

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja

Basic Principles and Potentials of Photodynamic Therapy

Boštjan Japelj, Slavko Pečar

Povzetek: Fotodinamično zdravljenje je zdravljenje z uporabo vidne ali bližnje infrardeče svetlobe, ki aktivira fotosenzibilizator in povzroči nastanek singletnega kisika, ki poškoduje okolišno tkivo. Do lokalno omejenih učinkov prihaja samo na področjih, ki jih osvetlimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine. Učinkovine, ki se uporabljajo kot fotosenzibilizatorji, morajo biti sposobne aktivirati kisik preko prenosa elektrona ali prenosa energije.

Ključne besede: fotodinamično zdravljenje, fotosenzibilizator, prenos elektrona, prenos energije, singletni kisik

Abstract: Photodynamic therapy is the treatment by the use of visible or near infrared light, which activates the photosensitizer and forms singlet oxygen. Singlet oxygen then causes damage to the living system. Photodynamic therapy is localized, as treatment is achieved only in the areas which are illuminated by the light of certain wavelength. Drugs which are used as photosensitizers activate oxygen by the mechanism of electron or energy transfer.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, electron transfer, energy transfer, singlet oxygen

1 Uvod

Ko v vsakdanjih pogovorih uporabljamo pojem "zdravljenje" (terapija), ga le redko uporabljamo v njegovem najširšem pomenu. Pojem obsega vse postopke, procese, načine in posege v organizem ali v njegovo okolico, ki vodijo do ozdravitve ali do izboljšanja stanja. Najčešče mislimo le na uporabo zdravil in na zdravilne učinkovine različnih farmakoloških učinkov (farmakoterapija) kot njihove bistvene sestavine. Redkeje pomislimo, da so zdravljenje tudi kirurški posegi, obsevanja z rentgenskimi žarki, obdelava s toploto (hladom), nadzorovana in usmerjena fizična aktivnost itd. V zdravilne namene tako uporabljamo bodisi snovi (zdravilne učinkovine) ali ustrezne posege z določeno obliko energije (obsevanje z elektromagnetnim valovanjem različnih valovnih dolžin itd.), ker se živ organizem odziva tako na vnos snovi kot na vplive različnih energij.

Farmacevtska stroka je v stalnem in neposrednem stiku z zdravilnimi učinkovinami in zdravili. V preglednem članku bomo z namenom širitve strokovnega obzorja, predstavili osnovne za razumevanje manj znanega fotodinamičnega zdravljenja (photodynamic therapy), možnosti tega zdravljenja in razumevanje delovanja učinkovin, ki jih pri tem uporabljamo.

Uporaba elektromagnetnega valovanja v zdravilne in diagnostične namene je že uveljavljena metoda od odkritja žarkov X (Röntgen) in od odkritij žarkov α , β in γ dalje. Uporaba svetlobe daljših valovnih dolžin (ultravijolična - UV in vidna svetloba - VS) se v terapiji pojavi kasneje. Izkoriščanje UV in VS v zdravilne namene strokovna literatura

obravnavata na treh ravneh. Najširše področje zajema pojem "fototerapija", ki pomeni uporabo ultravijolične (UV), vidne in bližnje infrardeče svetlobe (IR) za zdravljenje bolezni, npr.: neonatalne hiperbilirubinemije (1).

Nekoliko ožje področje pokriva pojem "fotokemoterapija", ki pomeni uporabo UV, vidne in bližnje IR svetlobe skupaj s fotosenzibilizatorjem (fotokemoterapevtsko snovjo) za zdravljenje bolezni, npr.: fotokemoterapija psorizae in drugih kožnih bolezni (2,3,4,5,6). Pri fotokemoterapiji z zunanjim energetskim vplivom (svetloba ustrezne valovne dolžine) pozročimo na učinkovini (fotosenzibilizator), ki se po aplikaciji porazdeli po telesu, kemične spremembe, ki jih izkoriščamo v terapevtske namene. Do teh sprememb in do zdravilnega učinka prihaja samo na področjih, ki jih osvetlimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine, kar pomeni, da s fotokemoterapijo dosežemo površinsko omejene učinke.

Najožje področje uporabe svetlobe za zdravljenje opisuje pojem "fotodinamično zdravljenje", kjer uporabljamo vidno ali bližnje IR svetlobo skupaj s fotosenzibilizatorjem in izkoriščamo prisotnosti molekularnega (tripletnega) kisika v tkivu (7). Tripletni kisik (3O_2) je običajna oblika kisika in je sestavina atmosfere. Ker je razporeditev elektronov v zadnji razvezni orbitali takšna, da sta v molekuli dva elektrona z istosmernim spinom, je 3O_2 biradikal (8). Tak kisik zelo počasi reagira z organskimi spojinami, izredno hitro pa z radikali. Pri interakciji svetlobe in fotosenzibilizatorja v prisotnosti tripletnega kisika, se energija absorbirane svetlobe uporabi za pretvorbo 3O_2 v energetsko bogatejšo obliko - singletni kisik (1O_2), to je oblika kisika,

kjer sta elektrona v zadnji razvezni π^* orbitali v paru. Singletni kisik zato zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira. Pri fotodinamični terapiji na mestu, kjer foton svetlobe zadene molekulo fotosenzibilizatorja, nastaja 1O_2 , ki poškoduje okolišno tkivo. Na teh poškodbah okolišnega tkiva temelji zdravilni učinek, ki ga izkoriščamo pri fotodinamični terapiji kožnega in nekaterih drugih oblik raka (9).

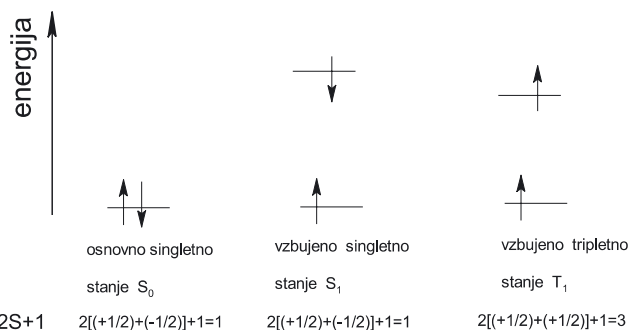
Pri fotodinamičnem zdravljenju gre za kombinacijo snovnega posega (sistemska aplikacija fotosenzibilizatorja) in obsevanja samo določene površine organizma: površine kože, žile, mrežnice. Na ta način uspešno rešujejo enega temeljnih problemov kemoterapije: kako doseči učinek samo v določenem predelu telesa. Sodobna tehnologija omogoča svetlobne vire z ustreznimi valovnimi dolžinami (različne energije) in ustrezno gostoto energije, ter uporabo optičnih vodil, s katerimi snop svetlobe usmerjamo na izbrano mesto. Sintezno lahko pripravimo fotosenzibilizatorje, ki absorbirajo v različnih področjih valovnih dolžin in imajo različne fizikalno-kemične (porazdelitvene) lastnosti. Z optimizmom lahko pričakujemo, da bo fotodinamično zdravljenje raka na koži in na nekaterih drugih organih (prostata, pljuča, prsi, požiralnik) kmalu dobilo ustrezno mesto med drugimi "klasičnimi" terapevtskimi pristopi (10). Posredni dokaz za omenjeno trditev so mnogi fotosenzibilizatorji, ki so bodisi že v uporabi ali pa so v različnih stopnjah kliničnega preizkušanja (7). S samim principom fotodinamičnega učinka se nehotе srečujemo vsako leto. Zaradi nekaterih dodatkov v hrano (predvsem barvila) in nekaterih naravnih spojin (fotosenzibilizatorji), ki se kopičijo v podkožju, pride na s soncem obsevanih delih kože do značilnih izpuščajev, ki jih zaradi poenostavitve problema obravnavajo kot alergično reakcijo na sonce. Omenjene lastnosti pa se pojavljajo tudi pri zdravilnih učinkovinah, saj podrobnejši pregled postreže s podatki, da so nekatere učinkovine fototoksične. Te na obsevanih delih kože povzročajo neugodne reakcije, primarno zaradi lokalnega nastajanja 1O_2 .

