentration in tissue on the penetration depth of photoactivating light. Lasers Med.Sci., 1, 235-244.

Wilson B.C., M.S. Patterson, L. Lilge (1997) Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. Lasers Med.Sci., 12, 182-199.

SUMMARY

6. PHOTOSTABILITY AND PHOTOTRANSFORMATIONS OF SENSITIZERS AND IMPLICATIONS FOR PHOTOTHERAPIC DOSES

The resistance of dyes towards degradation by light has long preoccupied humanity. The fading of pictures and dyed textiles were studied by artists and chemists.

Most of photosensitizers used in photosensitized tumour therapy (PTT) are not photostable. In simple solutions as well as in complex environments photosensitizers undergo light-induced modification resulting in a decrease of their initial absorption and fluorescence intensity. This phenomenon is called photobleaching and includes the following photoprocesses: (1) photodegradation – the conversion of sensitizer into products that do not absorb visible light appreciably (Spikes ,1992); (2) photorelocalization – the alteration of photophysical properties due to the light-induced

migration of sensitizer from one binding site to another (Moan and Kessel, 1988) or (3) phototransformation - as in case of some porphyrins, leading to the formation of new red-absorbing photoproducts (Rotomskiene et al., 1988). Photobleaching has important consequences for PTT dosimetry. Photodegradation of the sensitizer results in a decrease in its initial concentration and, as a consequence, a lower sensitizing effect. This can be either advantage or disadvantage depending on the initial concentration of a sensitizer and its distribution in tumour and surrounding tissues (Mang et al., 1987). If the photosensitizer bleaches too rapidly, tumour destruction will not be complete but the use of appropriate illumination doses can protect normal tissues from irreversible damage.

It has been shown that, together with photobleaching, the formation of red-absorbing photoproducts takes place (Rotomskiene et al., 1988). In clinical trials, photosensitizers are generally illuminated by red light. Therefore calculation of phototherapeutic dose requires additional information about the formation of red-absorbing photoproducts.

Investigations of the photostability of first generation photosensitizers. In the PTT field, the first relevant observation of photobleaching of Photofrin in NHIK 25 cells was reported in 1986 (Moan, 1986). Shortly afterwards, photobleaching was observed in patients receiving treatment with Photofrin (Mang et al., 1987).

The illumination of porphyrin in phosphate buffer solution (PBS) gives rise to changes in the absorption and emission spectra (Rotomskienė et al., 1988; Rotomskis et al., 1996).

(Fig.6.1. Emission spectra of 10^{-4} M Hp in PBS after illumination for 300 min $\{\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm (1), $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm (2), $\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm (3)}, and emission spectrum of separated fraction of photoproduct in methanol $\{\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm (4)}. Inset: non-illuminated Hp in PBS, $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm, under the same conditions. Fig. 6.2. Absorption spectra of non-illuminated (1) and illuminated (2) porphyrins in PBS, pH 7.1, concentration 10^{-4} M: a) TPPS₄, the illumination time 205 min., fluence rate 50 mW/cm² and b) HpD, 100 min., 100 mW/cm². Insets: the absorption-difference spectra (illuminated minus non-illuminated) of a) TPPS₄, C=3 10^{-6} M, b) Hp, C= 10^{-5} M). The absorption difference spectra in the insets of Fig.6.2 clearly show an appearance of the new bands in the UV region and at around 640 nm, and a corresponding bleaching of the Soret and Q absorption bands. The new absorption band observed around 640 nm belongs to red-absorbing photoproducts (Rotomskienė et al., 1988; Rotomskis et al., 1996). Careful

chromatographic and spectroscopic analysis showed that few types of photoproducts are formed in aqueous solutions of porphyrins on illumination (Rotomskis et al., 1997 a). Decay of the Soret band and an increase in absorbance in the spectral region of 240-320 nm indicate photomodification conditioned by porphyrin macrocycle disruption. The formation of UV-absorbing photoproducts is reflected by an increase in absorption in the region of 240-320 nm and can be explained as a photoinduced self-oxidized disruption of the porphyrin chromophore, yielding di- or monopyrroles.

Absorption spectra of the separated fractions of the illuminated Hp, containing photoproducts with absorption bands at 640 and 660 nm, are characteristic of the chlorin- and bacteriochlorin-type molecules, compounds with reduced double bonds in the positions 3-4 or 7-8, when macrocyclic conjugation is still maintained (Smith, 1975). The formation of the red-absorbing photoproducts from different precursors is favoured when sandwich-type aggregates are present. It seems that in these aggregates oxygen penetration would be limited and photoreduction process would occur to yield chlorin- and bacteriochlorin-type photoproducts.

