

8. FNT TAIKYMAS DRAUGE SU KITAIŠ NAVIKŲ GYDYMO METODAIŠ

Siekiant optimalaus onkologiniŲ ligoniŲ gydymo rezultato, FNT taikoma drauge su kitais gydymo metodais – chirurgija, spinduline terapija, hipertermija, chemoterapija, imuniniais preparatais, elektros srove. Kombinuota navikŲ terapija turi daug privalumŲ. DviejŲ gydymo metodŲ poveikis gali bŲti adityvus arba sinergetinis. FNT efektyvumŲ galėtŲ padidinti jos derinys su kitu metodu, kurio panaudojimas sukeltŲ prieš tai FNT paveiktŲ navikiniŲ lŲsteliŲ galutinę žūtį. FNT kombinacija su kitais navikŲ gydymo metodais leistŲ sumažinti vartojamŲ veiksniŲ dozes, o kartu ir jŲ nepageidaujamŲ ŲalutiniŲ poveikį organizmui.

FNT taikymas po chirurginės operacijos yra perspektyvus būdas efektyviai pašalinti naviko liekanas. Po radikaliŲ chirurginės intervencijos visada išlieka pavojus naviko recidyvui (Frazier ir kt., 1989). Todėl reikalinga papildoma naviko guolio sterilizacija ir ją galima sėkmingai atlikti FNT metodu, kuris nesukelia nepageidaujamo Ųalutinio poveikio organizmui. Šviesos skvarbumas į audinius Ųiuo atveju nėra lemiamas veiksnys, nes navikinio audinio masė bus jau pašalinta chirurgiškai. Panaudojus FNT (fotosensibilizatorius fotofrinas) po chirurginio tiesiosios žarnos naviko pašalinimo gauta teigiamŲ klinikiniŲ rezultatŲ (Abulafi ir kt., 1992).

FNT buvo taikyta su spinduline terapija atliekant eksperimentinius (Bellnier, Dougherty, 1986; Grasczew, Shopova, 1986) ir klinikinius tyrimus (Kaye ir kt., 1987). Gauti rezultatai nėra vienareikšmiai. Kai kurie autoriai, atlikdami tyrimus su peliŲ sarkoma 180, nustatė padidėjusį priešnavikinį FNT efektyvumŲ kombinuojant ją su spinduline terapija (Grasczew, Shopova, 1986). Kiti, priešingai, gavo neženklŲ antagonistiniŲ ŲiŲ dviejŲ metodŲ kombinacijos poveikį žiurkėms su retinoblastoma (Winther ir kt., 1988). Eksperimentuose *in vitro* nustatyta, kad kombinuotos terapijos poveikis priklauso nuo Ųvitinimo dozės. Esant mažoms Ųvitinimo dozėms gautas sinergetinis poveikis, kai Ųvitimo dozės didesnės – poveikis silpnai antagonistinis (Valuckas ir kt., 1993; Ma ir kt., 1993).

Menkas Ųviesos skvarbumas į audinius riboja FNT galimybes. Ieškant būdŲ FNT efektyvumui padidinti, buvo išbandyta **kombinacija su elektros srove**. Suspensijoje ar audinyje esančią lŲstelę paveikus trumpu, tačiau gana stipriu elektrinio lauko impulsu,

vyksta ląstelės elektroporacija: jos membranoje susidaro hidrofilinės poros. Elektroporacijai taikomo elektrinio lauko stipris yra kilovoltų centimetru eilės, o elektriniai impulsai trunka nuo mikro- iki milisekundžių. Padidėjus membranos laidumui, į ląstelę gali patekti molekulės, kurios normaliomis sąlygomis ten neprasiskverbia. Audinių elektroporacijos metodas palengvina vaistų patekimą per odą: kai kurių medžiagų prasiskverbimas į organizmą sustiprėja 3–4 kartus. Elektroporacija audiniuose plačiausiai pritaikyta navikų elektrochemoterapijoje. Tai naujas vėžio gydymo metodas, kai kartu naudojami priešnavikiniai vaistai ir elektrinis laukas. Navikinio audinio elektroporacijos metu plazminėse ląstelių membranose susidaro mikroporos, per kurias į ląstelę patenka daugiau citotoksinių preparatų, sunkiai prasiskverbiančio per membraną normaliomis sąlygomis. Nustatyta, kad elektrochemoterapijos dėka kai kurių antinavikinių preparatų dozės galima sumažinti dešimtis ar net šimtus kartų (Šatkauskas, 1998).

Kadangi FNT efektyvumą lemia navikiniame audinyje susikaupusio sensibilizatoriaus koncentracija, buvo tirta elektroporacijos įtaka antrosios kartos sensibilizatoriaus chlorino e_6 farmakokinetikai bei įvertintas sinergetinis FNT ir elektroporacijos poveikis pelių navikams (Bagdonas ir kt., 2000). Elektroporacija paveiktų pelių navikiniame audinyje susikaupusio chlorino e_6 fluorescencija buvo intensyvesnė, palyginti su pelėmis, kurios nebuvo veikiamos elektroporacija. Taikant FNT drauge su elektroporacija smarkiai sulėtėjo pelių navikų augimo greitis (Bagdonas ir kt., 2000).

Pastebėta, kad HpD sensibilizuotų eritrocitų, prieš švitinimą paveiktų elektriniais impulsais, suyra kur kas daugiau negu nepaveiktų (Ward ir kt., 1996). Veikiant ląsteles elektriniais impulsais, padidėja jų membranų pralaidumas (Mir ir kt., 1995). Šis procesas yra grįžtamasis ir ląstelių gyvybingumas gali būti atkurtas. Tad kombinuotos terapijos sinergetinis efektas priklauso nuo laiko trukmės tarp elektrinio impulso poveikio HpD sensibilizuotiems eritrocitams ir apšvitinimo. Jei membranose lokalizuotas HpD sužadinas šviesa tuo metu, kai membrana yra labiausiai destabilizuota, žudantis fotoaktyvacijos poveikis bus didžiausias (Ward ir kt., 1996). Sensibilizuotas fotofrinu navikines WiDr ląsteles vienu metu veikiant šviesa ir 1 mA elektros srove, sinergetinis efektas gautas esant trumpam poveikiui (< 40 s). Esant ilgesnei trukmei (>60 s) bendras

poveikis buvo antagonistinis (Ma ir kt.,1993). Sinergetinio poveikio mechanizmą autoriai aiškina taip: FNT metu gali vykti ne tik II, bet ir I tipo sensibilizacinis procesas, jo metu susidaro krūvį turinčios dalelės (jonai ir laisvieji radikalai), kurios labai greitai rekombinuoja dėl priešingų krūvių traukos ir tampa neutraliomis dalelėmis. Todėl krūvį turinčios dalelės, galinčios inicijuoti navikinių ląstelių žūtį, rekombinuoja neatlikusios savo paskirties. Kai sensibilizuotos ląstelės yra švitinamos buferiniame tirpale, per kurį leidžiama elektros srovė, susidariusios krūvį turinčios dalelės juda priešingomis kryptimis prie elektrodų ir tai apsaugo jas nuo rekombinacijos ir “užgesimo”. Be to, FNT ir elektros srovės sukeltos membranų pažaidos taip pat sustiprina sinergetinį poveikį, nes ląstelių išorėje esančios sensibilizatoriaus molekulės lengviau patenka į vidų. Sensibilizacijos proceso metu susidarę labai aktyvūs ir ilgai gyvuojantys deguonies radikalai gali lengviau patekti į ląstelės vidų ir sukelti DNR pažaidas. Autoriai (Ma ir kt.,1993) mano, kad tinkamai parinkus abiejų metodų dozes galima pasiekti gerą sinergetinį efektą.

Sinergetinis efektas **taikant FNT su hipertermija** buvo pastebėtas ląstelių kultūroje (Mang, Dougherty, 1985), eksperimentinių gyvūnų (Waldow ir kt., 1987) ir žmonių navikuose (Wilson, 1989). Susidomėjimas FNT derinimu su hipertermija pagrįstas tuo, kad taikant hipertermiją kartu su chemoterapija ar spinduline terapija gauta geresnių gydymo rezultatų. FNT metu švitinimas sukelia švitinamame audinyje pastebimą temperatūros padidėjimą (Kinsey ir kt., 1983), kuris gali tiesiogiai pažeisti navikines ląsteles arba sustiprinti FNT sukeltą ardomąjį poveikį. Pastebėta, kad FNT efektas dėl hipertermijos labiausiai padidėja naviką veikiant aukšta temperatūra (44–45° C apie 30 min.) tuojau po FNT. Silpnėnis terapinis efektas gaunamas esant 2 ar daugiau valandų pertraukai tarp abiejų metodų taikymo ir naudojant žemesnę temperatūrą (<39,5° C) arba kai hipertermija taikoma prieš FNT (Henderson ir kt.,1985; Waldow ir kt., 1985). Jei hipertermija taikoma prieš FNT, šilumos sukelti efektai sumažina FNT efektyvumą. Aukšta temperatūra (44° C ir daugiau) smarkiai pažeidžia kraujagysles. Dėl to atsiradusios kraujosrūvos navikiniame audinyje labai sumažina šviesos pralaidumą ir greičiausiai deguonies kiekį – du svarbiausius sėkmingos FNT faktorius. Sinergetinio poveikio sumažėjimas esant didesnei laiko trukmei tarp FNT ir hipertermijos, matyt, yra susijęs su atkuriamaisiais FNT sukeltų pažaidų procesais (Henderson ir kt., 1985).