2 Temelji fotodinamičnega zdravljenja

Molekula snovi lahko absorbira elektromagnetno valovanje ustrezne valovne dolžine. Pri absorpciji pride do prehoda v energetsko bogatejša rotacijska, vibracijska ali elektronska stanja (11, 12).

Absorpcija svetlobe v UV in vidnem delu spektra povzroča prehode elektronov, če energija fotona ustreza energetski razliki med osnovnim in vzbujenim stanjem. Foton svetlobe z določeno energijo ($E = h\nu$, kjer je h Planckova konstanta, ν pa je frekvenca elektromagnetnega valovanja) interagira z molekulo substrata v osnovnem stanju (S_0) in povzroči prehod elektrona iz vezne ali nevezne orbitale v orbitalo z višjo energijo, v organskih molekulah največkrat v razvezno orbitalo. Takšno vzbujeno stanje ima lahko za posledico dve elektronski konfiguraciji z različno spinsko multipliciteto, ki je definirana kot $2S+1$, pri čemer je S celoten spin sistema (slika 1).

Verjetnost prehoda med osnovnim in vzbujenim stanjem podaja molarni absorptivnostni koeficient. Povezan je s površino pod absorpcijsko krivuljo, vendar se večkrat uporablja vrednost ϵ_{\max} . Malo verjetnim prehodom pravimo "prepovedani". Na dovoljenost ali prepovedanost elektronskega prehoda vplivajo spin, prostor, simetrija, gibalna količina in vrtilna količina (7).



Slika 1. Spinska multipliciteta osnovnega (singletno stanje S_0) in vzbujenih (singletno S_1 in tripletno T_1) stanj.

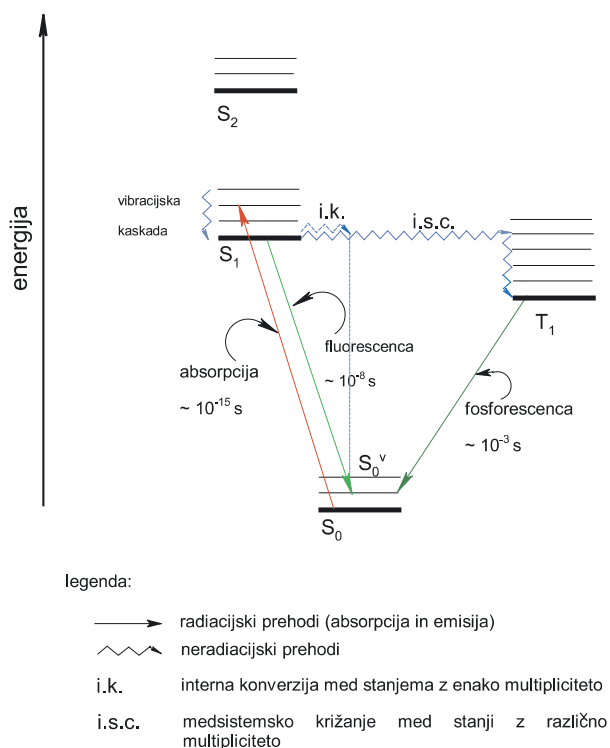
Figure 1. Spin multiplicity of the ground (singlet state S_0) and excited (singlet state S_1 and triplet state T_1) states.

Molekula v vzbujenem stanju lahko:

- oddaja foton (seva svetlobo) in se vrne v osnovno stanje,
- preide v drugo (vzbujeno) stanje. Pretvorbo med stanjema z enako multipliciteto imenujemo **interna konverzija**: npr. prehod iz singletnega stanja prvega nivoja v enega od višjih vibracijskih nivojev osnovnega singletnega stanja $S_1 \rightarrow S_0^v$. Prehod v stanje z različno multipliciteto pa imenujemo **medsistemsko križanje** (intersystem crossing (i.s.c.)) npr. prehod: $T_1 \rightarrow T_1$.
- vstopi v kemijsko reakcijo: npr. fotoionizacija, fotoadicijska, fotociklizacija.
- prenese energijo vzbujenega stanja na drugo molekulo.

Emisijo fotona iz vzbujenega singletnega stanja imenujemo **fluorescenca**, iz tripletnega stanja pa **fosforescenca**. V obeh primerih vzbujena molekula preide v osnovno stanje S_0 , izsevana svetloba pa ima daljšo valovno dolžino kot absorbirana. Ker je fosforescenca prepovedan prehod ($T_1 \rightarrow S_0$), je življenjska doba tripleta daljša (v ms območju). Pri fluorescenci (dovoljen prehod, npr. $S_1 \rightarrow S_0$) pa je življenjska doba vzbujenega stanja bistveno krajša ($< \mu s$). Zaradi daljše življenjske dobe tripleta je ta pomembnejši pri fotokemičnih reakcijah. Na sliki 2 (Diagram Jablonskega) so shematsko prikazani dovoljeni in prepovedani prehodi.

Molekula, ki se prvotno nahaja v stanju S_0 , lahko absorbira foton in preide v vzbujeno elektronsko stanje (S_1 ali S_2 na sliki 2). Molekula v vzbujenem stanju je izpostavljena trkom s sosednjimi molekulami. Na ta način oddaja energijo in prehaja v nižje vibracijske nivoje vzbujenega elektronskega stanja (vibracijska kaskada na sliki 2). Prehodi med vibracijskimi nivoji so neradiacijski prehodi in potekajo dokler molekula ne pride v najnižji vibracijski nivo ($v=0$) vzbujenega elektronskega stanja. Emisija poteče iz najnižjega vzbujenega stanja. Prehod $S_0 \rightarrow T_1$ je strogo prepovedan, lahko pa poteče prehod v obratni smeri. Z medsistemskim križanjem lahko namreč preide



Slika 2. Modificiran diagram Jablonskega shematično prikazuje energije različnih stanj molekule. Elektronski ekscitacijski nivoji so dodatno razdaljeni v več vibracijskih nivojev, ti pa še dodatno na rotacijske podnivoje, ki pa na sliki niso prikazani.

