

1. Department of Synthesis Chemistry, Institute of Chemistry, University of Silesian, 40-006 Katowice, ul. Szkolna 9
2. Katedra Fizjoterapii, Wyższa Szkoła Ekonomii i Administracji w Bytomiu, 41-907 Bytom, ul. A. Frycza-Modrzewskiego 12

Fotodynamiczna terapia nowotworów

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna (PDT), diagnostyka fotodynamiczna (PDD), nowotwory, fotouczulacze, porfiryny

Key words: photodynamic therapy (PDT), photodynamic diagnostics (PDD), cancer, photosensitizer, porphyrin

Wstęp

Światło jest wykorzystywane w leczeniu od tysięcy lat. W starożytności leczono przy jego pomocy choroby takie jak bielactwo, łuszczyca, krzywica, a nawet psychozy [1]. Właściwości lecznicze promieniowania zostały również zauważone przez starożytnych Greków, którym zawdzięczamy określenie helioterapii. Pierwsze doniesienia o fizjologicznych podstawach oddziaływania promieniowania słonecznego na organizm ludzki pojawiły się około 460-375 r. p.n.e., zaś doświadczenia z fotouczulającymi związkami naświetlanymi światłem słonecznym prowadzono już w 1200 r. p.n.e.

W 1800 r. Friedrich Wilhelm Herschel jako pierwszy opisał światło podczerwone, a w 1806 r. Johann Wilhelm Ritter dokonał odkrycia światła ultrafioletowego, którego promieniowanie miało właściwości bakterioobójcze. Możliwość eliminacji bakterii skłoniła Nielsa Ryberga Finse na do podjęcia badań nad opracowaniem metod leczenia za pomocą światła, chorób takich jak, ospa wietrzna czy gruźlica skórna. Opracowane przez niego metody przyniosły doskonałe wyniki, co w efekcie doprowadziło do przyznania mu w 1903 r. nagrody Nobla w dziedzinie medycyny.

Oprócz pozytywnych właściwości promieniowania w XIX wieku wykryto również, że kontakt ze światłem słonecznym negatywnie wpływa na pacjentów zażywających pewne leki.

Od 1897 r. trwały badania mające określić wpływ stężenia fotouczulacza na jego toksyczność. Po przeprowadzeniu testów *in vitro* stwierdzono, że toksyczność badanych związków nie jest związana ze stężeniem fotouczulacza, lecz z ilością światła. W 1902 r. Ledoux-Lebards odkrył, że w reakcjach fototoksycznych niezbędna jest obecność tlenu, a w 1903 r. Tappeiner i Jesionek zastosowali terapię fotodynamiczną w leczeniu nowotworów skóry światłem

słonecznym. Rok później dzięki Tappeinerowi termin „fotodynamiczna” zostaje przyjęty do określania terapii zależnej od światła. W kolejnych latach prowadzono wiele badań nad nowymi fotosensybilizatorami, jak również nad ich akumulacją w tkankach i wreszcie nad praktycznym zastosowaniem metody fotodynamicznej. Diagnostyka i leczenie komórek oraz tkanek zmienionych chorobowo stało się możliwe dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku, kiedy dostępne stały się systemy dostarczania światła do tkanek oparte na technice laserowej i światłowodowej. Dalsze badania i prace poświęcone były głównie wyjaśnieniu mechanizmów kumulacji fotouczulaczy w tkankach i narządach oraz dozowaniu światła w efekcie fotodynamicznego niszczenia komórek [2].

Fizyczne i fotochemiczne podstawy terapii fotodynamicznej

Ideą terapii fotodynamicznej jest absorpcja promieniowania elektromagnetycznego przez cząsteczki fotosensybilizatorów, co prowadzi do wzbudzenia ich do wyższych stanów elektronowych. Molekuła może znajdować się w stanie singletowym lub tripletowym, w zależności od spinowej liczby kwantowej elektro-nów ($S=0$ lub $S=1$) jaką posiada. Energia promieniowania E jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali λ

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

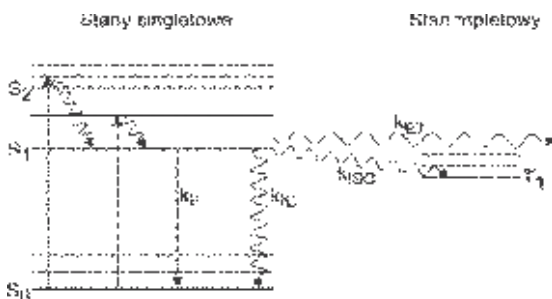
gdzie $h=6,626 \cdot 10^{-34}$ [J·s] oznacza stałą Plancka, $c=3 \cdot 10^8$ [m/s] – prędkość światła, a λ – długość fali promieniowania [3].

Energia wzbudzenia podstawowego stanu singletowego S_0 do pierwszego stanu wzbudzonego S_1 aromatycznych cząsteczek organicznych mieści się zwykle w przedziale

od 1,5 do 3,5 eV, czemu odpowiadają długości fali 300-800 nm. W przypadku cząsteczek organicznych za widmo absorpcji odpowiedzialne są przejścia elektronów z podstawowego stanu singletowego S_0 do stanów wyższych S_n oraz ich poziomów oscylacyjnych. Po takim wzbudzeniu następują krótkotrwałe (10^{-15} s), bezpromieniste przejścia do najniższego wzbudzonego stanu S_1 wolnego od drgań. Następnie w ciągu kilku piko- do nanosekund elektrony przechodzą do stanu podstawowego S_0 i jego poziomów oscylacyjnych. Przejściom tym może towarzyszyć emisja promieniowania – wtedy mamy do czynienia ze zjawiskiem fluorescencji (k_F), lub dzięki zjawisku wewnętrznej konwersji (k_{IC}) przejścia zachodzą bezpromieniście.

Istotną rolę odgrywają również przejścia ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do wzbudzonego stanu tripletowego T_1 . Są to przejścia wzbronione, zachodzące według mechanizmu interkombinacyjnego (k_{ISC}) i związane są ze zmianą spinu elektronów. Niemniej ze względu na długi czas życia rzędu milisekund, przejścia te znalazły diagnostyczne zastosowanie. Podczas powrotu elektronów z T_1 do podstawowego stanu S_0 następuje emisja promieniowania i jest to zjawisko fosforescencji.