FNT taikoma su chemoterapija. Šviesa sužadintas fotosensibilizatorius generuoja toksiškas deguonies formas, pirmiausia singuletinį deguonį (Weishaupt ir kt., 1976), taip pat hidroksilo radikalus (Buettner, Need, 1985; Das ir kt., 1985). Naviko nekrozę sukelia tiesioginis toksiškų deguonies formų poveikis navikinėms ląstelėms arba netiesioginis, vykstantis dėl kraujagyslių pažeidimų (Henderson ir kt., 1985). Taikant FNT drauge su priešnavikiniais vaistais tikimasi pasiekti didesnę sinergetinį poveikį. Jau yra atlikta nemažai eksperimentinių studijų *in vitro* ir *in vivo* tiriant FNT ir priešnavikinių vaistų derinimo efektyvumą.

Kaip minėta (5 sk.), naviko destrukcija vyksta dalyvaujant deguoniui. Sugėręs šviesos kvantą sensibilizatorius iš žemutinės singuletinės būsenos per trumpai gyvuojančią sužadintą singuletinę būseną sužadina į ilgiau gyvuojančią tripletinę būseną, kur gali dalyvauti I ir/arba II tipo fotosensibilizacijos reakcijose. Daugelio tyrinėtojų parodyta, kad aktyviausia ardanti dalelė FNT procese yra singuletinis deguonis, kurį generuoja sužadintas fotosensibilizatorius, t. y. vyksta II tipo fotosensibilizacijos reakcija. Taigi aišku, kad FNT efektyvumas labai priklauso nuo deguonies dalyvavimo šiuose procesuose. Jei trūksta deguonies, fotosensibilizacijos reakcijos nevyksta. Dirbtinai sukėlus audiniuose hipoksiją, FNT poveikis buvo visai sustabdytas (Gomer, Razum, 1984). Kita vertus, vienas ryškiausių ir pirmiausia pastebimų FNT poveikių *in vivo* yra kraujotakos pažeidimas, kurių pasekmės naviko mikroaplinkai yra labai sunkios. Apšvitinus fotofrinu sensibilizuotus pelių ir žiurkių navikus, jau pirmomis švitinimo minutėmis pastebėta, kad kraujotaka sulėtėjo ir atsirado hipoksinių ląstelių frakcijų (Reed ir kt., 1988; Henderson, Fingar, 1987). Šių poveikių intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo laiko trukmės po apšvitinimo. Taigi žinant, kad daugelis navikų ir taip pasižymi sumažėjusiu deguonies kiekiu, švitinimo metu atsirandanti ląstelių hipoksija apsaugo jas nuo tolesnės destrukcijos, nes FNT poveikis deguonies deficito sąlygomis labai susilpnėja. Atsižvelgiant į tai, kad bioredukuojantys vaistai, tokie kaip mitomicinas C (MMC), nitroimidazolas ar jų analogai, esti toksiški hipoksinėmis sąlygomis, yra pagrįsta FNT sukeltą hipoksinę aplinką panaudoti citotoksiniams tokių vaistų poveikiui sužadinti. Jau pirmieji tyrimai parodė, kad derinant FNT su mizonidazolu, smarkiai sulėtėja navikų augimas (Gonzalez ir kt., 1986; Evensen, Moan, 1988). Autoriai (Evensen, Moan, 1988) nurodo, kad gydymo rezultatas priklauso nuo dviejų gydymo metodų panaudojimo sekos:

geras sinergetinis poveikis gautas mizonidazolą suleidus į gyvūnų organizmą po FNT; jei mizonidazolas buvo leidžiamas prieš FNT, pastebimo sinergetinio poveikio neaptikta.

Naudojant tradicinius pirmosios kartos fotosensibilizatorius – hematoporfirino darinį, fotofriną (sensibilizatorius suleidžiamas 24–48 val. prieš švitinimą) pastebėta, kad selektyvus fotosensibilizatorių kaupimasis audinių kraujagyslėse vyksta jau pirmomis valandomis po sensibilizatoriaus suleidimo. Tad galima manyti, kad anksčiau atliktas švitinimas daug stipriau pažeistų kraujotaką ir taip sudarytų geresnes hipoksines sąlygas bioredukuojantiems vaistams sužadinti (Bremner ir kt., 1992). Panaudojus antrosios kartos fotosensibilizatorių – aliuminio ftalocianino disulfonata ir derinant FNT su bioredukuojančiais vaistais (suleistais 20 min. prieš švitinimą), gautas ryškiai sulėtėjo navikų augimas (Bremner ir kt., 1992).

Mitomycin C (MMC) yra bioredukuojantis vaistas, kurio citotoksinis poveikis – DNR sintezės slopinimas. Klinikinė studija derinant FNT su MMC parodė, kad toks derinys palengvina gydymą, nes galima naudoti mažesnes sensibilizatoriaus dozes (sumažėja odos fototoksiškumas) arba mažesnes švitinimo dozes (sutrumpėja švitinimo laikas) (Baas ir kt., 1996). Panaudojus naują antrosios kartos fotosensibilizatorių mezo-tetrahidroksifenilchloriną ir derinant FNT su MMC švitinimo dozė sumažėja dvigubai (van Geel ir kt., 1995). Vis plačiau FNT taikoma 5-aminolevulino rūgštis (ALA), aktyvaus fotosensibilizatoriaus protoporfirino IX pirmtakas (plačiau 7 sk.). Panaudojus šį sensibilizatorių ir derinant FNT su MMC buvo tirtas šio derinio citotoksiškumas. Nustatyta, kad FNT derinys su MMC efektyviai veikia J82 linijos šlapimo pūslės navikines ląsteles, kurios yra atsparios MMC poveikiui (Data ir kt., 1997). Tai teikia vilčių, kad FNT gali padėti gydyti atsparias chemoterapijai navikų formas.

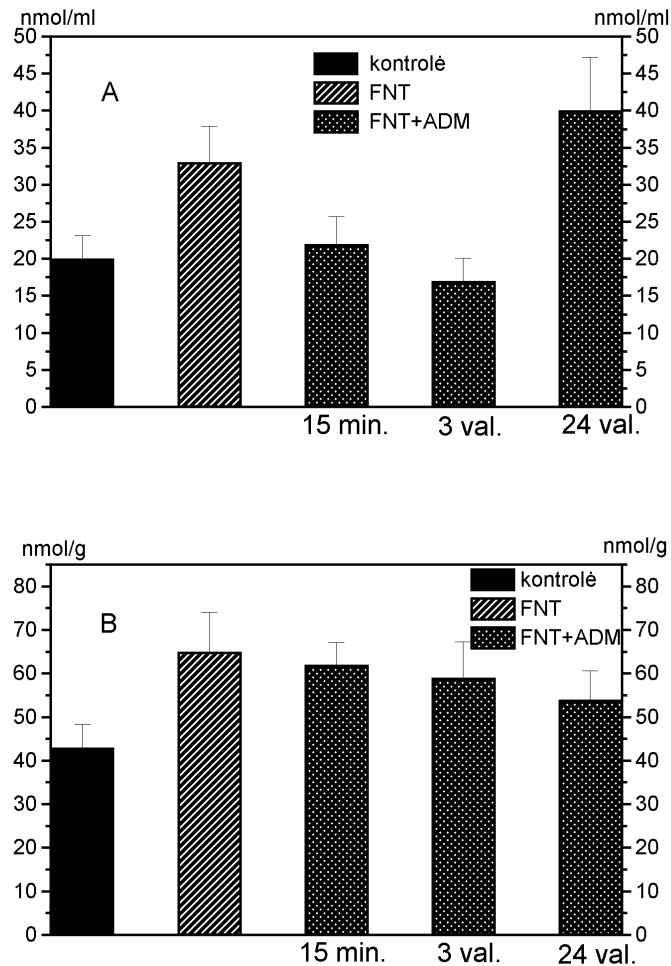
FNT ir MMC sąveikos mechanizmas nėra aiškus. Diskutuojama, ar didesnis FNT ir MMC derinio efektas gaunamas tik dėl vaisto bioredukuojančio poveikio, ar galimi ir kiti mechanizmai. Yra žinoma, kad ląstelių jautrumas FNT priklauso nuo ląstelių ciklo fazės. Kaip tik būdamos S fazėje ląstelės yra labiausiai jautrios FNT poveikiui (Christensen ir kt., 1981). Paaiškėjo, kad MMC padidina žmogaus gaubiamosios žarnos naviko ląstelių WiDr frakciją S fazėje, ir tai yra viena iš sinergetinio efekto priežasčių (Ma ir kt., 1993; Ma ir kt., 1995). MMC taip pat padidina fotosensibilizatoriaus fotofrino kaupimąsi ląstelėse (Ma ir kt., 1995). FNT ir MMC derinio citotoksiškumas priklauso

nuo gydymo metodų sekos: MMC naudojant prieš FNT gaunamas geresnis gydymo rezultatas (Ma ir kt., 1993).