Figure 2. Modified Jablonski diagram schematically shows the energies of different states of the molecule. Electron excitation levels are additionally divided into several vibrational and rotational sublevels (rotational sublevels are not depicted).

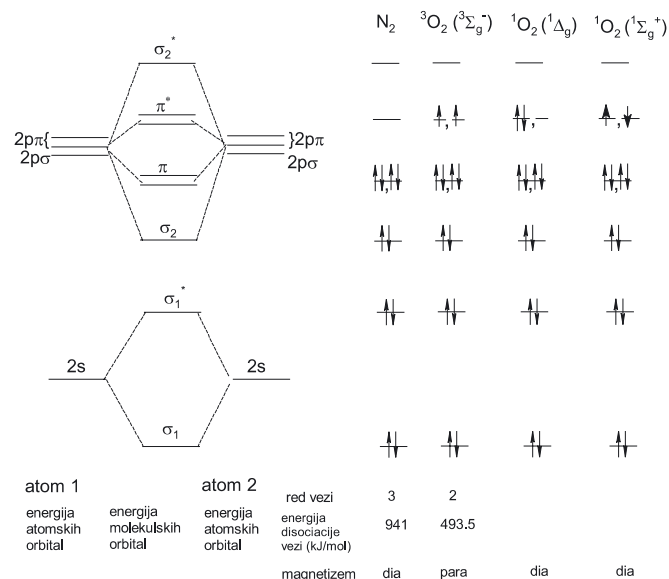
molekula iz $S_1 \rightarrow T_1^v$ stanje in z deaktivacijo v T_1^0 . Prehod $S_1 \rightarrow T_1$ je sicer formalno prepovedan, lahko pa se zgodi v določenih primerih (benzofenon), ker gre za prehod v energetsko nižje stanje. Prehod iz T_1^0 v S_0 je možen iz podobnega razloga kot pri medsistemskem križanju, ki dopušča kršitev selekcijskega pravila.

2.1 Mehanizem fotodinamičnega delovanja

Ker je osnovno stanje molekule kisika (3O_2) triplet, se ta pomembno razlikuje od drugih snovi, ki so v osnovnem stanju v obliki singleta. Če privzamemo, da je tripletno stanje osnovno, potem ima molekula kisika še dve vzbujeni stanji, ki sta energetsko bogatejši: osnovno singletno stanje in vzbujeno singletno stanje (Razpredelnica I).

Elektronsko stanje kisika. $^1\Sigma_g^+$ (vzbujeni singlet) ima zelo kratko življenjsko dobo (manj kot ps) in zelo hitro preide v nižje singletno stanje, $^1\Delta_g$.

Na sliki 3 je primerjalno prikazana razvrstitev elektronov v molekuli dušika (N_2) in kisika (O_2). Dva elektrona z istosmernim spinom v različnih orbitalah sta razlog, da je tripletni kisik pri običajnih pogojih relativno neaktiven do večine organskih spojin. Pri spajanju kisika s temi spojinami, bi moralo priti do spremembe spina enega elektrona, kar pa je kvantnomehansko prepovedan dogodek.



Slika 3. Elektronske konfiguracije molekule tripletnega kisika (3O_2) in molekule singletnega kisika (1O_2) v osnovnem ($^1\Delta_g$) in vzbujenem ($^3\Sigma_g^+$) stanju v primerjavi z molekulo dušika (N_2). Na levi je prikazan energetski diagram molekulskih orbital, ki bi ga dobili s prekrivanjem atomskih orbital obeh atomov, ki tvorita molekulo dušika in kisika, z metodo LCAO (linear combination of atomic orbitals) kot približkom za kemijsko vezavo. Na sliki niso prikazani štirje elektroni, ki so v linearnih kombinacijah 1s orbital.

Figure 3. Electron configurations of triplet oxygen (3O_2) and singlet oxygen (1O_2) molecule in ground ($^1\Delta_g$) and excited ($^3\Sigma_g^+$) state in comparison with nitrogen molecule (N_2). On the left energy diagram of molecular orbitals is shown obtained as an overlap of atomic orbitals using LCAO (linear combination of atomic orbitals) approximation for chemical bonding. Four electrons in the linear combination of 1s orbitals are not shown in the picture.

Razpredelnica I. Energije in življenjske dobe stanj O_2 (7)

Table I. Energies and lifetimes of different states of O_2 (7).

oznaka stanja	ime	relativna energija (kJ/mol)	življenjska doba v sekundah v kondenzirani fazi
$^1\Sigma_g^+$ vzbujeno singletno stanje	-	155	$<10^{-9}$ s
$^1\Delta_g$ osnovno singletno stanje	singletni kisik, 1O_2	94	~ 10 μ s
$^3\Sigma_g^-$ osnovno tripletno stanje	kisik, 3O_2	0	∞

Poznamo dva mehanizma po katerih lahko svetloba v prisotnosti fotosenzibilizatorja in kisika sproži kemijsko reakcijo v substratu in poškoduje tkivo: tip1 in tip 2 (7). Globina do katere sega svetloba je odvisna od njene valovne dolžine (Razpredelnica II).

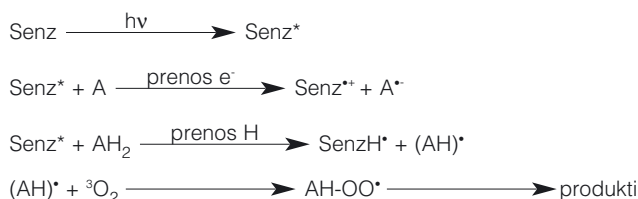
Razpredelnica II. Globina do katere sega svetloba različnih valovnih dolžin

Table II. The depth of penetration of light of different wavelenghts.

valovna dolžina (nm)	globina (mm)
400	cca 2,2
500-550	cca 3,5
630-650	do 20

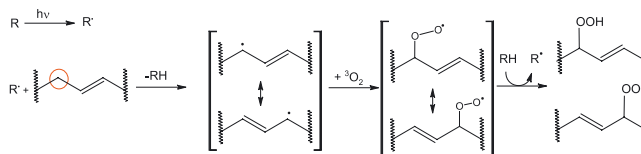
2.1.1 Tip 1 - prenos elektrona

Vzbujeno stanje fotosenzibilizatorja povzroči nastanek radikala zaradi prenosa elektrona iz substrata ali na substrat, oziroma zaradi izgube vodika. Nastali radikal reagira s 3O_2 molekulo, kar vodi do nastanka reaktivnih kisikovih intermediatov (superoksidni ali peroksidni ioni), ki napadejo celične tarče. Reakcija je formalno gledano fotokemijsko sprožena oksidacija (shema 1):



Shema 1. Nastajanje reaktivnih kisikovih intermediatov po zajetju fotona na molekuli fotosenzibilizatorja (Senz). Senz^* je vzbujeno stanje senzibilizatorja, $\text{Senz}^{*\cdot}$, je kationski radikal senzibilizatorja, A^\cdot anionski radikal substrata.