Ważnym elementem jest także bezpromienisty transfer energii ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do sąsiednich cząsteczek (k_{ET}), a szczególnie istotne wydaje się przekazywanie energii ze stanu tripletowego T_1 do sąsiednich cząsteczek tlenu.



Rys. 1. Diagram Jabłońskiego – schemat molekularnych poziomów energetycznych oraz przejść elektronowych. Linie ciągłe – przejścia promieniste, linie falowe – przejścia bezpromieniste [2].

Biorąc pod uwagę wszystkie przejścia ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 , otrzymuje się odwrotność czasu życia stanu wzbudzonego S_1 (τ)

$$k = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} = \frac{1}{\tau}$$

Dobry znacznik fluorescencji odznacza się wysoką wydajnością kwantową

$$\eta_F = \frac{k_F}{k}$$

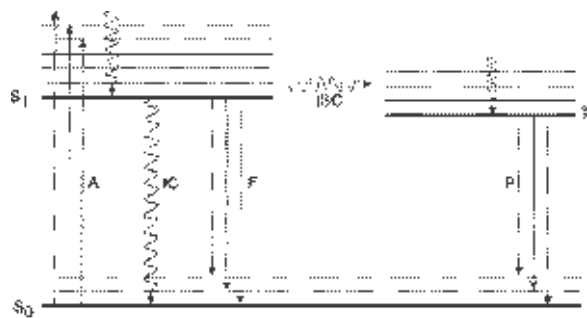
natomiast dobre fotouczulacze charakteryzuje tripletowa wydajność kwantowa [2]

$$\eta_{ISC} = \frac{k_{ISC}}{k}$$

Cząsteczki fotosensybilizatorów dzięki pochłanianiu światła zostają wzbudzone z podstawowego stanu do stanów wyższych, po czym w ciągu kilku nanosekund mogą zostać dezaktywowane. Istnieją trzy drogi dezaktywacji. Po pierwsze zaabsorbowana energia może zostać przekształcona w ciepło w wyniku bezpromienistego przejścia do stanu podstawowego. Zjawisko to jednak nie ma zastosowania w terapii fotodynamicznej (PDT) ani w fotodynamicznej diagnostyce (PDD).

Drugim sposobem jest przejście z poziomu wzbudzonego S_1 do stanu podstawowego S_0 lub jego poziomów oscylacyjnych z wypromieniowaniem energii w formie światła – fluorescencja. Stosunek liczby wyemitowanych fotonów do liczby fotonów pochłoniętych określany jest jako wydajność kwantowa fluorescencji (η_F) i zależy od chemicznej budowy fotouczulacza oraz od środowiska czy temperatury.

Trzecią możliwością jest bezpromieniste, interkombinacyjne przejście elektronów ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do stanu tripletowego T_1 . Cząsteczka będąc w stanie tripletowym może przekazać energię sąsiednim molekułom lub wyemitować ją w wyniku powrotu elektronów do stanu podstawowego S_0 – fosforescencja.



Rys. 2 Procesy wykorzystywane w diagnostyce fluorescencyjnej ($S_1 \rightarrow S_0$) i terapii fotodynamicznej ($S_1 \rightarrow T_1$) [2].

Mechanizm PDT

Metoda terapii fotodynamicznej (PDT) określana często fotochemioterapią, może być skutecznym sposobem w zwalczaniu niektórych odmian nowotworów [4].

Procesem inicjującym mechanizm fotodynamiczny jest absorpcja promieniowania przez cząsteczkę fotouczuła-

niszczenie komórek nowotworowych występuje, gdy stosowane są związki posiadające stosunkowo długi połowiczny czas życia stanu tripletowego oraz odznaczają się wysoką wydajnością kwantową dla tego stanu.

Fotosensybilizator może oddziaływać z sąsiadującymi molekułami na dwa sposoby. Wyróżniamy zatem dwa typy reakcji fotooksydacyjnych.

Pierwszy typ obejmuje transfer elektronu lub atomu wodoru oraz wytworzenie rodnikowej formy fotouczulacza lub substratu. Produkty te mogą reagować z tlenem tworząc formy nadtlenkowe, jony ponadtlenkowe i rodniki hydroksylowe, które mogą inicjować wolnorodnikowe reakcje łańcuchowe.

Drugi typ reakcji fotoutleniających obejmuje przeniesienie energii pomiędzy cząsteczką fotouczulacza a cząsteczką tlenu [5]. W wyniku tego procesu fotosensybilizator wraca do stanu podstawowego, tlen zaś zostaje wzbudzony do stanu singletowego (stanem podstawowym dla cząsteczki tlenu jest stan tripletowy). Generowanie tlenu singletowego wydaje się spełniać kluczową rolę w fotodynamicznej cytotoksyczności [6].

Mimo że szczegółowy mechanizm reakcji fotodynamicznych nie został do końca poznany, najlepiej zbadane zostały dwa wyżej wymienione typy reakcji fotooksydacyjnych i to na ich podstawie próbuje się wyjaśniać szereg przemian zachodzących na poziomie komórki czy tkanki.

Mechanizm według którego będzie przebiegał proces zdeteminowany jest przez ilość tlenu w środowisku reakcji. Gdy stężenie tlenu jest obniżone, reakcje będą biegły według mechanizmu I, a więc z wytworzeniem form wolnorodnikowych. Rodniki nadtlenkowe $O_2^{\cdot -}$ oraz jony ponadtlenkowe O_2^{2-} są bardzo silnymi utleniaczami, więc ich powstanie powoduje niszczenie tkanki nowotworowej. Ponadto rodniki nadtlenkowe mogą reagować z cząsteczkami wody, w wyniku czego tworzą silnie reaktywne i utleniające rodniki hydroksylowe OH^{\cdot} .

Jeśli środowisko, w którym będzie przebiegała reakcja fotodynamiczna jest bogate w molekularny tlen, wówczas proces zachodzi według mechanizmu II, a więc generowany jest tlen singletowy. Podstawowym stanem dla tlenu molekularnego jest stan tripletowy, posiada on dwa niesparowane elektrony na orbitalach p, a całkowity spin elektronowy $S=1$. Stan singletowy charakteryzuje się dwoma sparowanymi elektronami i wypadkowym spinem elektronowym $S=0$. Tlen singletowy jest formą metastabilną i odznacza się wysoką reaktywnością, co prowadzi do niszczenia komórek w wyniku podobnych mechanizmów oksydacyjnych jak w przypadku mechanizmu I.