Derinant FNT su mikrovamzdelių inhibitoriais vinkristinu ir taksoliu taip pat pastebėtas didesnis FNT terapinis efektas negu veikiant šiems gydymo faktoriams atskirai (Ma ir kt., 1996). Gydymo rezultatas irgi priklauso nuo metodų sekos, o efektas aiškinamas tuo, kad šie vaistai padidina monomerinio tubulino frakciją navikinėse ląstelėse, o monomerinis tubulinas yra vienas jautriausių FNT taikinių.

FNT kombinuota su adriamicinu. Adriamicinas (ADM), žinomas priešnavikinis vaistas, yra antraciklinų prigimties antibiotikas, kurio veikimas aiškinamas interkaliacija į DNR (DiMarco, 1975), sąveika su membranomis (Goormaghtigh ir kt., 1980), laisvųjų radikalų generacija (Handa, Sato, 1975). Kaip parodė pastarųjų metų tyrimai, šis vaistas yra efektyvus agentas derinant su FNT. Yra nemažai darbų, kuriuose pateikiami duomenys apie ryškią naviko destruktiją, gautą derinant FNT su ADM (Cowled ir kt., 1985; Cowled ir kt., 1987; Edell, Cortese, 1988; Cho ir kt., 1992; Nahabedian ir kt., 1988). Gydant pelių EMT-6 fibrosarkomą, atitinkamam efektui gauti pakako dvigubai mažesnės švitinimo dozės (100 J/cm^2) FNT taikant drauge su ADM negu gydant vien FNT (200 J/cm^2) (Nahabedian ir kt., 1988). ALA-FNT kombinuota su ADM slopina naviko augimą labiau negu vien ALA-FNT ar vien ADM (Casas ir kt., 1997). Sinergetinio poveikio mechanizmas nėra aiškus. Yra žinoma tik tai, kad tiek ADM, tiek porfirininės kilmės sensibilizatoriai kaupiasi mitochondrijose; tiek ADM, tiek FNT generuoja laisvuosius radikalus. Antraciklinų kilmės priešnavikiniai antibiotikai slopina glutationo peroksidazės, superoksidismutazės ir katalazės veiklumą, silpnėja antioksidacinės sistemos veikla ir ląstelės tampa jautresnės fotodinaminiam poveikiui. Yra duomenų, kad ADM veiklumą sustiprina hipertermija (Hahn, 1979). Nustatyta, kad tiek MMC, tiek ir ADM padidina porfirininės kilmės sensibilizatorių kaupimąsi navikinėse ląstelėse ir audiniuose ir tai, matyt, sąlygoja padidėjusį FNT efektyvumą. Daugelio darbų autoriai pastebi, kad sinergetinis efektas priklauso nuo veiksmų sekos, nuo laiko trukmės tarp jų, nuo dozių dydžio ir, žinoma, nuo naviko rūšies. Paprastai ženklus sinergetinis poveikis derinant FNT su priešnavikiniais vaistais gaunamas tada, kai vaistas suleidžiamas prieš FNT arba jos metu. Šis efektas gali būti indukuotas abiejų

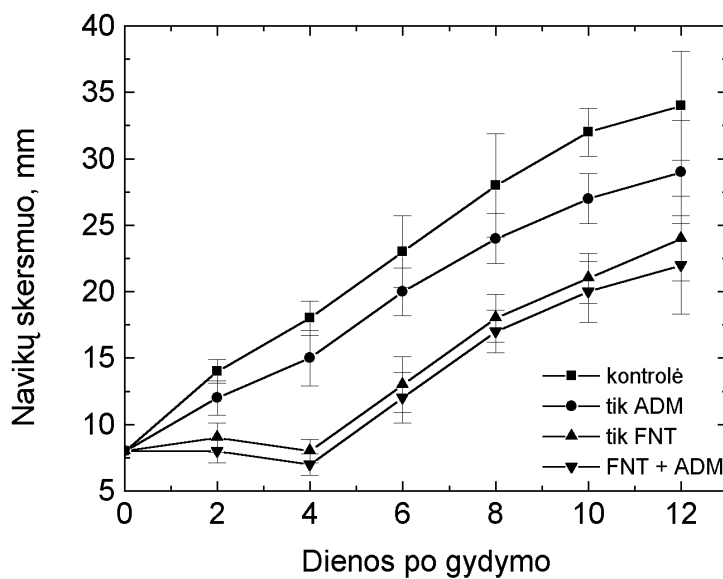
veiksnių. Matyt, vienas iš jų susilpnina ląstelių gynybinius mechanizmus, dėl to padidėja jautrumas kitam veiksniai (Cho ir kt., 1992; Casas ir kt., 1997).



8.1 pav. FNT ir FNT, taikytos drauge su ADM, poveikis MDA koncentracijai kraujo serume (A) ir navikiniame audinyje (B). FNT eiga: sušvirkštas fotofrinas, po 24 val. švitintas navikas, dar po 24 val. nustatyta MDA koncentracija. FNT-ADM eiga: sušvirkštas fotofrinas, po 24 val. sušvirkštas ADM ir navikai švitinti po 15 min., 3 ir 24 val.; praėjus 24 val. po švitinimo nustatyta MDA koncentracija

Atlikome FNT, derintos su ADM, efektyvumo tyrimus *in vivo*. Efektyvumas buvo vertintas pagal lipidų peroksidacijos produktų pokyčius bei DNR sintezę (tiesioginiai poveikiai), navikų augimo dinamiką (dinaminis poveikis) ir gydomųjų gyvūnų gyvenimo

trukmę (galutinis poveikis) (Strečkytė ir kt., 1999a). Kombinuotas gydymas buvo vykdomas tokiu režimu: CDF₁ pelėms su išskiepyta epidermoidine plaučių karcinoma į pilvo ertmę sušvirktas fotohemas (FH), dozė 10mg/kg. Po 24 valandų sušvirktas ADM, dozė 3 mg/kg, ir navikai švitinti aukso garų lazerio spinduliuote (λ , 628 ± 5 nm; intensyvumas, 200 mW/cm^2 ; dozė, 50 J/cm^2) po 15 min., 3 val. ir 24 val. Lipidų peroksidacijos produkto – maloninio dialdehido (MDA) koncentracija buvo nustatoma praėjus 24 val. po švitinimo. Kaip matyti 8.1 pav., tiek FNT, tiek FNT derinta su ADM padidina MDA kiekį navikiniame audinyje, tačiau padidėjimas FNT ir kombinuotos FNT metu paklaidų ribose yra toks pat. Tad pagal šį rodiklį vertinant gydymo efektyvumą (Perret ir kt., 1994) kombinuota FNT nėra pranašesnė už FNT – sinergetinio efekto neaptikome.