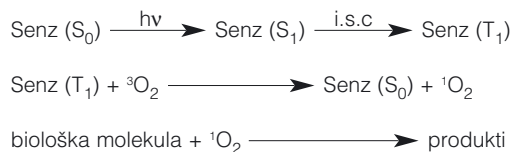
Kot primer navajamo fotokemični nastanek radikala, ki sproži lipidno peroksidacijo v tkivu in prenos elektrona na kisikovo molekulo. Pri lipidni peroksidaciji nastali primarni radikal odvzame H iz nenasičenega lipida, alilni radikal je resonančno stabiliziran in po reakciji s tripletnim kisikom nastane peroksidni radikal, po pritegnitvi vodikovega iona pa dva možna peroksida (shema 2) (13).



Shema 2

2.1.2 Tip 2 - prenos energije

Po tem mehanizmu se energija za vzbujanje elektronov prenese iz senzibilizatorja v tripletne stanje na tripletni kisik, pri čemer senzibilizator in kisik preideta v singletno stanje. S pomočjo obsevanja ustreznih senzibilizatorjev lahko s pomočjo elektronske ekscitacije nastaja singletni kisik, kar je najpomembnejša reakcija pri fotodinamični terapiji. Fotosenzibilizator je torej posrednik, ki energijo svetlobe (fotona) preko lastnih vzbujenih stanj prenese na molekulo tripletnega kisika, pri tem pa nastaja singletni kisik (1O_2) (shema 3).



Shema 3. Nastajanje 1O_2 iz 3O_2 s posredovanjem vzbujenega fotosenzibilizatorja.

Scheme 3. Formation of 1O_2 from 3O_2 in the presence of photosensitizer in the excited state.

Pogoj, da senzibilizator lahko posreduje pri nastajanju 1O_2 je, da je energija (vbujeno stanje senzibilizatorja) večja od 94 kJ/mol (energija singletnega kisika nad osnovnim tripletnim stanjem). Fotokemična učinkovitost, s katero različni fotosenzibilizatorji tvorijo 1O_2 , je kvantni izkoristek (quantum yield), ki je definiran kot:

$$\phi_{\text{produkta}} = (\text{št. molekul produkta v sekundi v mL}) / (\text{št. fotonov, ki se absorbirajo v sekundi v mL}).$$

Kvantni izkoristki za nekatere fotosenzibilizatorje so v razpredelnici II (14).

Razpredelnica III. Kvantni izkoristki nekaterih fotosenzibilizatorjev.
Table III. Quantum yields of certain photosensitizers.

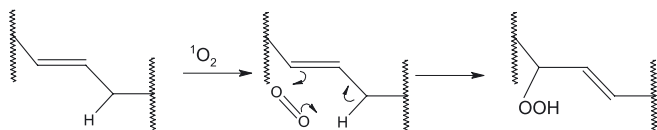
Skupina	Fotosenzibilizator	Topilo	ϕ_{Δ}
A. splošni			
	Akridin	C ₆ H ₆	0,83
	Benzofenon	C ₆ H ₆	0,35
B. porfirini in sorodne spojine			
	porfirin	CCl ₄	0,75
	Tetrafenilporfirin	C ₆ H ₆	0,66
C. ftalocianini			
	Mg kompleks ftalocianina	C ₆ H ₅ N	0,40

Razlikovanje med tipom I in II je težavno. Problem je v analitskih metodah, ki niso dovolj zanesljive in v številnih dejavnikih (topilo, substrat, valovna dolžina), ki lahko vplivajo na mehanizem, po katerem bo fotosenzibilizator reagiral. Mnogi reagirajo po obeh mehanizmih (7).

2.2 Reaktivnost ¹O₂

Singletni kisik običajno ni prisoten v naravi, ker takoj reagira z organskimi spojinami (15,16,17). Reagira tako, da:

- se adira na nenasičene spojine, npr. na maščobne kisline pri čemer v eni stopnji nastane hidroperoksid (shema 4):



Shema 4.

Velik del poškodb tkiva pri fotodinamični terapiji gre preko oksidacij nenasičenih maščobnih komponent biološke membrane in s tem povezanega propada celic.

- da reagira kot elektrofil, ki napada alkene bogate z elektroni. Z 1,3 dieni reagira kot dienofil po Diels-Alderjevi reakciji. S stališča toksičnosti (učinkovitosti) je pomembna reakcija ¹O₂ s purinskimi bazami (gvanin) in aminokislinami (Trp, His, Met ...), ki nepopravljivo poškoduje DNA oziroma prizadene funkcionalne lastnosti nekaterih encimov.

Zaradi možnih številnih interakcij v biološkem sistemu, je življenjska doba singletnega kisika 0,01–0,04 μs z difuzijsko potjo med 0,01–0,02 μm (38).

3 Zdravilne učinkovine pri fotodinamični terapiji

Učinkovina, ki je kot fotosenzibilizator uporabna v fotodinamični terapiji, mora zadoščati naslednjim pogojem:

- imeti mora kromofor, ki absorbira v vidnem ali bližnjem infrardečem delu spektra,
- če fotosenzibilizator posreduje pri nastajanju ¹O₂, mora molekula senzibilizatorja preiti v tripletno stanje z medsystemskim križanjem, energija tripletnega stanja senzibilizatorja (E_T) mora biti nekoliko večja od 94 kJ/mol (energija singletnega kisika nad osnovnim stanjem).
- prenos energije Senz(T₁) → ³O₂ mora biti učinkovit,
- v primeru spojin, ki agregirajo, je monomerna (neasociirana) oblika bolj fotodinamično učinkovita (7).

3.1 Generacije fotosenzibilizatorjev

Fotosenzibilizatorje, ki posredujejo pri nastajanju aktivirane oblike kisika, delimo v tri generacije:

- v prvi generaciji so derivati hematoporfirina in sorodne spojine;
- v drugi generaciji so fotosenzibilizatorji, razviti iz porfirinov z večjo učinkovitostjo in selektivnostjo;
- v tretji generaciji so fotosenzibilizatorji, ki so še v razvojni fazi, in so kovalentno vezani na določena monoklonska protitelesa, s čimer bi lahko dosegli izredno prostorsko selektivnost nastajanja ¹O₂.

