

9-hydroxypheophorbide-a와 660 nm 다이오드 레이저를 이용한 광역학치료의 항암효과와 치료기전에 대한 연구

안 진 철*

단국대학교 의학레이저 의료기기 연구센터

Received February 4, 2009 / Accepted April 7, 2009

The Anticancer Effect and Mechanism of Photodynamic Therapy Using 9-Hydroxypheophorbide-a and 660 nm Diode Laser on Human Squamous Carcinoma Cell Line. Jin-Chul Ahn*. *Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan, Korea* - A new photosensitizer, 9-Hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a), was derived from *Spirulina platensis*. We conducted a series of experiments, *in vitro* and *in vivo*, to evaluate the anticancer effect and mechanism of photodynamic therapy using 9-HpbD-a and 660 nm diode lasers on a squamous carcinoma cell line. We studied the cytotoxic effects of pheophytin-a, 9-HpbD-a, 9-HpbD-a red and 660 nm diode lasers in a human head and neck cancer cell line (SNU-1041). Cell growth inhibition was determined by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. The effects of 9-HpbD was higher than those of 9-HpbD-a red or pheophytin-a in PDT. We then tested the cytotoxic effects of 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a) *in vitro*. The cultured SNU-1041 cells were treated with serial concentrations of 9-HpbD-a followed by various energy doses (0, 0.1, 0.5, 3.2 J/cm²) and by various interval times (0, 3, 6, 9, 12 hr) until laser irradiation, then MTT assay was applied to measure the relative inhibitory effects of photodynamic therapy (PDT). Optimal laser irradiation time was 30 minutes and the cytotoxic effects according to incubation time after 9-HpbD-a treatment increased until 6 hours, after which it then showed no increase. To observe the cell death mechanism after PDT, SNU-1041 cells were stained by Hoechst 33342 and propidium iodide after PDT, and observed under transmission electron microscopy (TEM). The principal mechanism of PDT at a low dose of 9-HpbD-a was apoptosis, and at a high dose of 9-HpbD-a it was necrosis. PDT effects were also observed in a xenografted nude mouse model. Group I (no 9-HpbD-a, no laser irradiation) and Group II (9-HpbD-a injection only) showed no response (4/4, 100%), and Group III (laser irradiation only) showed recurrence (1/4, 25%) or no response (3/4, 75%). Group IV (9-HpbD-a + laser irradiation) showed complete response (10/16, 62.5%), recurrence (4/16, 25%) or no response (2/16, 12.5%). Group IV showed a significant remission rate compared to other groups ($p < 0.05$). These results suggest that 9-HpbD-a is a promising photosensitizer for the future and that further studies on biodistribution, toxicity and mechanism of action would be needed to use 9-HpbD-a as a photosensitizer in the clinical setting.

Key words : Photodynamic therapy, photosensitizer, 9-Hydroxypheophorbide-a, cell death mechanism, apoptosis

서 론

광역학치료(Photodynamic Therapy)는 체내의 풍부한 산소와 외부에서 공급되는 레이저와 레이저 빛에 예민한 반응을 보이는 광감작제를 이용한 새로운 암치료 방법이다[3]. 광역학치료의 원리는 광감작제를 환자에 투여하고 일정시간이 지나면 암조직에만 선택적으로 광감작제가 축적이 되고 광감작제에 맞는 특정파장의 레이저를 조사하면 정상조직에는 아무런 반응 없이 암조직만을 특이적으로 제거할 수 있는 새로운 암치료 방법으로써 최근 들어 우수한 치료효과가 점차 인정되고 있다[13]. 광역학치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 광물

리현상으로 이해되고 있는데 바닥상태의 광감작제를 특정파장의 빛으로 활성화 시켜 단일항 상태나 삼중항 상태로 되고 여기서 바닥상태로 될 때 방출되는 에너지가 산소와 반응하여 활성 산소(O₂)를 생성시키거나(Type II 반응) 감작제가 전자 전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어(Type I 반응) 세포파괴가 일어난다[8,25,30].

광역학치료는 1980년대부터 본격적으로 연구되어 1990년대 들어 캐나다, 독일, 일본 등에서 임상시술이 승인된 이래 미국의 FDA가 1996년 1월에 식도암 치료 허가를, 1997년 9월에는 초기 폐암치료에 대해 승인을 한 바 있다[18]. 광역학치료는 수술 후 기능적, 미용적 결함을 최소화 할 수 있고 내시경을 통하여 레이저를 전달할 수 있어 폐암, 식도암, 대장암, 위장암, 방광암, 두경부암, 자궁암 등이 광역학치료의 좋은 대상이 된다[23].