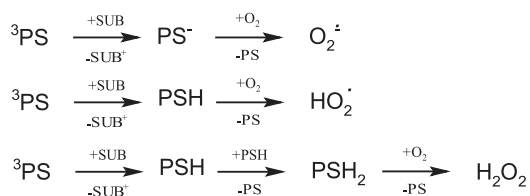
Jak już wspomniano kluczową rolę w reakcjach fotodynamicznych odgrywa mechanizm generowania singletowego tlenu. Dzieje się tak ze względu na stosunkowo długi czas życia tlenu singletowego w porównaniu z czasem

życia rodników. Wynosić on może od $6 \cdot 10^{-7} - 10^{-4}$ s w zależności w jakim środowisku się znajduje.

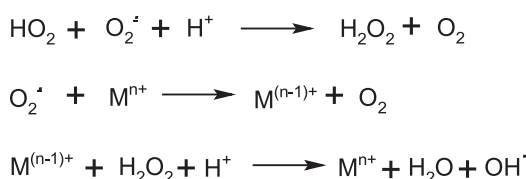
W środowisku komórki tlen singletowy żyje około $0,5 \mu s$ co pozwala mu dyfundować na odległości rzędu $0,1 - 0,2 \mu m$ [7].

Mechanizm I

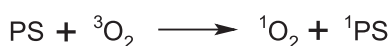
Pierwotne reakcje fotouczulaczy



Reakcje możliwe w dalszym ciągu procesu

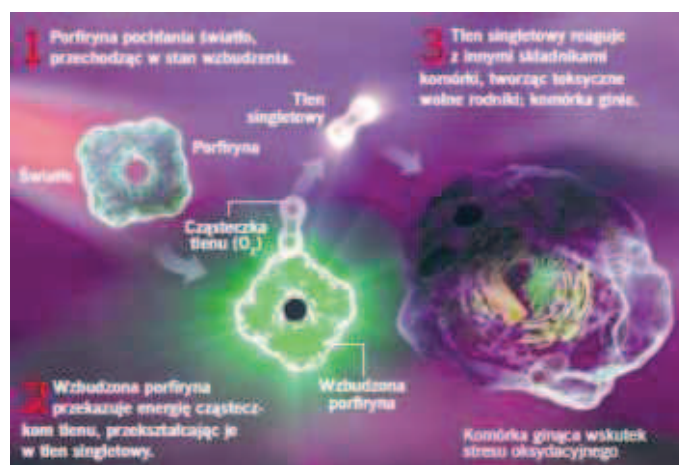


Mechanizm II



Rys. 4 Tworzenie rodników nadtlenkowych oraz rodnika hydroksylowego w mechanizmie I. Tworzenie tlenu singletowego w mechanizmie II. (3PS – fotosensybilizator w stanie tripletowym, 1PS i PS – fotosensybilizator w stanie podstawowym, SUB – reaktywny substrat, Mn^{n+} - jon metalu) [2].

Oddziaływanie form wolnorodnikowych lub tlenu singletowego na struktury subkomórkowe doprowadza w efekcie do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy.



Rys. 3. Mechanizm terapii fotodynamicznej [8].

Fotosensybilizatory w terapii i diagnostyce fotodynamicznej

Uzyskanie efektu fotodynamicznego wymaga spełnienia kilku warunków. Po pierwsze niezbędna jest obecność fotosensybilizatora, który uczula tkankę na działanie światła. Po drugie potrzebne jest źródło światła, które emituje promieniowanie o odpowiedniej długości fali zdolne do wzbudzenia zakumulowanego w tkance fotouczulacza. I wreszcie odpowiednia ilość tlenu molekularnego rozpuszczonego w tkance.

Istnieje wiele związków fotoaktywnych, jednak tylko niektóre, spełniające określone warunki, znajdują zastosowanie w diagnostyce i terapii fotodynamicznej. Dobry fotosensybilizator powinien:

- posiadać stały, dobrze zdefiniowany skład chemiczny,
- selektywnie gromadzić się w tkance zmienionej chorobowo w czasie od 70 do 150 godzin,
- charakteryzować się brakiem efektów fototoksycznych w zdrowej tkance,
- posiadać maksymalne intensywne pasma absorpcji, nie pokrywające się z pasmami absorpcji barwników endogennych takich jak melanina, hemoglobina czy oksyhemoglobina,
- wykazywać wysoką wydajność tlenu singletowego lub rodnikową w reakcji ze światłem,
- stanowić jak najmniejsze źródło efektów ubocznych [9].

Poza wyżej wymienionymi kryteriami również sama synteza fotouczulacza powinna być stosunkowo prosta, wydajna, a substraty do niej potrzebne łatwo dostępne [10].

Wymagania jakie stawiane są związkom, które potencjalnie mogłyby być stosowane w PDT są wysokie więc trudno znaleźć fotouczulacz spełniający je wszystkie. Poza tym trudno wyobrazić sobie by jeden uniwersalny związek mógł być równie dobrze skuteczny w leczeniu różnego typu nowotworów. Wynika to ze zróżnicowanej struktury różnych tkanek jak i z wielu innych czynników w środowisku komórki.

Fotouczulacze zasadniczo można podzielić na wiele grup w zależności od kryterium według jakiego dokonuje się podziału [11]. Najczęściej pod uwagę bierze się rozpuszczalność w wodzie i tłuszczach. Wyróżniamy zatem fotouczulacze:

- hydrofobowe – wykazujące powinowactwo do tłuszczów
- hydrofilowe – rozpuszczalne w wodzie, które podzielić można na:
 - ▶ kationowe – w wodzie tworzące jon dodatni
 - ▶ anionowe – w roztworze wodnym będące jodem ujemnym
- amfifilowe – zawierające w swej strukturze fragment hydrofilowy jak również hydrofobowy [2].

Fotouczulacze o właściwościach amfifilowych wydają się mieć największe znaczenie w praktyce klinicznej ze

względu na ich powinowactwo zarówno do lipidowych jak i wodnych części komórki.