Glede na strukturo lahko fotosenzibilizatorje razdelimo v naslednje skupine:

- porfirini,
- klorini in bakterioklorini,
- ftalocianini in naftalocianini,
- drugi fotosenzibilizatorji: cianinska barvila, razširjeni kinoni, fenotiazini, ksanteni, porficeni, skvarini, teksapirini, konjugirani fotosenzibilizatorji (7).

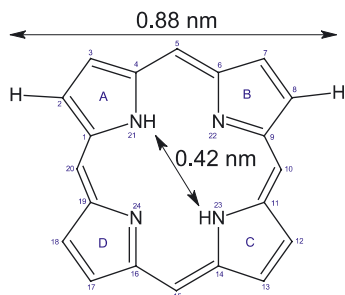
3.2 Porfirini

Porfirini, klorini in ftalocianini imajo kot fotosenzibilizatorji pri fotodinamični terapiji tri pomembne prednosti (18,19):

- dobro absorbirajo v vidnem delu spektra vsled česar je potrebno le malo materiala,
- so stabilni (aromska stabilnost) na svetlobi in
- nizko toksičnost v temi.

Porfirini in klorini so trenutno najbolj obetajoče fotosenzibilirajoče učinkovine druge generacije. Osnovni skelet je hidrofoben. Za povečanje topnosti v vodi uvajamo v molekulo dodatne sulfonske, karboksilne in hidroksilne funkcionalne skupine. Pridobivajo jih iz hemoglobina, s popolno sintezo in z manipulacijo biosintezne poti sinteze protohema.

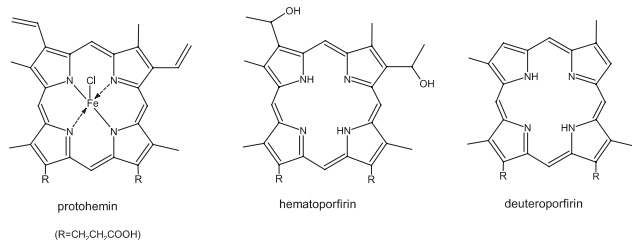
Porfirinski sistem je planaren in aromatičen 18- π elektronski sistem s premerom 0,88 nm. V notranjosti ima špranjo s premerom 0,42 nm kamor se lahko vežejo različni kovinski ioni (slika 4). Za fotodinamično terapijo so primerni kompleksi z relativno dolgo življenjsko dobo z Al^{3+} ali Zn^{2+} .



Slika 4. Porfirinski sistem.
Figure 4. Porphyrin system.

3.2.1 Porfiri iz hemoglobina

Pridobivajo jih iz krvi, ki ji dodajo heparin za preprečitev koagulacije. Sledi hemoliza in centrifugiranje. Hemoglobin nato kristalizirajo. Protohemini (ali krajše hemin) alternativno pridobijo z dodatkom očetne kisline in NaCl čemur sledi kristalizacija (shema 5) (20, 21).



Shema 5.

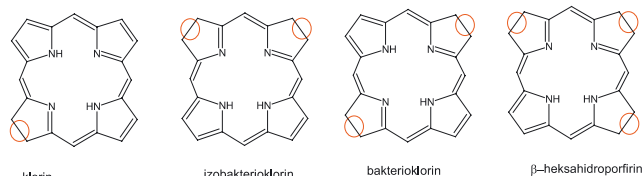
Protohemin, hematoporphirin in deuteroporphirin služijo kot najpogostejše začetne spojine za sintezo fotodinamičnih senzibilizatorjev iz hemoglobina (7).

3.2.2 Manipulacija biosintezne poti sinteze hema

Zanimiv pristop je endogeni nastanek protoporfirina z dodajanjem prekursorjev, ki so vključeni v naravno pot sinteze porfirina (22, 23). Kontrolni mehanizem biosintezne poti je koncentracija protohema, ki po sistemu povratne zveze vpliva na aktivnost encima ALA sintaza in na ta način regulira količino δ -aminolevulininske kisline (δ -ALA). Če dodamo δ -ALA ($NH_2CH_2COCH_2CH_2COOH$) v organizem, lahko na ta način pospešimo biosintezo porfirinogenov in protoporfirina. Ta metoda se je izkazala predvsem pri zdravljenju nekaterih površinskih tumorjev. Dokazano je tudi, da s pripravo alkilnih estrov (npr. heksilni ester δ -ALA) izboljšamo penetracijo skozi membrane.

3.3 Klorini in bakterioklorini

Klorini so β -dihidroporfirini, bakterioklorini pa β -tetrahidroporfirini. β -dihidroporfirini imajo samo enega predstavnika-klorin, znotraj skupine β -tetrahidroporfirinov pa ločimo izobakterioklorin in bakterioklorin. Obstaja tudi β -heksahidroporfirin (shema 6).



Shema 6

Vse spojine lahko prehajajo v porfirin s počasno avtooksidacijo. Dehidrogenacijo pospešimo z dodatkom kinonov. Ta skupina spojin ima zelo pomembno vlogo v bioloških sistemih. Kot se da sklepati že iz imena, je klorin kromofor klorofila a in klorofila b (7, 24). Bakterioklorin je kromofor bakterijskega fotosintetskega pigmenta bakterioklorofila a. Izobakterioklorin je intermediat v sintezi vitamina B_{12} , njegov železov kompleks sirohema pa je prostetična skupina v sulfidnih in nitritnih reduktazah rastlin in bakterij.

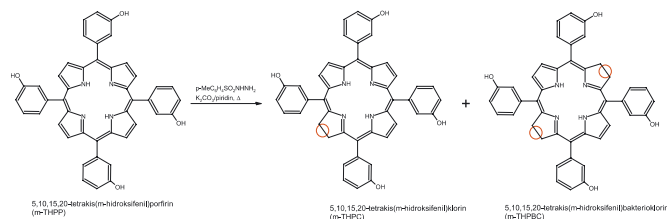
Spojine, ki spadajo v to skupino lahko dobimo na dva načina: z izolacijo in modifikacijo naravnih spojin ter s popolno sintezo.

3.3.1 Klorini in bakterioklorini, ki jih prodobimo iz naravnih virov

Eden izmed najpomembnejših fotodinamičnih fotosenzibilizatorjev, ki so izvedeni iz klorofila je monoaspartil klorin e_6 (MACE=monospartyl clhlorin e₆) (35). Njegova prednost je v tem, da ima kratko dobo fotosenzibilizacije. Uporabljajo ga pri zdravljenju ponavljajočih se adenokarcinomov prsi, karcinomov bazalnih celic in karcinomov v koži.