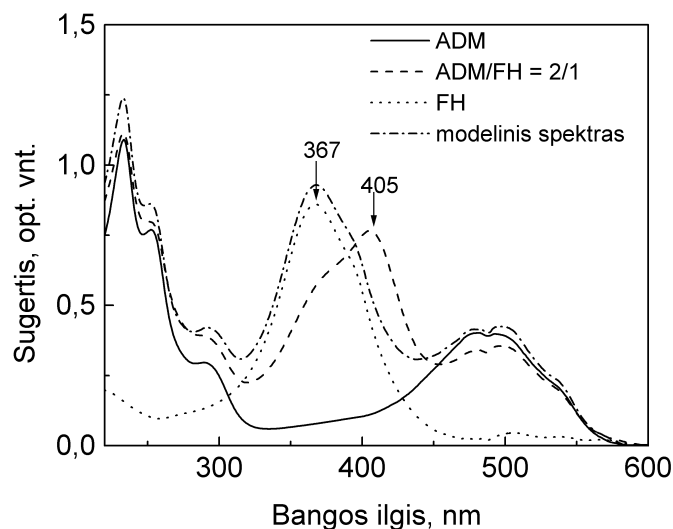


8.2 pav. Plaučių epidermoidinės karcinomos augimo dinamika: I, kontrolė – negydyti gyvūnai; II, ADM – dozė 3mg/kg; III, FNT - FH, 10 mg/kg, švitinimas po 24 val.; IV - FNT+ADM – FH, 10 mg/kg, po 24 val. ADM, 3 mg/kg, švitinimas po 15 min.

Tą patį patvirtino navikų augimo dinamika (8.2 pav.), DNR histogramos ir gydomųjų gyvūnų gyvenimo trukmė (Strečkytė ir kt., 1999a). Viena priežasčių, dėl kurių negavome sinergetinio kombinuotos terapijos poveikio, gali būti tarp fotosensibilizatoriaus ir priešnavikinio vaisto vykstanti sąveika, kurios metu susidarantys tarpiniai kompleksai

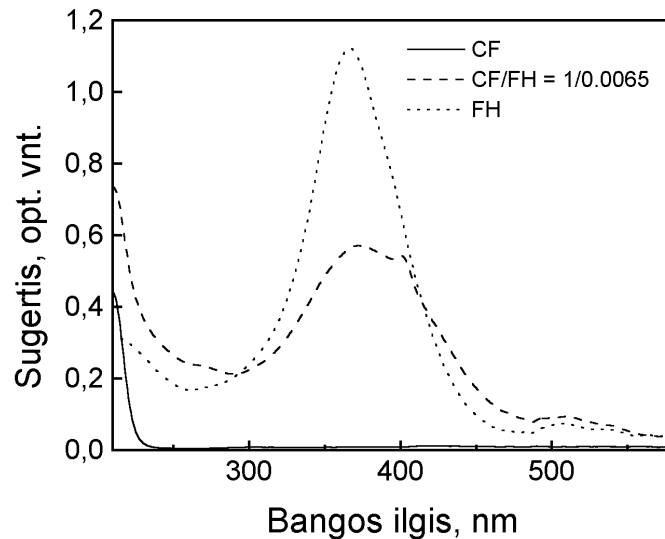
modifikuoja sensibilizatoriaus fotofizikines savybes ir sumažina jo sensibilizacinį efektyvumą. Tokia sąveika gali turėti įtakos tiek fotosensibilizatoriaus sensibilizacinėms savybėms, tiek ir priešnavikinio vaisto terapinėms savybėms. Dėl kompleksų tarp fotosensibilizatoriaus ir vaisto susidarymo gali pakisti sensibilizatoriaus fotofizikinės savybės: į kompleksą surišti porfirinai turi ilgesnes tripletinės būsenos gyvavimo trukmes ir mažesnes tripleto gesinimo deguonimi greičio konstantas (Jori, Spikes, 1981; Reddi, Jori, 1988). Dėl pakitusių parametrų gali keistis ir šviesos sukeltų fotocheminių reakcijų efektyvumas. Sąveika tarp fotosensibilizatoriaus ir priešnavikinio vaisto taip gali turėti įtakos sensibilizatoriaus sugerties savybėms raudonojoje spektro srityje, kurioje vyksta švitinimas. Dėl sąveikos taip pat gali pakisti sensibilizatoriaus fotostabilumas ir fototransformacijų pobūdis.

Sąveika tarp sensibilizatoriaus ir priešnavikinio vaisto ir jos poveikis sensibilizatoriaus fotofizikinėms savybėms: spektroskopiniai tyrimai. Sąveiką geriausiai apibūdina fotosensibilizatoriaus spektre atsirandantys pokyčiai: Soret juostos poslinkis į ilgabangę spektro pusę ir sugerties intensyvumo sumažėjimas. Ryškiausiai šie pokyčiai matomi FH sugerties spektre: pridėjus ADM į FH tirpalą vyksta gana ženklus maždaug 40 nm Soret juostos poslinkis į ilgabangę spektro pusę (nuo 367 iki 405 nm). Kartu su šiuo sugerties maksimumo poslinkiu sumažėja sugerties intensyvumas ties 367 nm (9.3 pav.) (Strečkytė ir kt., 1998).



8.3 pav. Fotohemo, adriamicino ir jų mišinio sugerties spektrai.
 $C_{FH}=10^{-4}M$; $C_{ADM}=2 \cdot 10^{-4}M$

Panašūs, tik ne tokie ryškūs pokyčiai matomi ir kitų tirtųjų antrosios kartos sensibilizatorių chlorino e_6 (Cl_{e_6}), mezo-tetrasulfonato-tetrafenil-porfino ($TPPS_4$) ir sulfooksaporfirino (SOP) sugerties spektruose. Tokie pokyčiai sąlygoti sensibilizatoriaus ir citostatiko komplekso susidarymo (panašiai kaip susidarant porfirinų ir serumo albumino kompleksams (Moan ir kt.,1985; Jasaitis ir kt.,1996)). Sąveikai tarp fotosensibilizatorių ir ADM patvirtinti buvo atlikti modeliniai spektroskopiniai tyrimai. Nesant sąveikos sensibilizatoriaus – ADM mišinio sugerties spektras turėtų sutapti su jų sugerties spektrų suma (8.3 pav., modelinis spektras). Tačiau mišinio spektrai visais atvejais gerokai skiriasi nuo modelinių spektrų. Tai rodo dviejų medžiagų sąveiką.

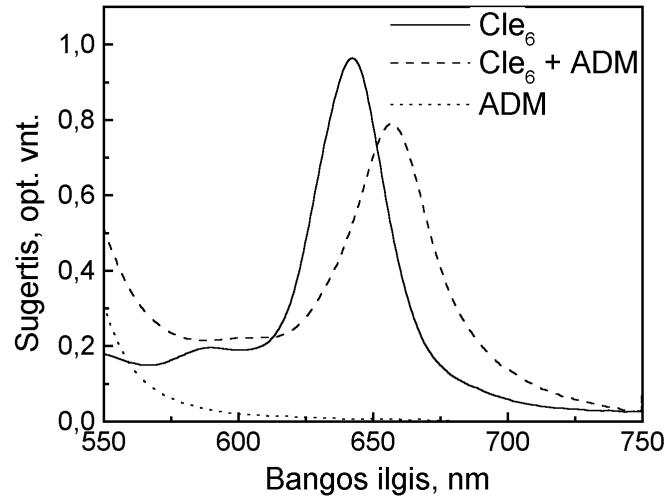


8.4 pav. Fotohemo, ciklofosfamido ir jų mišinio sugerties spektrai.
 $C_{FH}=2,5 \cdot 10^{-5}M$; $C_{CF}=3,8 \cdot 10^{-3}M$

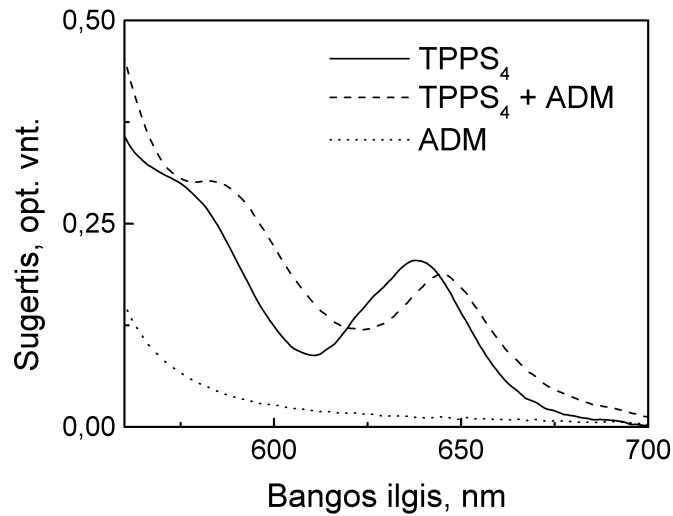
Pokyčiai matomi ir FH mišinyje su kitu priešnavikiniu vaistu – ciklofosfamidu (CF): dėl sąveikos beveik dvigubai sumažėja FH SJ sugertis ir išryškėja susidarancio FH-CF komplekso juosta su sugerties maksimumu ties 400 nm (8.4 pav.). Sąveika tarp Cl_{e_6} ir CF taip pat sumažina Cl_{e_6} SJ intensyvumą.