The third photoproduct, detected in the irradiated Hp solution, can be attributed to the opening of macrocycle at the beginning of porphyrin photodegradation, resulting in the appearance of bilirubin-type molecules (Rotomskis et al., 1997 a).

On the basis of absorption and fluorescence changes in illuminated aqueous solutions of porphyrins a scheme of possible photoproducts is proposed (Fig.6.4. Scheme of possible photoproducts of porphyrins in aqueous solutions).

All the investigated photosensitizers undergo phototransformations on illumination but photoinduced spectral changes are different. Illumination of aqueous solutions of DMHp, Hp, HpD, TPPS₄, PS and PF results in absorption decrease throughout the spectrum and simultaneous appearance of new absorption bands in the UV region and at the red edge of the spectrum (Fig.6.5. Absorption difference spectra (illuminated minus non-illuminated) of investigated porphyrins in PBS, pH 7.2. Concentration 10⁻⁴ M. Illumination doses: TPPS₄ - 90 J, Hp - 150 J, DMHp, HpD and PS - 120 J). Sequence of the photobleaching efficiency of photosensitizers at the same amount of absorbed light is DMHp>Hp>HpD>PS>TPPS₄>PF.

Tumours are often found to have different (mostly lower) pH from the surrounding tissues (Wike-Hooley et al., 1984). The pH range 5-8 is of special

significance since many tumours have been reported to have pH values in this vicinity. The strong dependence between the acidity of a solution and the intensity of the band with the maximum at around 640 nm, i.e. the total amount of the photoproduct formed is observed (Fig.6.8. Distribution of Hp IX ionic species in an aqueous solution (Pottier and Kennedy, 1990) (curves 1-3) and dependence of HpD photoproduct 640 formation effectiveness on pH). (Rotomskis et al., 1996).

A part of the one of possible Hp acid-base equilibrium routes solution (Pottier and Kennedy, 1990) is given in Fig.6.8 together with a dependence of $\Delta A_{640}/A_{514}$ on pH. Photoproduct with absorption at 640 nm formation in the pH range of 5-10 is close to the curve reflecting the dominance of Hp anionic species in aqueous solution. Above the pH 10, a decrease in photoproduct formation efficiency is observed.

Seven ionic species caused by the protonation or deprotonation of nitrogen atoms are possible for all free base porphyrins, but only four of them (dication and monocation, neutral and dianion) have been observed spectroscopically (Pottier and Truscott, 1986). Hp, as well as other dicarboxylic porphyrins, can also release one or both protons from its side acid chains. The pH regulates the predominance of each ionic species and the conversions between them. It was suggested on the basis of the results obtained, that positively charged forms of porphyrins are photostable, while anionic forms induce the formation of the photoproduct (Rotomskis et al., 1996).

Photodegradation of sensitizers is strongly medium-dependent, and in organized media such as micelles, vesicles, protein-bound sensitizers and erythrocyte ghosts more complex mechanisms may influence the photobleaching rate of a sensitizer.

Illumination of porphyrin-human serum albumin (HSA) complex by light doses commonly used in PTT induces spectral changes similar to those of porphyrins aqueous solutions (Fig.6.10. Absorption spectra before and after illumination of Hp (C, 10^{-4} M) and Hp-HSA complex (at molar ratio 1:1) solutions). As is seen in Fig. 6.11 (A: Absorption decay curves of Hp registered at the maximum of third Q band; B: photoproduct formation curves registered at the maximum of formed photoproduct, 640 nm), the sensitizer-albumin interaction significantly accelerates the photobleaching process, especially at low illumination doses. The initial photoproduct formation is also higher in Hp solution with HSA (Bagdonas and Jasaitis, 1997).

Several experiments were also carried out with Hp in the presence of erythrocyte cell ghosts (ECG), which represent a good model of real cells with a natural

membrane containing lipids and proteins (Bagdonas et al., 1996; Bagdonas and Jasaitis, 1997). The light induced changes of Hp fluorescence spectra in the presence of ECG are shown in Fig.6.13 (The changes of Hp fluorescence spectra ($C = 10^{-4}M$) in a suspension of ECG upon irradiation. Insets: the same spectra normalized at 613 nm). The initial Hp spectrum (curve 1) possesses several characteristic peaks. These at 613 nm and at 678 nm belong to Hp in aqueous media, while that at 634 nm is characteristic for Hp interacted with ECG. Illumination of a sample results in the disappearance of the later peak. The total decay of Hp emission is followed by the formation of a new characteristic peak of the photoproduct at 642 nm.