3.3.2 Sintezni klorini in bakterioklorini

Obstajata dve glavni poti sinteze klorinov in bakterioklorinov: redukcija z natrijem v pentanolu in reakcija z diimidom ($NH=NH$). Diimid nastane *in situ* iz p-tozil hidrazida, kalijevega karbonata in piridina. Klorin in bakterioklorin dobimo z redukcijo m-THPP (m-THPP \rightarrow m-THPC \rightarrow m-THPBC) (shema 7):



Shema 7

Fotodinamični efekt se povečuje z redukcijo v seriji spojin m-THPP, m-THPC, m-THPBC. Odmerki fotosenzibilizatorjev, potrebni za približno 5 mm globoko nekrozo tumorja pri miškah so predstavljeni v razpredelnici IV.

Razpredelnica IV. Globina nekroze tumorja, ki so jo povročili m-THPP, m-THPC in m-THPBC. (37)

Table IV. Depth of tumor necrosis caused by m-THPP, m-THPC and m-THPBC.

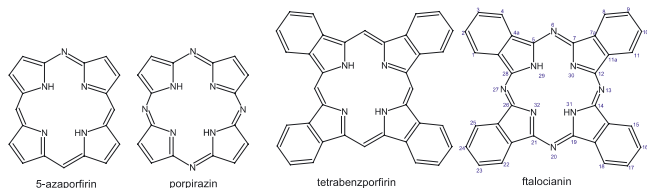
fotosenzibilizator	odmerek (μmol/kg)	globina nekroze tumorja (mm)	globina nekroze tumorja (mm)/ odmerek (μmol/kg)
m-THPP	6,3	4,6	0,7
m-THPC	0,8	5,4	6,8
m-THPBC	0,4	5,1	12,8

m-THPC in m-THPBC sta v fazi razvoja kot novi učinkovini, zaradi težje izdelave bakterioklorina je poudarek na m-THPC (Foscan). Že dve leti po odkritju m-THPC so s kliničnimi poskusi ugotovili učinkovitost te učinkovine pri mezoteliomu (rak v plevralni votlini, ki nastane zaradi izpostavljenosti azbestu). Učinkovina je sedaj v tretji fazi kliničnih testiranj za oblike rakov aerodigestivnega trakta in prostate. Ker je zelo učinkovit, se pojavljajo problemi z več dni trajajočo fotosenzibilizacijo kože (7).

Sintezno prodobljena učinkovina, ki je prav tako v tretji fazi kliničnih testiranj in spada v skupino klorinov in bakterioklorinov je tudi kositrov etiopurpurin (SnEt₂) (shema 10). Uporablja se za zdravljenje raka na prostati in starostne degeneracije centralnega dela očesne mrežnice. Med fotosenzibilizatorje druge generacije spadajo tudi benzoklorin iminijeve soli (7).

3.4 Ftalocianini in naftalocianini

Z zamenjavo mezo ogljikovega mostička v porfirinu z dušikom nastane azaporfirin, z zamenjavo vseh štirih mezo ogljikovih mostičkov, dobimo porpirazin, če pa na vse štiri β,β'-vezi porfirina vežemo benzenove obroče, dobimo tetrabenzporfirin. Ftalocianin dobimo, če zadnji spojnini zamenjamo še vse štiri ogljikove mostičke z dušikom (shema 8) (25).



Shema 8.

Z naraščajočo zamenjavo ogljikovih mostičkov z dušikom narašča stabilnost kompleksov s kovinami.

3.4.1 Ftalocianini

Prisotni so v modrih in zelenih pigmentih in barvilih, v tonerju kopirnega stroja in kot posebne plasti na zgoščenkah. Zelena barvila dobijo z uvedbo klora na aromatske obroče. Topnost ftalocianinov povečajo s sulfoniranjem.

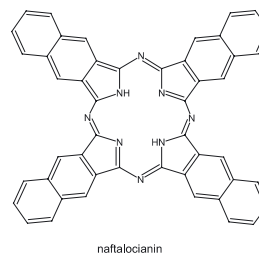
V zadnjih letih ftalocianine vse bolj uporabljajo zaradi elektroaktivnih lastnosti. V elektrofotografiji (kopiranje, tiskanje z laserskimi tiskalniki) uporabljajo fotoprevodne lastnosti titanovega ftalocianina in ftalocianina. Uporabljajo se tudi v "ink jet" tehnologiji in pri izdelavi zgoščenk.

3.4.1.1 Sulfonske kisline

S sulfoniranjem aluminijevih in galijevih ftalocianinov dobimo zmes mono, di, tri in tetra sulfonskih kislin, katerih hidrofilnost narašča v tem vrstnem redu. Disulfonirani derivati so pokazali največjo aktivnost v celičnih kulturah. Pri tem lahko nastane več izomer (36). Zmes di- in trisulfonskih kislin se uporablja za zdravljenje kožnega raka, raka na prsih in orofaringealnega raka. Biološke raziskave so pokazale da aktivnost derivatov pada v seriji S_{2a} > S_{2o} (derivati kjer sta sulfonski skupini na dveh sosednjih obročih so aktivnejše od derivatov, kjer sta sulfonski skupini na nasprotnih obročih), prav tako pa pada v seriji S₂ > S₁ > S₃ > S₄ (disulfonske kisline so bolj učinkovite kot mono-, tri- in tetrasulfonske kisline). Sposobnost agregacije narašča v seriji S₄ < S₁.

3.4.2 Naftalocianini

Če se število aromatskih obročev povečuje, se absorpcijski maksimum premika proti daljšim valovnim dolžinam. Naftalocianini tako absorbirajo v območju 770-800 nm (shema 9).



Shema 9.

Začetne študije fotodinamične terapije z uporabo naftalocianinov niso bile spodbudne, v zadnjem času pa so se pojavile možnosti uporabe teh spojin v zdravljenju melanomov. Shopova in Wöhrle sta namreč pokazala, da se Zn(II) kompleks naftalocianina kopiči v pigmentiranih celicah melanoma in tam povzroči fotoinaktivacijo (26). Razlika v selektivni toksičnosti na celice, ki vsebujejo melanin in na tiste brez melanina nastopi, ker melanin deluje kot opični filter in ker je življenjska doba tripleta krajša v celicah z melaninom (17 μs) kot v celicah brez melanina (40 μs).

3.5 Drugi Fotosenzibilizatorji

Drugi fotosenzibilizatorji so strukturno zelo raznolika skupina (27). Mednje spadajo: cianinska barvila (28,29), razširjeni kinoni (30), fenotiazini, ksanteni, porfirceni, skvarini, teksapirini in konjugirani fotosenzibilizatorji.

Zanimivi predstavniki, ki tudi spadajo v skupino drugih fotosenzibilizatorjev so konjugirani fotosenzibilizatorji (31,32). Konjugacijo razumemo kot kovalentno pripojitev molekule na drugo molekulo, ki je lahko majhna ali velika in prinese v sistem neko novo lastnost. Primer je pripojitev fotosenzibilizatorja na monoklonska protitelesa, ki se vežejo na specifičen receptor na tumorski celici. Drugi primer je spojina, ki je derivat estradiola in se uporablja za zdravljenje raka na prsih. Pri tem izkoriščajo dejstvo, da je v takem tkivu povečano število receptorjev za estrogen. Spojina ima na estradiolski skelet vezan porfirinski sistem, ki je fotosenzibilizator, estradiol pa poskrbi za selektivno toksičnost. Zanimivi so tudi primeri učinkovin, kjer je porfirinski skelet pripet na oligonukleotid, ki se veže na nukleinske kisline. Ta tip spojini izkazuje protivirusno delovanje (33).