Sąveika su ADM indukuoja pokyčius visų tirtųjų sensibilizatorių matomos srities spektruose. FH ir SOP spektre pokyčiai neženklūs – sugerties intensyvumas beveik nepakinta, tačiau Cl_{e_6} (8.5 pav.) ir $TPPS_4$ (8.6 pav.) tirpalų sugerties intensyvumai ties

švitinimo bangos ilgiu sumažėja 40–50%. Nuo šių sugerties pokyčių priklausys optimalios FNT dozės parinkimas (Strečkyte, 2000).

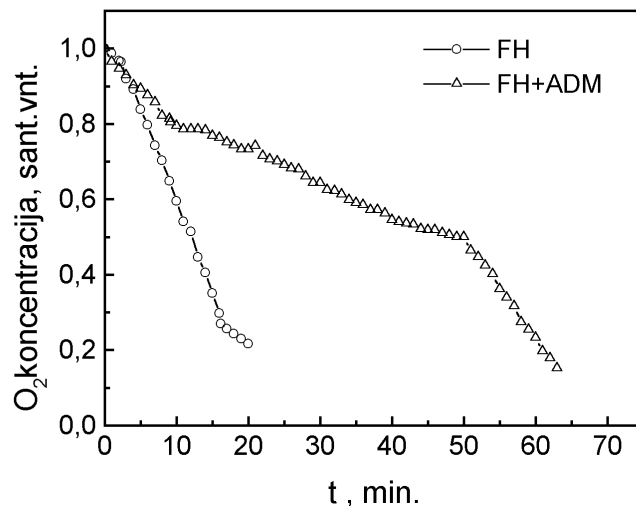


8.5 pav. Cle₆ sugerties spektro pokyčiai dėl sąveikos su ADM.
 $C_{\text{Cle}_6} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{ADM}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$



8.6 pav. TPPS₄ sugerties spektro pokyčiai dėl sąveikos su ADM.
 $C_{\text{TPPS}_4} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{ADM}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Kad FNT būtų sėkminga, turi vykti fotooksidacinės reakcijos, kurioms būtinas deguonis. Sugėrusi šviesos kvantą sensibilizatoriaus molekulė I ar II tipo reakcijų būdu reaguoja su deguonimi, susidaro aktyvios deguonies formos, kurios atakuoja aplinkoje esančias biologines medžiagas – baltymus ir lipidus. Fotosensibilizatorių sugebėjimas generuoti aktyvias deguonies formas yra svarbus parametras vertinant jų efektyvumą FNT. Eksperimentiškai nustatėme deguonies sunaudojimą vykstant jaučio serumo albumino oksidacijai FH ir FH-ADM mišinio tirpaluose, švitinant juos baltos šviesos šaltiniu su raudonu filtru tam, kad nebūtų tiesiogiai žadinamas ADM. Kaip matyti 8.7 pav., FH-ADM mišinio švitinimo metu deguonies sunaudojimas vyksta lėčiau negu švitinant gryną FH (Strečkytė ir kt., 1999b). Matyt, dėl sąveikos su ADM sensibilizatoriaus fotooksidacinis efektyvumas mažėja.



8.7 pav. Deguonies sunaudojimo kinetika FH ir FH-ADM mišinio tirpaluose, vykstant BSA oksidacijai

Efektyviam sensibilizatoriui svarbus parametras – optimalus fotostabilumas. Porfirininės prigimties fotosensibilizatoriai švitinami yra ir sudaro fotoproduktus, turinčius sugerties juostą raudonojoje spektro srityje ties 640 nm (Rotomskiene ir kt., 1988; Rotomskis ir kt., 1997) (plačiau 6 sk.). Įvairiomis šviesos dozėmis švitintų FH tirpalo ir FH-ADM tirpalų mišinio skirtuminės sugerties spektrai raudonojoje srityje rodo, kad švitinamas FH tirpalas blyšksta ir susidaro fotoproduktas, kurio sugerties juostos maksimumas yra ties 650 nm, o FH-ADM tirpalų mišinyje vyksta tik sugerties blyškimas

(Strečkyte, 1999c). Matyt, sąveika su ADM smarkiai sumažina fotoproducto susidarymo galimybes. Kadangi fotoproductas pats yra aktyvus FNT (Giniunas ir kt., 1991), į sąveikos padarinius sensibilizatoriaus fotostabilumui turėtų būti atsižvelgta skaičiuojant FNT dozę (Rotomskis, 1998).

Jeigu švitinimo metu fotosensibilizatorius ir priešnavikinis vaistas vienu metu lokalizuoti navikiniame audinyje, jų tarpusavio sąveika turės įtakos sensibilizatoriaus fotofizikinėms ir fotocheminėms savybėms, o pakitus savybėms gali keistis sensibilizacijos proceso efektyvumas. Komplexo susidarymas savo ruožtu gali užblokuoti priešnavikinio vaisto aktyviuosius centrus, nes jie, matyt, kaip tik ir sąlygoja sąveiką.

Sąveika gali ne tik pakeisti sensibilizatoriaus sugerties spektrą, bet ir paveikti jo tripletinės būsenos užpildą. Padidėjusi sužadinto fotosensibilizatoriaus tripletinės būsenos užpilda didina aktyvių deguonies formų generaciją, sumažėjusi – mažina. Eksperimentiniai rezultatai rodo, kad deguonies sunaudojimas fotosensibilizuoto vykimo metu stipriai sumažėja dėl sąveikos su priešnavikiniu vaistu (8.7 pav.). Matyt, citostatikas, sudarydamas kompleksą su sensibilizatoriumi, sumažina jo tripletinės būsenos užpildą, drauge sumažindamas aktyvių deguonies formų generaciją. Šis efektas gali būti aiškinamas ir tuo, kad citostatikas, sudarydamas kompleksą, sumažina deguonies ir sužadinto sensibilizatoriaus susidūrimo tikimybę.

Visi gauti rezultatai liudija, kad FNT, derintos su chemoterapija, metu tarp dviejų aktyvių agentų, fotosensibilizatoriaus ir priešnavikinio vaisto, vyksta sąveika ir dėl jos labai svarbiu faktoriumi tampa preparatų naudojimo eiga. Geram sinergetiniam poveikiui gauti priešnavikinį vaistą reikėtų taikyti prieš FNT. Vaistai susilpnintų navikinių ląstelių gynybinius mechanizmus ir jos taptų lengviau pažeidžiamos FNT. Fotosensibilizatorius turėtų būti suleidžiamas po atitinkamo laiko tarpo, atsižvelgiant į priešnavikinio vaisto ir fotosensibilizatoriaus farmakokinetines savybes, taip, kad jų tarpusavio sąveika negalėtų moduluoti jų savybių. Praėjus reikiamam laiko tarpui, navikiniame audinyje maksimaliai susikaupusio sensibilizatoriaus švitinimas skatins efektyvius fotofizikinius ir fotocheminius procesus, determinuojančius ląstelių žūtį, kurią pagreitins priešnavikinių vaistų sukelti ląstelių reparacinių mechanizmų pažeidimai.

Literatūra

Abulafi A.M., J.T. Alardice, N.S. Williams (1992) Adjunctive intraoperative photodynamic therapy for colorectal cancer. *Lasers Surg.Med., Suppl.* 4, 49.

Bellnier D., T.J.Dougherty (1986) Haematoporphyrin derivative photosensitization and γ -irradiation damage interaction in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Int.J.Radiat.Biol.*, 50, 659-664.

Bagdonas S., S. Satkauskas, M. Tamosiunas, J. Didziapetriene, R. Gadonas, R. Rotomskis (2000) Application of electroporation during photosensitized tumour therapy in vivo: direct and remote effects. Abstracts of 13th International Congress on Photobiology, San Francisco, 52-53.

Bremner J.C.M., G.E. Adams, J.K. Pearson, J.M. Sansom, I.J. Stratford, J. Bedwell, S.G. Bown, A.J. MacRobert, D. Philips (1992) Increasing the effect of photodynamic therapy on the RIF-1 murine sarcoma, using the bioreductive drugs RSU1069 and RB6145. *Br.J.Cancer*, 66, 1070-1076.

Buettner G.R., M.J. Need (1985) Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett.*, 25, 297-304.

Casas A., H. Fukuda, P. Riley, A. Batlle (1997) Enhancement of aminolevulinic acid based photodynamic therapy by adriamycin. *Cancer Lett.* 121, 105-113.

Cho Y.H., R.C. Straight, J.A. Smith (1992) Effects of photodynamic therapy in combination with intravesical drugs in a murine bladder tumor model. *J.Urol.*, 147, 743-746.