A few photoprocesses were also studied under irradiation of tumours *ex vivo* (Juzenas et al., 1996). Efficient photobleaching of porphyrin emission bands at 630 and 690 nm was detected in all cases. This process was accompanied by the formation of a broad emission band in the spectral region 660-680 nm (Fig.6.14. Normalized fluorescence spectra of irradiated tumours sensitized with HpD and PS). Careful examination of the emission spectra of tumours *ex vivo* showed that the emission around 660 nm was related to photoproduct formation.

Experiments with the chlorin-type photoproduct formed from HpD, possessing a absorption band with a maximum at 640 nm, carried out on experimental animals revealed that it can act as a photosensitizer itself and provoke a positive photosensitized effect (Giniunas et al., 1991). Moreover, spectral and kinetic characteristics of non-irradiated and irradiated HpD (where the photoproduct formation was detected) shows that photoproduct may act as an intermediate of energy transfer from porphyrin molecules to cell substrate (Rotomskis et al., 1993). So the evidence of the chlorin-type photoproduct sensitization activity and fast energy transfer from hematoporphyrin molecules to photoproduct enabled creation of the new possible photosensitization scheme (Fig.6.20. Suggested participation of photoproducts in photosensitization).

Investigations of the photostability of second generation photosensitizers. Despite its apparent success, first generation sensitizers have important disadvantages. Therefore a number of second generation photosensitizers have been developed to overcome the shortcomings of hematoporphyrin derivatives. Second generation sensitizers have a strong absorbance at a longer wavelength where tissue penetration is at

a maximum. The photostability and phototransformations of several second generation sensitizers, chlorin e_6 (Cl_e_6), aluminium phthalocyanine tetrasulphonate ($AlPcS_4$) or meso-tetraphenylporphine tetrasulphonate ($TPPS_4$), was investigated (Rotomskis et al., 1997 b) and compared with the photostability of first generation sensitizers (Fig.6.22. Kinetics of absorption bleaching of the photosensitizers).

The sequence of the photobleaching efficiency of photosensitizers at the same amount of absorbed light is $Cl_e_6 > DMHp > Hp > HpD > PS > TPPS_4 > PF > AlPcS_4$. $AlPcS_4$ is the most photostable of the investigated porphyrins. $TPPS_4$ is also relatively photostable; its photobleaching rate is close to that of PF. Cl_e_6 is the least photostable. No photoproduct formation was observed in case of Cl_e_6 and $AlPcS_4$. Only a negligible amount of the photoproduct was detected in the solution of the photostable sensitizer, $TPPS_4$ (Fig.6.5).

Evaluation of phototherapeutic doses. The process of tumour destruction needs light to activate the intracellularly bound sensitizer. The PTT effect is generally accepted as being proportional to the product of sensitizer concentration and illumination dose. This relationship (Fig.6.25 (I)) Three cases to reach the equal phototherapeutic dose: (I) photostable sensitizer; (II) photolabile sensitizer (exponential decay) and (III) combined effect of photolabile sensitizer (a) and formed photoproduct (b). Vertical axis, relative concentration D of an active sensitizer; horizontal axis, light dose j (delivered to the surface of the tumour) has been generally referred to as the reciprocity of concentration and light dose (Grossweiner, 1986; Fingar et al., 1987). However, this theory does not take into account the effect of the destruction of sensitizer. Photobleaching of sensitizer increases the illumination dose needed to get the same effect in comparison with a stable sensitizer (Fig.6.25 (II)) (Potter et al., 1987). As photobleaching of Hp-type sensitizers is accompanied by the formation of red-absorbing photoproducts, a careful estimation of the illumination duration should include not only the photobleaching of sensitizer, but also the formation of photoproducts absorbing at the illumination wavelength.

A system of equations was produced and a formula for the evaluation of the phototherapeutic dose was proposed (Rotomskis et al., 1998).

The calculations, in which the appearance of the photodynamically active photoproduct has been taken into account, show that the illumination dose needed to gain the same phototherapeutic dose could be lower (Fig.6.25, (III)), since it is obtained as a sum of two effects: the destruction of the initial sensitizer (III a) leading to the decrease of its

concentration is partially compensated by the formation of the red-absorbing photoproduct (III b).