*Corresponding author

Tel : +82-41-550-1786, Fax : +82-41-550-1788

E-mail : jcahn@dankook.ac.kr

현재 사용되고 있는 광감작제는 hematoporphyrin 유도체 (HpD)를 근간으로 하는 Photofrin[®]과 Photogem[®]이 광감작제로서 임상사용 허가가 나와 실제 임상에 쓰이고 있고 그 적용범위를 점차 확대하여 완전관해, 부분관해의 효과를 보고하고 있다[5]. HpD류의 광감작제는 주로 종양의 혈관손상을 야기하여 혈행을 정지시킴으로써 간접적으로 세포괴사를 일으킨다[12]. 그러나 HpD는 체내에서 배설되는 시간이 길어 광역학치료를 광감작제가 완전히 대사 될 때까지 빛을 보지 못하는 시간이 길어지는 단점을 가지고 있다.

최근에는 더 좋은 반응성을 가지고 체내에서 빠른 대사를 보이는 광감작제의 개발 필요성이 대두되어 chlorophyll 유도체(CpD)를 이용한 차세대 광감작제가 개발되어 이들의 물리화학적 특성과 작용기전에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있다[31]. 여러 종류의 CpD에서 CpD-a는 세포와 결합된 형태 또는 혼자서도 광반응을 일으키고 특히 세포와 결합된 상태에서는 다양한 파장의 빛에 대하여 형광 또는 활성산소(O₂)를 생성하여 광감작제로서 적합한 재료이다[20]. CpD-a를 기본으로 하는 pheophorbide-a (Ph-a)는 빠른 대사속도를 보였고 정상조직보다 종양에서 오랜 축적을 보였으며 항암효과를 확인하였고, Ph-a의 구조를 변형한 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a는 Photofrin[®]보다 빠른 대사속도와 우수한 세포독성을 보였다[10]. 그리고 bacteriochlorophyll을 근간으로 하는 bacteriochlorin 또한 광감작제로써 세포괴사를 유도한다고 하였다.

광역학치료를 같은 광감작제로도 치료기전은 세포주의 종류와 레이저조사 에너지 등의 치료환경에 따라서도 달라질 수 있는 가능성이 제시되었다[36]. LD₅₀ (50% lethal dose)의 레이저 조사량에서는 세포괴사가, LD₉₀의 레이저 조사량에서는 세포괴사를 통한 세포사멸이 주된 치료기전으로 보고되고 있다[35].

본 연구는 인체 두경부영역의 편평세포암종에서, 녹조류의 chlorophyll a로부터 추출하여 만든 새로운 광감작제 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a)와 660 nm 다이오드 레이저를 이용한 광역학치료의 항암효과 및 기작에 대해서 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

광감작제 및 레이저

광감작제는 금호 생명과학연구소에서 녹조류의 클로로필을 산화반응과 산처리를 통해 10-hydroxypheophytin a 유도체로 만든 다음 이를 유기용매를 이용하여 추출한 10-hydroxypheophytin과 10-hydroxypheophytin a 유도체의 유도체를 유기합성 후 안정된 구조 및 대량 수율이 가능한 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a)와 9-hydroxypheophorbide-a red (9-HpbD-a red)를 사용하였다(Fig. 1).

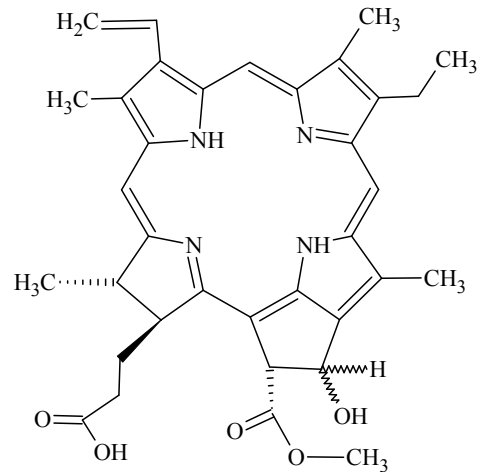


Fig. 1. Chemical structures of 9-Hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a). molecular formula; C₃₅H₃₈N₄O₅, molecular weight: 617.2764.

레이저는 새로운 광감작제가 최대 흡수 스펙트럼을 보이는 660 nm 다이오드 레이저(Golden Light, Korea)를 사용하였다.