Christensen T., K. Feren, J. Moan, E. Pettersen (1981) Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin. *Br.J.Cancer*, 44, 717-724.

Cowled P.A., I. Mackenzie, I.J. Forbes (1985) Interaction between photochemotherapy with HPD and light and cytotoxic drugs. *Aust.N.Z.J. Med.*, 15, 127-131.

Cowled P.A., I. Mackenzie, I.J. Forbes (1987) Pharmacological modulation of photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res.*, 47, 971-974.

Das M., R. Dixit, H. Mukhtar, D.R. Bickers (1985) Role of active oxygen species in the photodestruction of microsomal cytochrome P-450 and associated monooxygenases by hematoporphyrin derivative in rats. *Cancer Res.*, 45, 608-615.

Data S.N., R. Allman, C. Loh, M. Mason, P.N. Matthews (1997), Effect of photodynamic therapy in combination with mitomycin C on a mitomycin-resistant bladder cancer cell line. *Br.J.Cancer*, 76, 312-317.

DiMarco A. (1975) Adriamycin (NSC 123127): mode and mechanism of action. *Cancer Chemother.Rep.*, 6, 91-106.

Edell E.S., D.A. Cortese (1988) Combined effects of hematoporphyrin derivative phototherapy and adriamycin in a murine tumor mode. *Lasers Surg. Med.*, 8, 413-417.

Evensen J.F., J. Moan (1988) Photodynamic therapy of C3H tumours in mice: effect of drug/light dose fractionation and misonidazole. *Lasers in Med.Sci.*, 3, 1-6.

Frazier T.G., R.W.Y. Wong, D. Rose (1989) Implications of accurate pathological margins in the treatment of primary breast cancer. *Arch.Surg.*, 124, 37-38.

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

van Geel I.P.J., H. Oppelaar, Y.G. Oussoren, J.J. Schuitmaker, F.A. Stewart (1995) Mechanisms for optimising photodynamic therapy: second generation photosensitizers in combination with mitomycin C. *Br.J.Cancer*, 72, 344-350.

Gomer C.J., N.J. Razum (1984) Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem.Photobiol.*, 40, 435-439.

Gonzalez S., M.R. Arnfield, B.E. Meeker, J. Tulip, W.H. Lakey, J.D. Chapman (1986) Treatment of Dunning R3327-AT rat prostate tumors with photodynamic therapy in combination with misonidazole. *Cancer Res.*, 46, 2858-2862.

Goormaghtigh E., P. Chatelain, J. Caspers and J.M. Ruyschaert (1980) Evidence of a specific complex between Adriamycin and negatively charged phospholipids. *Biochim.Biophys.Acta*, 597, 1-14.

Graschew G., M. Shopova (1986) Photodynamic therapy and γ -irradiation of tumors: Effect of tumor-cell reoxygenation. *Lasers Med.Sci.*, 1, 193-195.

Hahn G.M. (1979) Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.*, 39, 2264.

Handa K., S. Sato (1975) Generation of free radicals of quinone group containing anticancer chemicals in NADPH-microsound system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann*, 66, 43-47.

Henderson B.W., S.M. Waldow, T.S. Mang, W.R. Potter, P.B. Malone, T.J. Dougherty, Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 45, 572-576, 1985. 21.

Henderson B.W., S.M. Waldow, W.R. Potter, T.J. Dougherty (1985) Interaction of photodynamic therapy with hyperthermia: Tumour response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. *Cancer Res.*, 45, 6071-6077.15

Henderson B.W., S.M. Waldow, T.S. Mang, T.J. Dougherty (1985) Photodynamic therapy and hyperthermia. G. Jori, C. Perria (eds.), *Photodynamic Therapy of Tumors and other Diseases*, 183-193, Libreria Progetto, Padova.17

Henderson B.W., V.H. Fingar (1987) Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.*, 47, 3110-3114.

Jasaitis A.Jr., G. Streckyte, R. Rotomskis (1996) Photophysics of sensitizer-protein complexes, *Lithuanian Journal of Physics*, 36, 399-402.

Jori G., J.B. Spikes, Photosensitized oxidations in complex biological structures (1981) *Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, New York, 441-457.

Kaye A.H., G. Morstyn, D. Brownbill (1987) Adjuvant high dose photoradiation therapy in the treatment of cerebral glioma: a phase 1-2 study. *J.Neurosurg.*, 67, 500.

Kinsey J.H., D.A. Cortese, H.B. Neal (1983) Thermal considerations in murine tumour killing using hematoporphyrin derivative phototherapy. *Cancer Res.*, 43, 1562-1567.

Ma L.W., V. Iani, J. Moan (1993) Combination therapy: photochemotherapy; electric current; and ionizing radiation. Different combinations studies in a WiDr human colon adenocarcinoma cell line. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.*, 21, 149-154.

Ma L.W., J. Moan, K. Berg, Q. Peng, H.B. Steen (1993) Potentiation of photodynamic therapy by mitomycin C in cultured human colon adenocarcinoma cells. *Radiat.Res.*, 134, 22-28.

Ma L.W., J. Moan, H.B. Steen, V. Iani (1995) Anti-tumour activity of photodynamic therapy in combination with mitomycin C in nude mice with human colon adenocarcinoma. *Br.J.Cancer*, 71, 950-956.

Ma L.W., K. Berg, H.E. Danielsen, O. Kaalhus, V. Iani, J. Moan (1996) Enhanced antitumour effect of photodynamic therapy by microtubule inhibitors, *Cancer Lett.*, 109, 129-139.

Mang T.S., T.J. Dougherty (1985) Time and sequence dependent influence of in vitro photodynamic therapy survival by hyperthermia. *Photochem.Photobiol.*, 42, 533-540.

Mir L.M., S. Orlowski, R. Heller (1995) Biomedical application of electric pulses with special emphasis on antitumour electrotherapy. *Bioelectrochem.Bioenerg.*, 38, 203-207.

Moan J., C. Rimington, A. Western (1985) The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin, *Clinica Chimica Acta*, 145, 227-236.

Nahabedian M.Y., R.A. Cohen, M.F. Contino, T.M. Terem, W.H. Wright, M.W. Berns, A.G.Wile (1988) Combination Cytotoxic Chemotherapy with Cisplatin or Doxorubicin and Photodynamic Therapy in Murine Tumours. *J.Natl. Cancer Inst.*, 80, 739-743.

Perret C., M.T. Foulter, V. Vonarx-Coinsman, O. Quancard, A. Combre, T. Patrice (1994) Malondialdehyde dosimetry in laser-irradiated tissues sensitized by hematoporphyrin derivative. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 296, 787-791.

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

Reed M.W.R., F.N. Miller, T.J. Wieman, M.T. Tseng, C.G. Pietsch (1988) The effect of photodynamic therapy on the microcirculation. *J.Surg.Res.*, 45, 452-459.

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

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

Rotomskis R., S. Bagdonas, G. Streckyte et al. (1998) Phototransformation of sensitizers: 3.Implications for Clinical Dosimetry. *Lasers Med Sci.*, 13, 271-278.

Stewart F.A. (1996) Enhancement of photodynamic therapy by mitomycin C; a preclinical and clinical study. *Br.J.Cancer*, 73, 945-951.

Streckyte G. (2000) Interaction with cytostatic molecules modifies photophysical properties of sensitizer: spectroscopic investigations. *Lith.J.Phys.*, 40, 441-445.

Strečkyte G., J. Didžiapertriene, G. Graželiene, G. Prasmiskiėne, D. Sukeliene, N. Kazlauskaite, D. Characiejus, L. Gričiuėte, R. Rotomskis (1999 a) Effects of photodynamic therapy in combination with Adriamycin. *Cancer Lett.*, 146, 73-86.

Strečkyte G., S. Bagdonas, R. Rotomskis (1998) Spectroscopic investigations of the interaction between photosensitizer and antitumour drug. *Lith.J.Phys.*, 38, 71-74.

Strečkytė G., J. Didžiapetriėnė, A. Jonuška, R. Rotomskis (1999b) Fotofizikiniai kombinuotos terapijos aspektai. *Medicina*, 35, 105-113.

Strečkyte G., S. Bagdonas, R. Rotomskis (1999 c) Interaction between photosensitizer, chemotherapeutic drug and HSA: implications for photodynamic therapy. In: *Photochemotherapy of Cancer and Other Diseases*, B. Ehrenberg, K. Berg (eds.). *Proceedings of SPIE*, 3563, 137-142.

Šatkauskas S. (1998). Elektroporacijos metodo efektyvumo tyrimas navikų elektro-chemoterapijoje *in vivo*, Daktaro disertacija, VDU leidykla, Kaunas, 5-30.