3.6 Pomembnejši fotosenzibilizatorji

5-aminolevulinska kislina /LEVULAN/ (Shema 10). 5-aminolevulinska kislina je predzdravilo. Iz nje v telesu nastane porfirin. Uporablja se predvsem v fotodinamični terapiji površinskih tumorjev (karcinom bazalnih celic, Bowenova bolezen in aktinska keratoza).

Metilaminolevulinska kislina /METVIX/ se uporablja za zdravljenje aktinske keratoze in nemelanomskih oblik raka na koži (karcinom bazalnih celic). Mehanizem delovanja je podoben kot pri 5-aminolevulinski kislini. Z esterifikacijo 5-ALA z alifatskimi verigami dosežemo večjo lipofilnost, kar poveča učinkovitost privzema v celice. Problem 5-ALA je namreč slaba penetracija v tkivo tumorja, lipofilni estri pa imajo močnejše izražen terapevtski učinek, kar pomeni, da potrebujemo manjše odmerke učinkovine za zdravljenje (34).

Porfimer natrij /PHOTOFRIN/ je mešanica oligomerov porfirinskih enot (lahko jih je do osem) povezanih z eterskimi in esterskimi vezmi. Uporablja se v fotodinamični terapiji tumorjev. Terapija poteka v dveh stopnjah. V prvi prašek zmešamo z raztopino dekstroze ali natrijevega klorida in ga injiciramo intravensko. Učinkovina se odstrani iz večine tkiv po 40 do 72 urah (klirens 0,051 mL/min/kg), kopiči pa se v tumorjih, koži in organih retikuloendotelijskega sistema. Po 40-50 urah na mesto tumorja posvetimo z laserjem z valovno dolžino svetlobe 630 nm (druga stopnja terapije). Uničenje tumorja je posledica tvorbe singletnega kisika, posledično pa se tvorijo tudi superoksidni in hidroksilni radikali. Njegovo učinkovitost so preizkušali v kliničnih študijah proti raku požiralnika in endobronhialnemu raku.

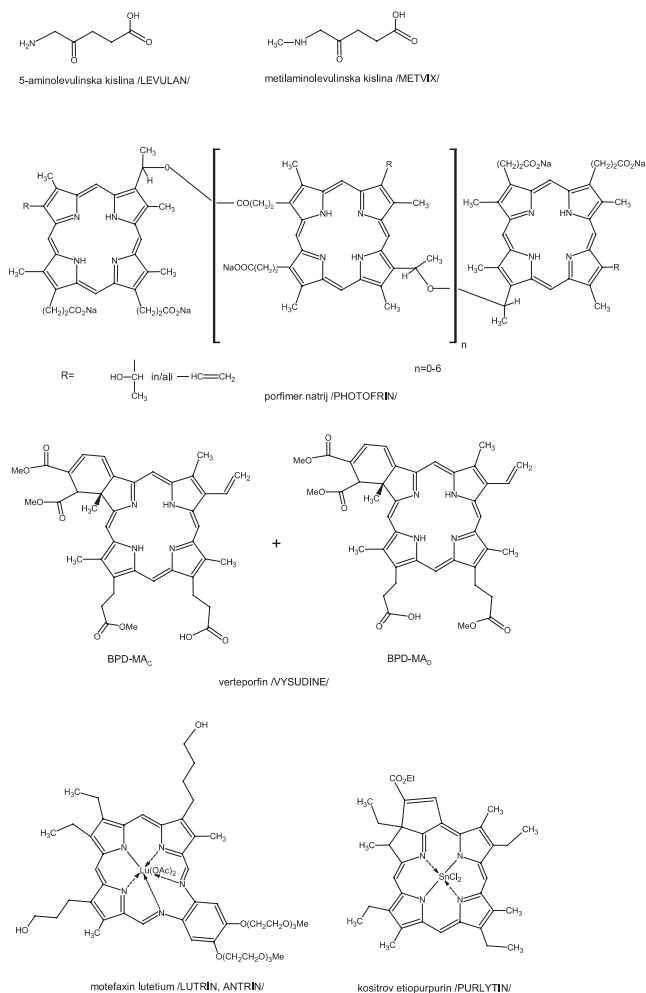
Verteoporfin /VISUDYNE/. Uporablja se v obliki sterilnega praška za intravensko infuzijo. Obe strukturni izomeri, BPD-MA_C in BPD-MA_D (njuno razmerje v farmacevtski obliki je 1:1), sta enako učinkoviti. Terapija poteka v dveh stopnjah, podobno kot pri porfimer natriju. Razpolovna doba je pri bolnikih z normalno jetrno funkcijo 4,7 h. Problem pri verteoporfinu in porfimer natriju je, da svetlobna aktivacija obeh učinkovin lahko povzroči poškodbe na neovaskularnem endoteliju, posledično se sproščajo prokoagulacijski in vazoaktivni faktorji, ki povzročijo agregacijo trombocitov in vazokonstikcijo.

Uporablja se pri zdravljenju bolnikov s horoidalno neovaskularizacijo kot posledico z leti povezane makularne degeneracije (age-related macular degeneration) ali drugih makularnih bolezni.

Motexafin lutetium /LUTRIN, ANTRIN/ je v I/II fazi raziskav. Deluje proti raku na dojkah, melanomom in Kaposijevem sarkomu. DLI (drug-light interval) je 3h (osvetlino lahko torej že po treh urah).

Etiletiopurpurin. Ker je zelo hidrofoben, uporabljamo posebne sisteme za njegovo dostavo na mesto delovanja (emulzije, liposomi, lipoproteini in ciklodekstrin). Za etiletiopurpurin se uporabljajo biološko razgradljive cianoakrilatne nanosfere s premerom 150-250 nm.

V spodnji shemi (shema 10) so navedene strukture pomembnejših fotosenzibilizatorjev.