세포 배양

인체 하인두암 환자들의 수술 중에 채취한 조직에서 수립된 SNU-1041 편평상피세포암종의 세포주를 RPMI-1640 (GibcoBRL, USA) 배양액 500 ml에 우태혈청(GibcoBRL, USA) 50 ml와 antibiotic -antimycotic solution (Gibco, BRL) 5.5 ml를 섞은 세포배양액으로 세포배양 플라스크(Nunc, Denmark)를 이용하여 5%의 탄산가스와 95%공기가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되는 배양기(Thermo Forma, USA)에서 배양하였으며 세포의 모양을 도립현미경(Olympus CK40, Japan)을 통하여 관찰하였다. 세포들은 플라스크 바닥에 부착하여 자랐으며 트립신(GibcoBRL, USA) 처리 후 계대배양 하였다.

실험동물 및 사육조건

6주령의 BALB/C/nu/nu 숫컷 누드마우스(Charles River, Japan)를 온도는 22-23°C, 40-60%로 유지되는 항온항습기(Jeung Do Industry Co, Korea)에서 멸균 소독된 물과 방사능으로 조사한 멸균된 사료로서 급수 급식하면서 사육하였다. Clean rack에 4 mice/cage씩 나누어 무균적으로 34 일에 한번씩 멸균된 깔집으로 교환하였으며 3-4 일에 한 번씩 Hibitan 용액으로 복도와 무균실내를 청소하였고 손은 70% 에탄올로 소독하고 소독된 일회용 장갑을 착용하여 세균에 감염되지 않도록 사육하였다.

세포 독성능 측정

형태학적 변이 관찰

96 well plate에 24 시간 동안 배양한 세포에 0.2 μm 주사기

필터(Gelman, USA)로 광감작제(75 µg/ml) 100 µl를 세포배양 배지로 희석하여 2 배수 희석을 통하여 광감작제의 농도를 줄여나갔다. 광감작제를 투여 후 레이저 조사까지의 시간과 레이저 조사시간을 다르게 하여 레이저조사를 시행하였다. 72 시간 동안 도립현미경으로 세포의 형태학적 변이를 관찰하면서 광감작제와 레이저조사에 의한 독성능을 평가하였다. 대조군으로 광감작제만을 세포배양 배지에 첨가하여 배양한 실험군, 광감작제를 투여하지 않고 plate에 레이저조사만을 시행하고 배양한 실험군, 그리고 광감작제가 녹여져있는 에탄올(Merck, Germany)만을 세포배양 배지에 첨가하여 배양한 실험군으로 하였다.

MTT assay

광감작제와 레이저조사가 세포에 미치는 독성능을 알아보기 위해 MTT assay 방법[32]을 이용하였다. 96 well plate에 24 시간 동안 배양한 세포에 광감작제(75 µg/ml) 100 µl를 2배수 희석을 통하여 광감작제의 농도를 줄여나갔으며 대조군으로 광감작제만을 세포배양 배지에 첨가하여 배양한 실험군, 광감작제를 투여하지 않고 plate에 레이저조사만을 시행하고 배양한 실험군 그리고 광감작제가 녹여져 있는 에탄올(Merck, Germany)만을 세포배양 배지에 첨가하여 배양한 실험군으로 하였다. 72시간을 배양한 후 각각의 well에 50 µl의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(2 µg/ml, Sigma)을 첨가하고 4 시간 배양 후 각 well의 배지를 모두 제거하고 150 µl의 dimethylsulfoxide (DMSO: KANTO, Japan)를 첨가한 후 microplate reader (BIO-RAD 550, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 다음의 식을 이용하여 측정하였으며 광감작제의 농도마다 4개의 well의 평균 흡광도값을 계산하여 결과로 사용하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Mean optical density in test well}}{\text{Mean optical density in control well}} \times 100$$

세포사멸 분석

피사세포와 고사세포 염색

광역학치료에 의한 세포사멸기전을 확인하기 위하여 Hoechst 33342 (Sigma, USA)와 Propidium iodide (PI: Sigma, USA) 염색법을 이용하였다[4]. 6 well plate에 24 시간 동안 배양한 세포에 광감작제(0.15 µg/ml 또는 0.29 µg/ml) 100 µl를 세포배양 배지로 희석하여 첨가하고 6 시간 후 660 nm diode laser (400 mW, 30 min)를 조사하였다. 레이저조사를 마

치고 바로, 3 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간, 24 시간 후 각각의 well에 Hoechst 33342용액(0.5 mg/ml, Sigma)과 PI용액(0.5 mg/ml, Sigma)으로 염색 후 형광현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 330~385 nm의 UV 영역에서 세포를 관찰하였다. 세포계수는 200배의 배율에서 5 곳의 영역을 관찰한 평균값을 결과로 사용하였다.