Fotouczulacze porfiryne

Porfiryny są aromatycznymi związkami makrocyklicznymi, które od wieków wzbudzały zainteresowanie naukowców z dziedzin takich jak chemia, biochemia, biologia czy medycyna [12]. Do dziś jest to najlepiej przebadana grupa związków mająca pełnić funkcje fotouczulaczy.

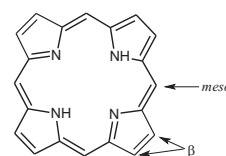
Porfiryny są związkami heterocyklicznymi składającymi się z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi =CH-. Pierścień porfiryneowy posiada charakter aromatyczny. Posiada 22 elektrony π , jednak uważa się, że w układzie aromatycznym sprzęga się tylko 18 zdelokalizowanych elektronów π , [13], jak zaznaczono (**1**). Chromoforowe własności sprzężonego układu wiązań nienasyconych odpowiedzialne są za silną absorpcję porfiryn w zakresie UV-VIS i za ich intensywne zabarwienie. Typowe porfiryny są krystalicznymi ciałami stałymi o głębokim fioletowym zabarwieniu.

Cząsteczka porfiryne (**1**), jak często określa się niepodstawioną porfiryne, stabilizowana jest przez rezonans, którego energię szacuje się na 1200 kJ/mol, ma wielkość około 9 Å, około 4 Å wewnętrznej średnicy oraz jest płaska. Planarność pierścienia porfiryneowego może jednak zostać zaburzona przez wprowadzenie do niego podstawników, które mogą być przyczyną deformacji.

Porfiryny posiadają ogromne zdolności kompleksujące. Znane są ich kompleksy z prawie wszystkimi jonami metali, a nawet z niektórymi niemetalami. W PDT najistotniejszą rolę odgrywają kompleksy metali z pustymi lub całkowicie zapełnionymi orbitalami d.

Porfiryny mogą ulegać reakcjom aromatycznej substytucji elektrofilowej zachodzącym w pozycjach *meso* lub β (**1**), lub substytucji wolnorodnikowej [14].

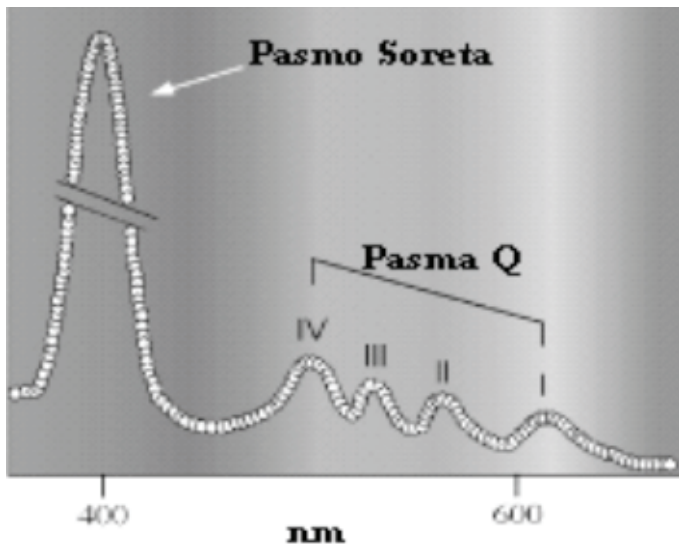
Uważa się, że szkielet porfiryneowy ma zasadniczo właściwości hydrofobowe, ale wprowadzenie do niego polarnych podstawników może zwiększyć jego amfifilowość i poprawić selektywność gromadzenia się w tkance nowotworowej [15].



1 Porfina.

W zależności od charakteru podstawników jakie zostaną wprowadzone do podstawowej struktury porfiryne można otrzymać pochodne hydrofilowe, hydrofobowe lub amfifilowe.

Widma elektronowe dla porfiryn są bardzo charakterystyczne. Przy fali długości około 400 nm obserwuje się intensywne pasmo nazywane pasmem Soreta lub pasmem B, podczas gdy w zakresie od 450 do 700 nm widoczne jest wyraźne pasmo najczęściej czterech pików o zdecydowanie mniejszej intensywności niż pasmo Soreta. Jest to tzw. pasmo Q. [16] Pasma te posiadają bardzo wysoki właściwy współczynnik absorpcji, za co odpowiedzialne są przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$.

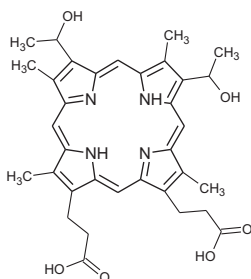


Rys. 5. Typowe pasmo absorpcji w zakresie UV-VIS dla porfiryn.

Pierwszym związkiem stosowanym w terapii fotodynamicznej była hematoporfiryna (Hp) (**2**) i jej pochodne. Związki te nazywane są fotosensybilizatorami pierwszej generacji.

Właściwościami czyniącymi porfiryny dobrymi fotouczulaczami są:

- silna absorpcja w świetle widzialnym
- trwałość cząsteczki, która stabilizowana jest przez rezonans
- niska toksyczność w ciemności.



2 Hematoporfiryna.

Mimo, że Hp jest dobrym fotosensybilizatorem, to nie jest ona odpowiednia do zastosowań klinicznych PDT, że

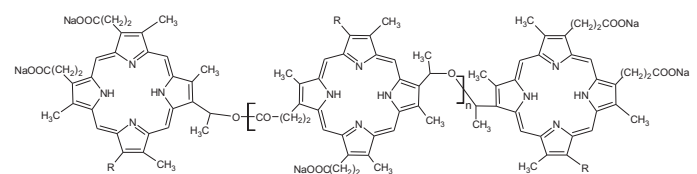
względu na stosunkowo słabą kumulację w tkance nowotworowej [17].

Hematoporfirynę otrzymuje się stosunkowo łatwo z hemoglobiny krwi, w wyniku traktowania jej kwasami mineralnymi lub mieszaniną bromowodoru w kwasie octowym. Hematoporfiryna izolowana jest najczęściej jako dihydrochlorek.