Shema 10

4 Sklep

Kjub temu, da je fotodinamična terapija v zadnjih dvajsetih letih naredila velik napredek v terapiji raka, se še vedno pojavljajo določeni

dvomi v zvezi z njeno uporabo. Prva odobritev njene uporabe s strani regulatornih agencij se je zgodila šele leta 1993 v Kanadi, v Veliki Britaniji pa šele leta 1999 in še to pod strogo določenimi pogoji uporabe. Najbolj učinkovita je v zgodnjih fazah detekcije in zdravljenja tumorjev. Prednosti njene uporabe so, da jo lahko izvedemo relativno varno, dostikrat ni potreben kirurški poseg, ima malo stranskih učinkov, ne uničuje kolagena in je relativno poceni. Njena slabost je v tem, da lahko povzroči fotoobčutljivost, ki traja več tednov, vendar se pri novejših učinkovinah temu skušajo izogniti. Intenzivne raziskave kažejo, da bo v prihodnosti fotodinamična terapija lahko postala pomembna za zdravljenje luskavice, artritisa, AMD (*age-related macular degeneration*), nekaterih avtoimunskih bolezni (arthritis), ateroskleroze in celo kot antimikrobna in antivirusna terapija.

5 Literatura

- Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. *Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants*. Lancet, 1958. **1**(7030): 1094-7.
- Parrish JA., Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. *Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light*. N Engl J Med, 1974. **291**(23): 1207-11.
- Calvert JG, Pitts JN. *Photochemistry*. 1996, Wiley, New York. 736.
- Bock G, Harnett S.. *Photosensitizing compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*. Ciba Foundation Symposium 146, 1989.
- Braslavsky SE Houk KN. *Glossary of terms used in photochemistry*. Pure Appl. Chem., 1998. **60**: 1055.
- Hawk JLM, Parrish JA. *Responses of normal skin to ultraviolet radiation*. The Science of Photomedicine, ed. J.D. Regan and J.A. Parrish. 1982, New York: Plenum. 219-60.
- Bonnet R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Advanced Chemistry Texts. Vol. 1. 2000, Gordon and Brach Science Publishers. 1-305.
- Haliwell B, Gutteridge JMC., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2 ed. 1992, Oxford, UK: Clarendon Press. 86-186.
- Roche JVE, Whitehurst P, Moore JV, Krasner N. *Photodynamic therapy of gastrointestinal tumors: a new light delivery system*. Lasers Med.Sci., 1998. **13**: 137-142.
- Lane N. *New light on medicine*. Sci Am, 2003. **288**(1): 38-45.
- Koller J., *Struktura atomov in molekul: molekule, osnove spektroskopije*. 2000, Ljubljana, FKKT.
- Atkins W. *Physical chemistry*. 1997, Oxford University Press. 591-62.
- Watanabe T, Katayama S, Enoki M, Honda Y, Kuwahara M. Watanabe T. *Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from Ceriporiopsis subvermisporea and Bjerkandera adusta*. Eur J Biochem, 2000. **267**: 4222-4231.
- Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. *Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution*. J.Phys. Chem. Ref. Data, 1993. **22**: 113-262.
- Keating B, Hinds MF, Davis SJ. *A Singlet Oxygen Sensor for Photodynamic Cancer Therapy*.in *Proceedings of the International Congress on Applications of Lasers and Electro-Optics*. 1999. Physical Sciences Inc. Andover, Massachusetts.
- Wasserman HH, Murray R.W. *Singlet Oxygen*. 1979, Academic Press.
- Ho RYN, Liebman JF, Valentine JS. *Overview of Energetics and Reactivity of Oxygen*. Active Oxygen in Chemistry., ed. C.S.V. Foote, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. 1995, Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Sternberg D, Dolphin D, Brückner C. *Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Tetrahedron, 1998. **54**: 4151-4202.
- Kadish KM, Smith KM, Guilers R., *The Porphyrin Handbook*. 2000. **1-10**.
- Bonnet R, Ridge RJ, Scourides PA, Berenbaum MC. *On the nature of hematoporphyrin derivative*. J. Chem. Soc., 1981. Perkin Trans I: 3135-3140.
- Kelly JF, Snell ME. *Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder*. J Urol, 1976. **115**(2): 150-1.
- Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. *Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results*. J Clin Laser Med Surg, 1996. **14**(5): 289-304.
- Peng Q, Warloe T, Berg k, Moan J, Kongshaug M, Giercksky K-E, Nesland JM. *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges*. Cancer, 1997. **79**(12): 2282-308.
- Scheer, H., *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Leznoff CC, Lever ABP, *Phtalocyanines: properties and applications*. Vol. 1-4. 1989, 1993, 1993, 1996, New York, VCH Publishers.
- Shopova M, Wohlr D, Stoichkova N, Milev A, Mantareva V, Muller S, Kassabov K, Georgiev K., *Hydrophobic Zn(II)-naphthalocyanines as photodynamic therapy agents for Lewis lung carcinoma*. J Photochem Photobiol B, 1994. **23**(1): 35-42.
- Wainwright M. *Non-porphyrin photosensitisers in biomedicine*. Chem. Soc. Rev., 1996. **25**: 351-359.
- Chen JY, Mak NK, Wen JM, Leung, WN, Chen SC, Fung MC, Cheung WHA. *A comparison of the photodynamic effects of temoporfin (mTHPC) and MC540 on leukemia cells: efficacy and apoptosis*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(4): 545-54.
- Frickweiler S, Szeimies R-M, Bäuml W, Steinbach P, Karrer S, Goetz AE, Abels C, Hofstädter F, Landthaler M. *Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro*. J Photochem Photobiol B, 1997. **38**(2-3): 178-83.
- Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Koderhold G, Kreitner M. *Hypericin in phototherapy*. J Photochem Photobiol B, 1996. **36**(2): 113-9.
- Mew D, Lum V, Wat CK, Towers GHN, Sun CHC, Walter RJ, Wright W, Berns MW, Levy JG. *Ability of specific monoclonal antibodies and conventional antisera conjugated to hematoporphyrin to label and kill selected cell lines subsequent to light activation*. Cancer Research, 1995. **45**: 4380-4386.
- Vrouenraets MB, Wisser GWM, Stewart FA, Stigter M, Oppelaar H, Postmus PE, Snow,GB, van Dongen. *Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy*. Cancer Res, 1999. **59**(7): 1505-13.
- Boutorine AS, Brault D, Takasugi M, Delgado O, Helene C. *Chlorin-oligonucleotide conjugates: synthesis, properties, and red-light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes*. J. Amer. Chem. Soc., 1996. **118**: 9469-9476.
- Stepp H., *Principles of clinical photodynamic therapy*. 2003. **33**(4). <http://www.acta-endoscopica.com/a330401e.html>
- Nelson JS, Roberts WG, Berns JW. *In vivo studies in the utilisation of mono-L-aspartate chlorin (NPe6) for photodynamic therapy*. 1987.**47**:p.4681-4685
- Ambroz M, Beeby A, MacRobert AJ, Simpson MSC, Svendsen RK, Phillips D. *Preparative, analytical and fluorescence spectroscopic studies of sulphonated aluminium phtalocyanine photosensitisers*. J. Photochem. Photobiol., 1991. **9**: 87-95
- Bonnett, R., White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. *Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers*. Biochem J, 1989. **261**(1): 277-80.
- Moan J, Berg K. *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochem Photobiol, 1991. **53**(4): 549-53.