Valuckas K.P., J. Didžiapetriėnė, V. Atkocius, L. Gričiuėte, L. Luksiėne, L. Zaleckaite, R. Rotomskis, V. Smilgevičius (1993) Laser, gamma irradiation, and chemotherapy in treatment of malignant tumors sensitized by porphyrins. In: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy II*, T.J. Dougherty (ed.). *Proc.SPIE* 1881, 76-83.

Waldow S.M., B.W. Henderson, T.J. Dougherty (1987) Hyperthermic potentiation of photodynamic therapy employing Photofrin I and II: Comparison of results using three animal tumour models. *Lasers Surg.Med.*, 7, 12-22.

Waldow S.M., B.W. Henderson, T.J. Dougherty (1985) Potentiation of photodynamic therapy by heat: effect of sequence and time interval between treatments *in vivo*. *Lasers Surg.Med.*, 5, 83-94.

Ward T., A. Rollan, G. Flynn, A.P. McHale (1996) The effects of electric fields on photosensitized erythrocytes: possible enhancement of photodynamic activation. *Cancer Lett.*, 106, 69-74.

Weishaupt K.R., C.J. Gomer, T.J. Dougherty (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumour. *Cancer Res.*, 36, 2326-2329.

Wilson B.C. (1989) Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. In: G. Bock and S. Harnett (eds.) *Photosensitizing compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 60-77.

Winther J., J. Overgaard, N. Ehlers (1988) The effect of photodynamic therapy alone and in combination with misonidazole or x-rays for management of a retinoblastoma-like tumour. *Photochem.Photobiol.*, 47, 419-423.

SUMMARY

8. Combination of PTT with other treatment modalities

Cancer treatment is often a combination of different modalities of treatment. To enhance treatment efficiency PTT has been successfully combined with surgery,

hyperthermia, ionizing radiation, electric current and anticancer drugs. Combination of PTT with other treatment modalities has many advantages. In most cases PTT acts additively or synergistically with other treatments. The efficiency of PTT can be enhanced by the addition of other treatments that may provide sufficient injury to result in death of tumour cells sublethally damaged by PTT.

PTT is combined with surgery to eradicate possible residues after intended curative surgery. Local regional recurrence is one of the major problems after radical surgery. These recurrences can arise from microscopic residual tumour, due to incomplete removal of tumour cells (Frazier et al., 1989). There is a need for an adjuvant treatment that would sterilize tumour bed. As photosensitizers are mainly retained by malignant cells, PTT would be suitable for such a purpose. Penetration of light through the tissue would not be of crucial importance in this situation, as the tumour bulk would have been removed surgically and only residual thick tissue would need to be eliminated.

In clinical trial of adjuvant intraoperative PTT after resection of colorectal carcinoma versus surgery alone the results were as follows: in a group with proved positive resection margins, only 1 of 8 developed local recurrence after adjuvant PTT vs 12 of 14 after surgery alone (Abulafi et al., 1992).

Combination of PTT with radiotherapy have been applied in experimental studies (Bellnier and Dougherty, 1986; Grasczew and Shopova, 1986) and clinical trials (Kaye et al., 1987). The results obtained are not consistent. Some authors showed a significantly enhanced antitumour effect of PTT in combination with radiotherapy on sarcoma 180 (Grasczew and Shopova, 1986). On the other hand, it was found, that PTT combined with radiotherapy in the treatment of retinoblastoma-like tumour in rats acted slightly antagonistic (Winther et al., 1988). Experiments *in vitro* showed that interaction of PTT and radiotherapy was dose-dependent: a synergistic effect was observed at low doses while a slightly antagonistic effect was found at higher doses (Valuckas et al., 1993; Ma et al., 1993).

Combination of PTT and electricity. Electric pulses of intensity in kilovolts per centimeter and of duration in microseconds to milliseconds cause a temporary loss of the semipermeability of cell membranes. This phenomenon, generally called as electroporation, leads to subsequent ion leakage, escape of metabolites, and increased

uptake of drugs by cells. Since the amount of sensitizer and its localization within tumour tissues can affect the efficacy of PTT, an influence of electroporation on pharmacokinetics of second generation photosensitizer chlorin e_6 was studied, and the combined effect of electroporation and PTT on tumour growth was evaluated (Bagdonas et al., 2000). Electroporation procedures resulted in an increase in total fluorescence intensity of chlorin e_6 in the tumour area, while the rate of accumulation was not significantly altered. Significant relative reduction of the tumour growth was observed when PTT was combined with electroporation.

In the search for a strategy to improve the efficacy of PTT the interaction of PTT with electric current was investigated (Ma et al.,1993). It was found that when WiDr tumour cells in culture were treated simultaneously with Photofrin-sensitized PTT and an electric current of 1 mA, a synergistic effect was observed at low exposure times (< 40 sec). However, a seemingly antagonistic effect of the two treatments was found at relatively high exposure times (> 60 sec). A possible origin of antagonism of the two treatments at high exposure times could be a destructive interaction between some of the products formed by the treatments. Consequently, it is proposed that the effect of PTT can be potentiated by electric current under proper doses of both treatments (Ma et al.,1993).

PTT and hyperthermia. A synergistic interaction between PTT and hyperthermia on cells *in vitro* (Mang and Dougherty, 1985), on animal tumours (Waldow et al., 1987) and on patients (Wilson, 1989) was observed. The interest in studying the combined effects of PTT and hyperthermia is based on two considerations: hyperthermia is beneficial when combined with other cancer treatment modalities such as radiotherapy and chemotherapy; illumination during PTT causes significant temperature increases as a result of light absorption by the target tissue. Thus, the temperature increases in the treated tissue may be directly lethal to tumour cells, or may be sublethal still interact with PTT to potentiate the overall effect.

PTT combined with chemotherapy. Combination of PTT with chemotherapeutic agents, whose mechanism of action involves the formation of toxic oxygen radicals, leads to improved responses (Cowled et al.,1987; Edell and Cortese, 1988; Ma et al., 1996). It was demonstrated that an effective drug in combination with

PTT is Adramycin (ADM) (Cowled et al.,1987; Edell and Cortese, 1988; Cho et al., 1992). ADM is anthracycline antibiotic which cytotoxic activities include: intercalation into DNA (DiMarco, 1975) interactions with membranes (Goormaghtigh et al., 1980) bioreductive activation leading to the formation of drug and oxygen free radicals and alkylating species. Several reports indicate synergism of PTT with ADM *in vitro* and in animal tumour models. PTT combined with ADM produced greater retardation in the growth of murine bladder tumour than monotherapy with ADM or PTT (Cho et al., 1992). In the case of another murine tumour model, the Walker 254 carcinosarcoma, the addition of ADM significantly increased the radius of necrosis compared to pure PTT (Edell and Cortese, 1988).

The mechanism of interaction between PTT and chemotherapeutic drugs is not clear. The potentiation of PTT with haematoporphyrin derivatives (HpD) by ADM may occur due to fact that both ADM and HpD accumulate in mitochondria and both ADM and PTT form toxic oxygen radicals. It was shown that synergistic effect depends on the sequence of the combination of PTT with chemotherapeutic drug (Cowled et al.,1987; Evensen and Moan, 1988) but the reason of this is not elucidated. Some authors suggest that the observed enhancement of PTT by ADM may be attributed in part to the weakening of cellular defence mechanisms by the pre-treatment involving free radical generation by ADM (Casas et al., 1997) The interaction between two agents in combined treatment may be decisive for synergistic effect and in these terms the sequence of the combination of two treatments becomes an important factor.

We have investigated how such interaction can modify the therapeutic effect of combined PTT. We analyzed the effects of the combination of Photohem (PH)-PTT with anticancer drug ADM on lipid peroxidation in blood serum and tumour tissues of experimental animals (Streckyte et al., 1999 a).

The combined treatment was performed in the following way – 24 h after injection of PH ADM was administered and tumours were illuminated with laser light after three different time intervals, 15 min, 3 h and 24 h and the level of malondialdehyde (MDA) was evaluated 24 h later. When PTT was combined with ADM, the concentration of MDA in tumour tissue was almost the same (at 15 min interval) or slightly lower (at 3 h and 24 h intervals) as in the case of pure PTT. Combined treatment lowers MDA level

in blood serum in comparison with pure PTT in the cases when laser illumination was performed 15 min and 3 h after ADM administration. When tumours were illuminated 24 h after drug administration, MDA level in tumour tissue is close to that as with pure PTT (Fig. 8.1. Effect of PH-PTT alone and PH-PTT combined with ADM on MDA concentration in blood serum (A) and tumour tissue (B). For PH-PTT treatment 24 h after the injection of PH tumours were illuminated and the concentration of MDA was determined 24 h after illumination. In PH-PTT combination with ADM 24 h after the injection of PH ADM was injected and tumours were illuminated after three different time intervals, 15 min, 3 h and 24 h and then 24 h hours after the illumination the level of MDA was evaluated).