Otrzymywanie pochodnych hematoporfiryny polega na traktowaniu jej dihydrochlorku mieszaniną kwasu siarkowego (VI) i kwasu octowego, a następnie neutralizacji alkalinami do pH 7,4. Otrzymany w ten sposób preparat jest mieszaniną HpD zawierającą formy mono-, di- jak i oligomeryczne [18].

W roku 1961 Lipson i współpracownicy zaprezentowali preparat, który wykazywał pewien stopień selektywnej kumulacji w tkance nowotworowej i który pod wpływem promieniowania ultrafioletowego pozwalał na jej lokalizację.

Dalsze badania nad hematoporfirynami doprowadziły do opracowania pochodnych z pomocą, których możliwe było doskonalsze lokalizowanie tkanek nowotworowych, dzięki czemu użyteczność porfiryn, a w szczególności pochodnych hematoporfiryny (HpD), została doceniona. W latach osiemdziesiątych XX wieku opracowano pierwszy preparat porfirynowy, który uzyskał atest FDA i który stosowany jest w praktyce klinicznej. Preparat ten, znany pod handlową nazwą jako Photofrin (**3**), jest mieszaniną pochodnych hematoporfiryny, składającą się z dimerów i wyższych oligomerów, w których pierścienie porfirynowe połączone są ze sobą poprzez wiązania eterowe, estrowe bądź węgiel-węgiel.



R= $-\text{CH}(\text{OH})\text{Me}$ i/lub $-\text{CH}=\text{CH}_2$ n= 0-6

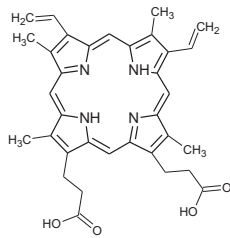
3 Photofrin [19]

Widmo absorpcyjne Photofrinu posiada pięć pików. Przy fali długości około 400 nm występuje pik najsilniejszy (pasmo Soreta), natomiast pik najniższy pojawia się przy około 630 nm [20].

Poza pochodnymi hematoporfiryny istnieją również inne fotouczulacze, których struktura oparta jest na podstawowym szkieletcie porfirynowym, a które są lub potencjalnie będą mogły być stosowane w praktyce klinicznej PDT.

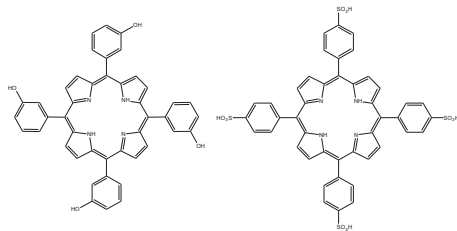
Należą tutaj związki, które opracowane zostały w Pracowni Biochemii i Spektroskopii Instytutu Optoelektroniki

WAT w Warszawie jako nowej klasy fotosensybilizatory amfifilowe. Są to diaminokwasowe pochodne protoporfiryny [9] (**4**).



(4) Protoporfiryna IX

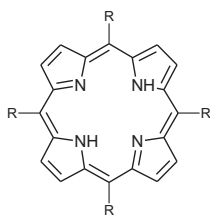
Absorpcja porfiryń może zostać wzmocniona oraz przesunięta w kierunku dłuższych fal poprzez wprowadzanie do nich odpowiednich podstawników. 5,10,15,20-tetra(3-hydroksyfenylo)porfiryra (m-THPP) (**5**) oraz 5,10,15,20-tetra(4-sulfofenylo)porfiryra (p-TPPS4) (**6**) są związkami otrzymanymi całkowicie w warunkach laboratoryjnych (należą do fotosensybilizatorów drugiej generacji), które mogą być potencjalnymi fotouczulaczami w PDT [10].



5 5,10,15,20-tetra(3-hydroksyfenylo)porfiryra (m-THPP)

6 5,10,15,20-tetra(4-sulfofenylo)porfiryra (p-TPPS4)

Poza sulfonowymi pochodnymi tetrafenyloporfiryń oraz tetra(hydroksyfenylo)-porfiryrami otrzymano wiele innych symetrycznych *meso*-podstawionych porfiryń.



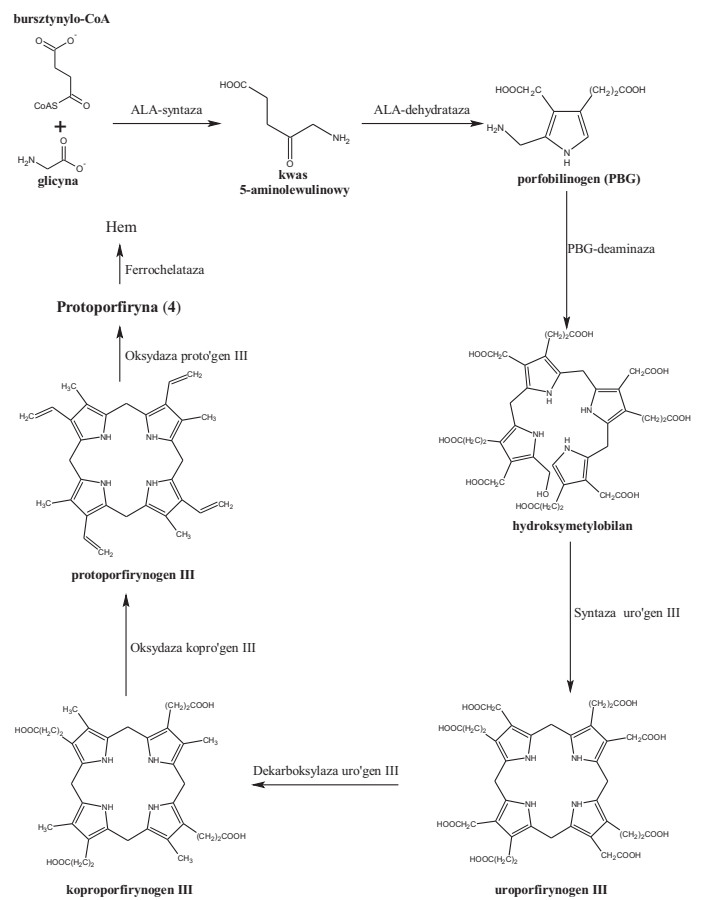
R= a). Ph b). 4-MeC₆H₄ c). 4-i-PrC₆H₄ d). 4-t-BuC₆H₄ e). 4-ClC₆H₄ f). 4-MeOC₆H₄ g). 4-MeSC₆H₄ h). 4-Pirydył

Rys. 6 Przykłady symetrycznych *meso*-podstawionych pochodnych porfiryń [21].