Photophysical parameters of sensitizers and dose evaluation. By the identification of more factors, which influence the efficacy of a treatment, the dosimetry in PTT is becoming increasingly complex. In the simplest way a dose in PTT have been described by specifying the administered dose of photosensitizer, the incident light dose and time interval between the administration of photosensitizer and light. Most clinical protocols still utilize only these three parameters for the selection of the effective dose, despite the fact that these parameters give only partial information about the real phototherapeutic dose. Usually, in the studies on PTT dosimetry only the photobleaching of sensitizer or photobleaching followed by the formation of photoproducts are discussed. Although the use of photosensitizer photobleaching in dosimetry is attractive in principle, there are a number of problems that should be resolved for it to become routinely useful. Some factors, such as localization, interaction with cellular compartments or environmental pH, which influence phototransformations of photosensitizers and by this the evaluation of phototherapeutic dose (Streckyte et al., 1999).

The photosensitizers used in PTT demonstrate diffuse localization in many cytoplasm compartments with the exception of nucleus. The degree of sensitizer coupling with the specific tissue environment induces changes in the absorption properties and photostability of sensitizers (Fig. 6.29. Fluorescence spectra of Hp in different environmet; Fig.6.30. Absorption decay curves of TPPS₄ in different environment; Fig.6.31. The changes of Hp fluorescence spectra in a suspension of ECG upon illumination). Localization in different compartments and binding with different biomolecules can alter not only sensitization properties but also the photobleaching rate and photoproduct formation efficacy.

The photobleaching rate of sensitizer is also dependent on pH (Rotomskis et al., 1996). This is especially important for photosensitizers preferentially localizing in lysosomes: fractions of sensitizers localized in lysosomes will photobleach with different rate than fractions localized in other cell compartments.

There is no easy usable method to evaluate biochemical and physiological tissue response to PTT and to correlate it with the effective delivered dose. Therefore, in spite of all mentioned and not mentioned shortages, the use of photophysical characteristics as an index of delivered phototherapeutic dose to date seems to be the most reliable parameter.

References

- Bagdonas S., A. Jasaitis, Jr. (1997) *Biologija*, Nr.1, 81-86.
- Bagdonas S., R. Wendenberg, W. Dietel, R. Rotomskis (1996) *Proc.SPIE*, 2625, 339-355.
- Fingar V.H., W.R. Potter, B.W. Henderson (1987) *Photochem.Photobiol.*, 45, 643-650.
- Giniūnas L., R. Rotomskis, V. Smilgevičius, A. Piskarskas, J. Didžiapetrienė, L. Bloznelytė, L. Gričiūtė (1991) *Lasers Med.Sci.*, 6, 425-428.
- Grossweiner L.I.(1986) *Lasers Surg.Med.*, 6, 462-466.
- Juzėnas P., J. Didžiapetrienė, L. Stačiokienė, V. Gudelis, J. Slavėnas, R.Rotomskis (1996).*Proc.SPIE*, 2625, 499-506.
- Mang T.S., T.J. Dougherty, W.R. Potter, D.G. Boyle, S. Sommer, J. Moan (1987) *Photochem. Photobiol.*, 45, 501-506.
- Moan J. (1986) *Cancer Lett*, 33, 45-53.
- Moan J., D.Kessel (1998) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1, 429-436.
- W.R., T.S. Mang, T.J. Dougherty (1987) *Photochem.Photobiol.*, 46, 96 101.
- Pottier R., J.C. Kennedy (1990) *J.Photochem.Photobiol. B.:Biol.*, 8, 1-16.
- Pottier R., T.G. Truscott (1986) *Int.J.Radiat.Biol.*, 50, 421-452.
- Rotomskiene J., R. Kapociute, R. Rotomskis, G. Jonusauskas, T. Szito, A. Nizhnik (1988) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2, 373-379.
- Rotomskis R., S. Bagdonas, G. Streckyte (1996) *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 33, 61-67.
- R. Rotomskis, S. Bagdonas, G. Streckyte, R. Wendenberg, W. Dietel, J. Didziapetriene, A. Ibelhauptaite, L. Staciokiene (1998) *Lasers Med Sci.*, 13, 271-278.
- Rotomskis R., G. Streckyte, S. Bagdonas (1997 a) *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 39, 172-175.
- Rotomskis R., G. Streckyte, S. Bagdonas (1997 b) *J.Photochem.Photobiol., B.:Biol.*, 39, 167-171.
- Rotomskis R., V. Vaičaitis, A. Piskarskas (1993) *Chem.Phys.Lett.*, 202, 233-236.
- Smith K.M. (1975) In: *Porphyryns and Metalloporphyryns*, Elsevier, Amsterdam, 1-28.
- Spikes J.D. (1992) *Photochem. Photobiol.*, 55, 797-808.

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

Strečkytė G., D. Frolov, S. Bagdonas, P. Juzėnas, R. Rotomskis (1999)
www.photobiology.com/photobiology99