PTT induces the increase in lipid peroxidation product concentration in tumour tissue as well as in blood serum (Fig.8.1 A and B). In PTT combined with ADM, the concentration of MDA differs dependently on time interval between drug administration and laser illumination. When illumination is performed shortly after ADM administration (15 min interval) the concentration of MDA in tumour tissue is very close to that obtained at the pure PTT (Fig.8.1 B). No enhanced antitumour effect was found at these conditions.

This coincides well with the observation of tumour growth dynamics (Fig.8.2. Growth curves for carcinoma epidermoides LL of lung of mice treated by PTT and PTT combined with ADM. I, control, untreated animals; II, ADM, 3 mg/kg; III, PTT (PH, 10 mg/kg, after 24 h laser illumination); IV, PTT+ADM, (PH, 10 mg/kg, after 24 h ADM, 3 mg/kg, after 15 min laser illumination), the survival time of animals and flow cytometric data (Strečkyte et al., 1999 a).

One of the reasons that the synergistic effect of the combined treatment was not obtained is the interaction between photosensitizer and antitumour drug. Spectroscopic investigations show that ground state interaction between PH and ADM takes place in aqueous solution (Strečkyte et al., 1998). Addition of ADM to the solution of PH causes a shift (about 40 nm) of the Soret band (SB) to the longer wavelengths (Fig.8.3. Absorption spectra of PH, ADM and their mixture. Concentration of PH, 10^{-4} M; concentration of ADM, 2×10^{-4} M. Model spectrum is the sum of PH and ADM absorption spectra). A decrease in an intensity of the SB and shift of its maximum to the longer wavelengths

from 367 nm to 405 nm are conditioned by the complexation of PH with ADM similarly as a binding of porphyrins to serum proteins, which also induces a red shift of the SB. It might be expected that the complexation like this would take place *in vivo*. The complexation, which is supposed to be the most intensive when two agents are maximally accumulated in tumour, could modulate cytotoxic activity of ADM. The impaired lipid peroxidation intensity at common action of PH and ADM can be consistent with the decreased ADM activity in free-radical generation due to its interaction with PH.

For an effective photosensitizer the optimal photostability properties are of great importance. As well known, porphyrin-type photosensitizers form red-absorbing photoproducts on illumination. Comparative spectroscopic studies of the photostability of PH followed in the red spectral region in the presence of ADM have shown that the interaction of PH with ADM changes the phototransformation process of PH: the formation of photoproduct is inhibited and dominant phototransformation process is photobleaching (Strečkytè et al., 1999 b). Since the red-absorbing photoproduct shows photodynamic activity, modification induced by the complexation with cytostatic in the phototransformation process of photosensitizer can change its sensitizing efficiency.

For the efficient photosensitizers high singlet oxygen generation yields are necessary (Jori, 1996). The interaction with cytostatic molecules could modify also this parameter of the photosensitizer. Due to the interaction the population of the triplet state of photosensitizer may increase or decrease and consequently the generation of reactive oxygen species will increase or decrease. The oxygen consumption measurements recorded during the illumination of the solution of pure photosensitizer and photosensitizer-cytostatic mixture in the presence of BSA show that the oxidation efficiency of photosensitizer complexed with the drug is lower in comparison with the pure photosensitizer (Fig. 8.7. Oxygen consumption during the photo-oxidation of BSA in the solution of PH and PH-ADM mixture. $C_{PH} = 2.5 \times 10^{-4}$ M, $C_{ADM} = 10^{-3}$ M) (Strečkytè et al., 1999 c). Most probably, the complexation between PH and ADM lowers the triplet state population of PH and, therefore, generation of the active species of oxygen is suppressed, or due to the complexation with ADM the probability to meet oxygen molecule for the excited PH is reduced.

These changes in the photophysical properties of photosensitizers should be taken

into account when PTT is combined with chemotherapy. Since complexation can influence properties of both drugs the regimen of drug administration should avoid the interaction between them. If photosensitizer is administered before chemotherapeutic drug, ADM, which accumulates fast in the tumour and persists in this district for long periods, may interact with PH accumulated previously in the tumour tissue and by this may lose partially its cytotoxic activity. On the other hand, interaction with ADM may impair photosensitizing activity of PH. Therefore for the successful combination of PTT with chemotherapy it should be suggested to apply chemotherapeutic drug first. The cytotoxic activity of ADM applied prior to photosensitizer will not be reduced by the interaction with photosensitizer. The photosensitizer should be administered after the properly chosen time interval so that its photosensitizing activity will not change due to the interaction with chemotherapeutic drug. ADM administered prior to photosensitizer will make cells more susceptible to photodynamic damage. Administration of photosensitizer after at least 24 h will help to avoid a considerable interaction between two agents and consequent changes in their activity. After successive 24 h, PH will be accumulated in tumour tissue and ADM for the most part will be cleared out and this again will allow to avoid the interaction of two drugs in tumour tissue. At this time performed laser illumination will cause photodynamic damage which will be potentiated by ADM induced inhibition of repair processes.

References

- Abulafi A.M., J.T. Alardice, N.S. Williams (1992) *Lasers Surg.Med.*, Suppl. 4, 49.
- Bagdonas S., J.Labanauskiene, S. Satkauskas, M. Tamosiunas, J. Didziapetriene, R. Gadonas, R. Rotomskis (2000) *Abstracts of 13th International Congress on Photobiology*, San Francisco, 52-53.
- Bellnier, T.J.Dougherty (1986) *Int.J.Radiat.Biol.*, 50, 659-664.
- Casas A., H. Fukuda, P. Riley, A. Batlle (1997) *Cancer Lett.* 121, 105-113.
- Cho Y.H., R.C. Straight, J.A. Smith (1992) *J.Urol.*, 147, 743-746.
- Cowled P.A., I. Mackenzie, I.J. Forbes (1987) *Cancer Res.*, 47, 971-974.
- DiMarco A. (1975) *Cancer Chemother.Rep.*, 6, 91-106.

- Edell E.S., D.A. Cortese (1988) *Lasers Surg. Med.*, 8, 413-417.
- Evensen J.F., J. Moan (1988) *Lasers in Med.Sci.*, 3, 1-6.
- Frazier T.G., R.W.Y. Wong, D. Rose (1989) *Arch.Surg.*, 124, 37-38.
- Graschew G., M. Shopova (1986) *Lasers Med.Sci.*, 1, 193-195.
- Goormaghtigh E., P. Chatelain, J. Caspers and J.M. Ruyschaert (1980) *Biochim.Biophys.Acta*, 597, 1-14.
- Jori G. (1996) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 36, 87-93.
- Kaye A.H., G. Morstyn, D. Brownbill (1987) *J.Neurosurg.*, 67, 500.
- Ma L.W., V. Iani, J. Moan (1993) *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 21, 149-154.
- Ma L.W., K. Berg, H.E. Danielsen, O. Kaalhus, V. Iani, J. Moan (1996) *Cancer Lett.*, 109, 129-139.
- Mang T.S., T.J. Dougherty (1985) *Photochem.Photobiol.*, 42, 533-540.
- Strekyte G., S.Bagdonas, R.Rotomskis (1998) *Lith.J.Phys.*, 38, 71-74.
- Strekyte G., S. Bagdonas, R. Rotomskis (1999 b) In: *Photochemotherapy of cancer and other diseases. Proc. SPIE*, 3563, 137-142.
- Strekyte G., J. Didziapertriene, G. Grazeliene, G. Prasmiskiene, D. Sukeliene, N. Kazlauskaite, D. Characiejus, L. Gričiute, R. Rotomskis (1999 a) *Cancer Lett.*, 146, 73-86.
- Strekytė G., J.Didžiapetriėnė, A.Jonuška, R.Rotomskis (1999 c) *Medicina*, 35, 105-113.
- Valuckas K.P., J. Didžiapetriėnė, V. Atkocius, L. Gričiute, L. Luksiene, L. Zaleckaite, R. Rotomskis, V. Smilgevicius (1993) In: *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy II. Proc.SPIE*, 1881, 76-83.
- Waldow S.M., B.W. Henderson, T.J. Dougherty (1985) *Lasers Surg.Med.*, 5, 83-94.
- Wilson B.C. (1989) In: *Photosensitizing compounds: Their chemistry, biology and clinical use*, 60-77.
- Winther J., J. Overgaard, N. Ehlers (1988) *Photochem.Photobiol.*, 47, 419-423.