Istotną rolę w uczulaniu tkanek odgrywa kwas 5-aminolewulinowy (ALA). Pełni on funkcję prekursora fotosensybilizatorów porfiryńowych. Porfiryry są jedynymi fotouczulaczami, które mogą być całkowicie syntetyzowane wewnątrz organizmu (porfiryry endogenne), a kwas 5-

aminolewulinowy jest prekursorem protoporfiryny (**4**), która jest jednym z produktów pośrednich enzymatycznej biosyntezy hemu w organizmie.

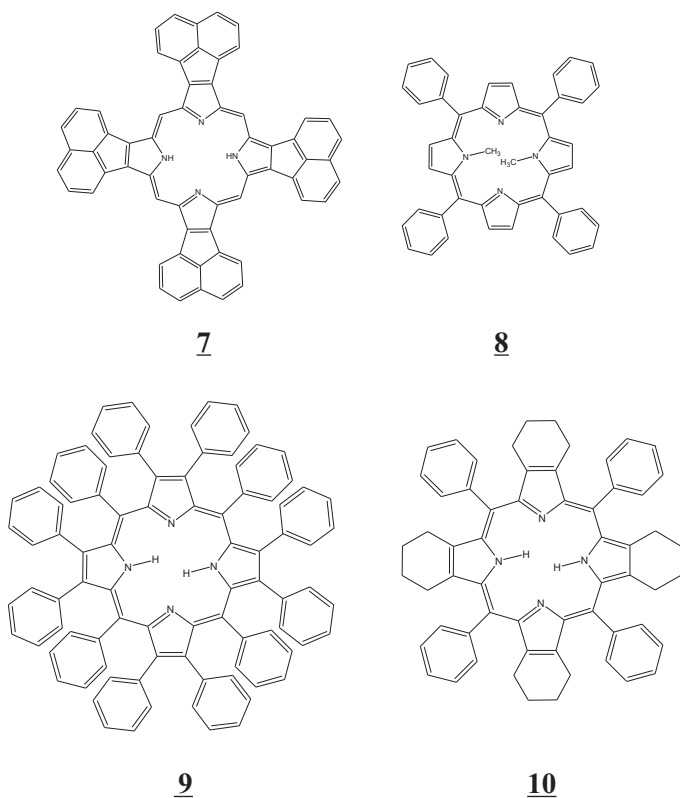
Ostatnim etapem syntezy hemu jest wprowadzenie do wnętrza pierścienia protoporfiryny (**4**) jonów Fe²⁺, który katalizowany jest przez enzym ferrochelatazę. Udowodniono, że w wyniku podania egzogenego kwasu 5-aminolewulinowego następuje kumulacja w komórkach protoporfiryny (**4**) z powodu przekroczenia możliwości kompleksujących ferrochelatazy. Ponadto stwierdzono, że w tkankach nowotworowych aktywność ferrochelatazy jest obniżona, wobec czego protoporfiryna kumulowana jest w nich z pewną selektywnością [9]. Dzięki właściwościom endogennym ALA znalazł zastosowanie kliniczne.



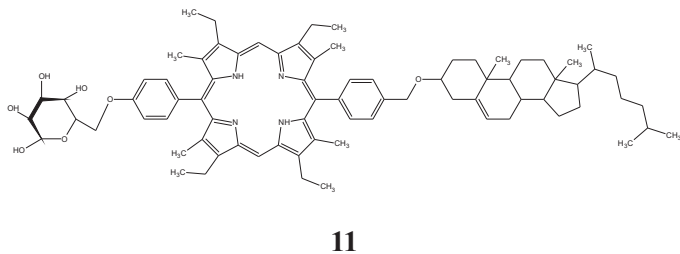
Rys. 7 Biosynteza hemu [9].

Istnieje wiele możliwości modyfikowania pierścienia porfiryńowego. Otrzymano porfiryry z zewnętrznymi ugrupowaniami chromoforowymi (**7**), z podstawionym atomem azotu wewnątrz pierścienia (**8**) oraz wiele innych *meso* i β-podstawionych związków (**9**, **10**) [22].

Porfiryry mogą być ponadto sprzęgane z biomolekułami takimi jak steroidy (**11**), lipidy, peptydy, cukry, nukleotydy czy nukleozydy [22].

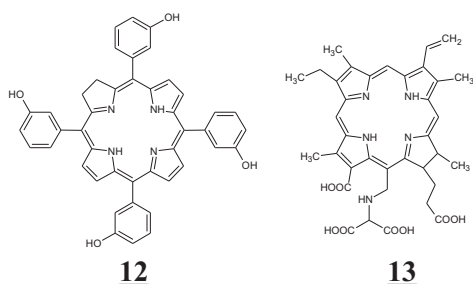


Tego typu modyfikacje strukturalne służą polepszeniu właściwości decydujących o przydatności związku w terapii.

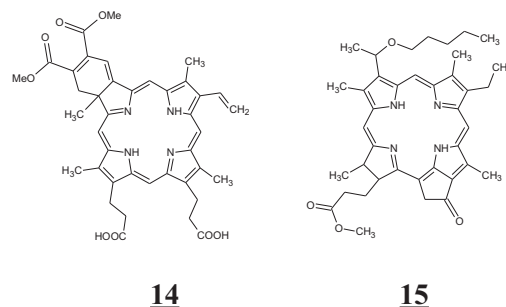


Fotosensybilizatory drugiej generacji

Poza fotosensybilizatorami pierwszej generacji, do których zalicza się hematoporfirynę (2) i jej pochodne, wyróżnia się fotosensybilizatory drugiej generacji. Charakteryzują się one absorpcją promieniowania o większej długości fali. Do tej grupy fotouczulaczy zalicza się *meso*-podstawione porfiryny, chloryny - zredukowane formy porfiryn, ftalocyjaniany, texafiryny oraz bakteriochloryny.



Zdecydowaną zaletą fotosensybilizatorów drugiej generacji jest silniejsza absorpcja promieniowania. Dlatego też są one często stosowane w PDT, a nawet doczekały się kilku preparatów stosowanych klinicznie. Należą tu m.in. Foscan (12), Monoaspartylchlorin e₆ (13), Verteporphin (14) czy Photochlor (15).



Fotosensybilizator	Długość fali dla maksimum absorpcyjnego λ_{max} (nm)	Molowy współczynnik absorpcji ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Porfiryny	620-640	3 500
<i>Meso</i> -podstawione Porfiryny	650	18 000
Ftalocyjaniany	670-700	200 000
Texafiryny	720-730	42 000
Chloryny	680	40 000
Bakteriochloryny	780	150 000

Rys. 8. Maksymalne absorpcyjne i molowe współczynniki absorpcji wybranych fotosensybilizatorów [23].

Trwają również badania nad układami typu fotouczulacz-nanoscytalator. Są to układy, w których nanocząsteczki (np. TiO₂, ZnO) miałyby być wzbudzone promieniowaniem wysokoenergetycznym, a podczas powrotu do stanu podstawowego emitowałyby promieniowanie z zakresu UV-VIS, a więc promieniowanie niezbędne do zainicjowania reakcji fotodynamicznych. Takie rozwiązania znacznie ograniczyłyby problemy związane z osłabianiem promieniowania wzbudzającego fotouczulacz, gdyż promieniowanie rentgenowskie lub gamma jest znacznie bardziej przenikliwe dla tkanek [24].

Światło w terapii

Obok fotouczulacza i obecności tlenu molekularnego w tkance, światło jest czynnikiem, bez którego niemożliwe byłoby rozpoczęcie reakcji fotodynamicznych.

W diagnostyce lub terapii fotodynamicznej ważne jest aby światło było jak najbardziej monochromatyczne. Na początku rozwoju PDT źródłami promieniowania były różnego rodzaju lampy zaopatrzone w odpowiednie monochromatory, najczęściej filtry, których zadaniem było wyodrębnienie jak najwęższej wiązki promieniowania [1].

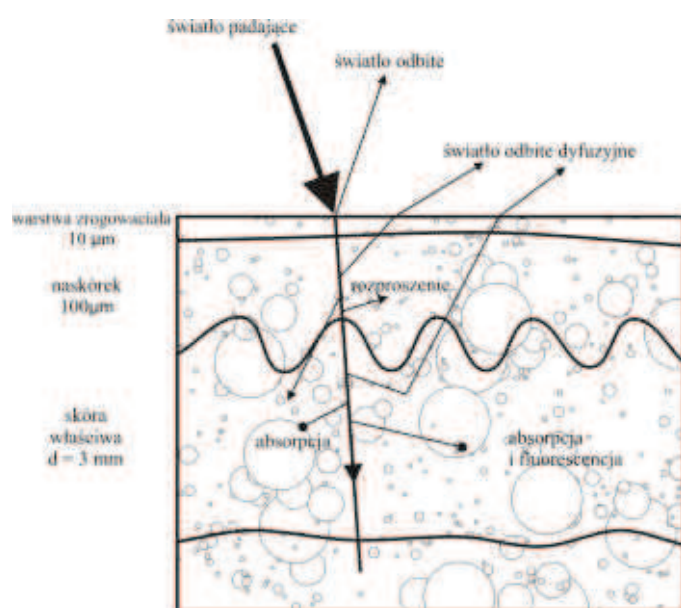
W 1960 roku T. H. Maimann skonstruował pierwszy laser, a technika laserowa w kolejnych latach zdobyła ogromną

popularność w medycynie. O popularności promieniowania laserowego zdecydowało kilka jego właściwości:

- światło lasera jest wysoce monochromatyczne
- posiada małą rozbieżność, dzięki czemu można uzyskać dużą gęstość mocy, co jest szczególnie istotne w PDT
- jest koherentne [25].

Istnieje wiele rodzajów laserów, które klasyfikować można ze względu na stan skupienia ośrodka aktywnego, sposób modulacji pracy, długość fali emitowanej wiązki czy emitowaną energię.

Podczas oddziaływania promieniowania z tkanką występują takie zjawiska jak odbicie, ugięcie, absorpcja, luminescencja i rozproszenie.



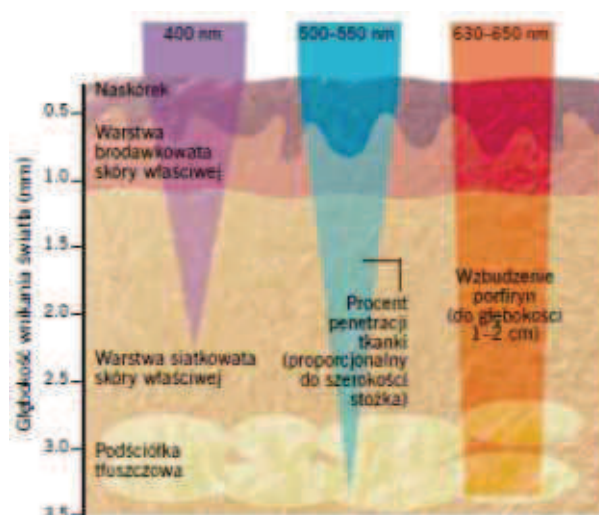
Rys. 9 Schemat procesów zachodzących podczas wnikania światła do tkanki [25].

Zainicjowanie akcji fotodynamicznej wymaga zaabsorbowania przez fotouczulacz zakumulowany w tkance promieniowania o odpowiedniej długości fali. Absorpcja może być osłabiona przez występujące w tkance barwniki endogenne lub wodę. Ważne jest stosowanie fotouczulaczy, których maksimum absorpcji przypada na tzw. medyczne okno transmisyjne tkanki [25], czyli obszar, w którym współczynnik absorpcji tkanki jest niski dla danej długości fali.

Głębokość wnikania promieniowania zależy od długości fali oraz rodzaju tkanki. W tkankach melanotycznych głębokość penetracji wynosi od 0,2 mm dla światła niebieskiego do 0,6 mm dla promieniowania o długości fali 900 nm. W tkankach niemelanotycznych główny wpływ na głębokość penetracji wywiera hemoglobina i dla tego typu tkanek głębokość penetracji wynosi od 0,5 – 1,5 mm

dla światła niebieskiego do 3,5 – 6 mm dla promieniowania o długości fali 900 nm. Światło najgłębiej dociera w tkankach, w których rozproszenie jest znikome (tkanki białe), a najsłabiej penetruje tkanki barwne [26,27].

Kryterium doboru odpowiedniego lasera w terapii fotodynamicznej jest maksimum absorpcji fotosensybilizatora. Źródło promieniowania wzbudzającego powinno emitować światło, które pokrywałoby się z długofalowymi pasmami absorpcji fotouczulacza, a wynika to z faktu, że światło o dłuższej fali posiada większą zdolność penetracji tkanki.



Rys. 10 Głębokość wnikania promieniowania w zależności od długości fali [8].

Zastosowania metody fotodynamicznej

Terapia i diagnostyka fotodynamiczna jako metody leczenia i wczesnego wykrywania nowotworów cieszą się nieślabnącym zainteresowaniem wielu jednostek badawczych na całym świecie.

Dzięki współpracy naukowców z wielu dziedzin trwają próby otrzymania nowych syntetycznych fotouczulaczy, wyznaczenia ich właściwości fizykochemicznych oraz określenia wpływu na organizm.

Terapia fotodynamiczna najszerzej stosowana jest w dermatologii. Przy jej pomocy leczy się wiele typów nowotworów skóry, ale prowadzone są badania nad zastosowaniem metody w zwalczaniu nowotworów mózgu, układu pokarmowego, oddechowego lub rozrodczego i wielu innych.

Głównym nurtem badań jest zastosowanie metody PDT w leczeniu nowotworów, jednak może być ona również pomyslnie stosowana w leczeniu nieonkologicznym. Przypuszcza się, że w przyszłości terapia fotodynamiczna znajdzie zastosowanie w leczeniu chorób naczyń krwionośnych, schorzeń oczu, jak również nienowotworowych chorób skóry.

LITERATURA:

- [1] Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M., *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochem. Photobiol. 2001 Nov; 74 (5): 656-669.
- [2] Tudaj A., Podbielska H., Zychowicz J., Stręk W., *Światło leczy – wprowadzenie do terapii i diagnostyki fotodynamicznej. Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004: 1-32.
- [3] Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002: 15-16
- [4] Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q., *Photodynamic Therapy*. J. Natl. Cancer Inst. 1998 June 17, Vol. 90, No. 12: 889-905.
- [5] Shinmori H., Kodaira F., Matsugo S., Kawabata S., Osuka A., *Photosensitizing properties of diazaporphyrin derivatives for singlet oxygen generation*. Chemistry Letters 2005; 34 (3): 322-323.
- [6] Luksiene Z., *Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment*. Medicina 2003; 39 (12): 1137-1150.
- [7] Graczykowska A., *Biochemiczne i biofizyczne podstawy fotodynamicznej metody wykrywania i leczenia nowotworów. Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999: 21-94.
- [8] Lane N., *Nowe światło dla medycyny*. Świat Nauki 2003; 2: 58-65.
- [9] Graczykowska A., Sobczyńska J., *Fotouczulacze stosowane w metodzie fotodynamicznej PDT rozpoznawania i leczenia nowotworów. Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999: 95-183.
- [10] Nyman E. S., Hynninen P. H., *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. J. Photochem. Photobiol. B 2004; 73: 1-28.
- [11] Ericson M. B., Grapengiesser S., Gudmundson F., Wennberg A. M., Larko O., Moan J., Rosen A., *A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution*. Lasers Med Sci. 2003; 18 (1): 56-62.
- [12] Vicente M. G. H., *Porphyrim-based sensitizers in the detection and treatment of cancer: Recent progress*. Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents 2001; 1: 175-194.
- [13] Pushpan S. K., Venkatraman S., Anand V. G., Sankar J., Parmeswaran D., Ganesan S., Chandrashekar T. K., *Porphyrim in photodynamic therapy – a search for ideal photosensitizers*. Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents 2002; 2: 187-207.
- [14] Bonnett R., *Porphyrim photosensitizers. Chemical aspects of photodynamic therapy*. Gordon and Breach Science Publishers, London 2000: 149-175.
- [15] Bonnett R., *Photosensitizers of the porphyrim and phthalocyanine series for photodynamic therapy*. Chem Soc Rev 1995; 24: 19-33.
- [16] Goldoni A., *Porphyrim: fascinating molecules with biological significance*. Atomic, Molecular and Supramolecular Studies: 64-65.
- [17] Brown J. E., Browan S. B., Vernon D. I., *Photodynamic therapy – new light on cancer treatment*. JSDC 1999; 115: 249-253.
- [18] Brault D., Vever-Bizet C., Dellinger M., *Fundamental aspects in tumor photochemotherapy: interactions of porphyrim with membrane model systems and cells*. Biochimie 1986; 68: 913-921.
- [19] http://www.fda.gov/cder/foi/label/2003/20451s012_photofrin_lbl.pdf
- [20] Stewart F., Baas P., Star W., *What does photodynamic therapy to offer radiation oncologists (or their cancer patients)?* Radiother. Oncol. 1998; 48: 233-248.
- [21] Drain C. M., Gong X., *Synthesis of meso substituted porphyrim in air without solvents or catalysts*. Chem. Commun. 1997: 2117-2118.
- [22] Sternberg E. D., Dolphin D., Brückner C., *Porphyrim-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Tetrahedron 1998; 54: 4151-4202.
- [23] Kozielec A. M., *Die Photodynamische Tumortherapie (PDT). Kombinatorische Synthese von amphiphilen Porphyrimoiden für die Photodynamische Tumortherapie (PDT)*. Bremen 2006: 5-12.
- [24] Buszek M., *Najważniejszy jest lek*. Gazeta uniwersytecka Uniwersytetu Śląskiego 2007; 5 (145): 4-5.
- [25] Bednarkiewicz A., Stręk W., *Odziaływanie światła laserowego z tkanką. Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004: 33-87.
- [26] Mierczyk Z., Kwaśny M., *Systemy laserowe do diagnostyki i terapii nowotworów metodą fotodynamiczną. Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999: 244-299.
- [27] March J., *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. Wiley-Interscience, New York 1992: 45.