투과전자현미경

광감작제(0.15 µg/ml 또는 0.29 µg/ml)와 660 nm diode laser (400 mW, 30 min)를 이용하여 광역학치치 6 시간 후 cell scraper (Sarstedt, USA)를 이용하여 세포를 배양 flask에서 분리하여 2.5% glutaraldehyde solution (Yakuri, Japan) 1 ml를 첨가하여 4°C에서 12 시간 전고정 하였다. 후 고정을 1% OsO₄ 실시하였다. 그리고 2% agarose gel을 첨가하여 agarose block을 만들고 탈수과정과 침투, 포매, block trimming, semi-thin section, thin section, 전자염색을 통해 관찰하였다.

이종이식된 종양의 광역학치료

세포주의 이종이식

배양된 SNU-1041 세포주를 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 10⁸ cells/ml 만들었다. 그리고 30 gauge (G) 인슐린 주사기로 100 µl씩 누드마우스의 등에 피하로 주입 후 종양의 형성유무를 관찰하고 1주 간격으로 종양의 부피를 측정하였다.

종양의 광역학치료

누드마우스에 이종이식 된 종양의 크기가 약 400~600 mm³에 도달하였을 때, 제 1군(n=4)은 정상 대조군으로 종양에 아무런 처치도 하지 않았고 제 2군(n=4)은 9-HpbD-a으로만 치료한 군으로서 30 G 인슐린 주사기를 먼저 종양 중심부에 넣고 주위조직으로 여러번 반복시켜 광감작제가 고루 퍼질 수 있는 경로를 확보한 후 DPBS용액으로 희석한 9-HpbD-a (9.38 µg/ml)를 100 µl 씩 일정한 압력으로 서서히 종양내에 주입하였다(fanning technique). 제 3군(n=4)은 레이저 치료만을 시행한 군으로서 다이오드 레이저의 diffuser tip을 종양 중심부와 기저부에 삽입 후 각각 10 분씩 평균 0.96 J/mm³ (400 mW)의 에너지를 조사하였다. 제 4군(n=16)은 상기한 방법으로 9-HpbD-a를 종양 내 투여하고 6 시간 후 레이저 조사를 시행한 광역학치료군 이었다. 레이저 조사 시에는 온도센서를 이용하여 종양내의 온도변화를 기록하였다.

Table 1. Results of photodynamic therapy on xenografted nude mouse

		No remission	Recurrence	Complete remission
Group I	(Normal control)	4/4 (100%)		
Group II	(9-HppbD-a only)	4/4 (100%)		
Group III	(Laser irradiation only)	3/4 (75%)	1/4 (25%)	
Group IV	(9-HppbD-a + laser)	2/16 (12.5%)	4/16 (25%)	10/16 (62.5%)

중양부피의 측정

각 군에서 치료 후 1 주, 2 주, 3 주, 4 주의 시점에서 종양의 부피 (평균±표준편차)를 측정하여 항암효과를 판정하였다. 부피의 계산은 다음의 공식을 이용하였다.

$$V=(4/3 \times A \times B \times C) \times 1/2 \quad (V=\text{부피}, A=\text{장축}, B=\text{단축}, C=\text{높이})$$

항암효과의 판정

항암효과는 각 군에서 이식된 암종의 부피의 변화를 4 주까지 측정하여 완전 치료율과 종양부피의 변화를 비교하여 판정하였다.

통계처리

SAS 통계프로그램을 이용하여 9-HpbD-a의 농도변화 및 조사시기에 따른 항암효과의 차이를 two-way ANOVA test로 분석하였고 이중이식 한 종양에서 항암효과의 차이는 repeated measure ANOVA test와 student t-test로 95% 유의수준에서 검증하였다.

결 과

세포 독성능 측정

Pheophytin-a, 9-HpbD-a와 9-HpbD-a red의 세포 독성능

광감작제로 pheophytin-a, 9-HpbD-a, 9-HpbD-a red를 이용하여 세포 독성능을 비교하였다. 레이저 조사는 400 mW의 세기로 30분(3.2 J/cm²)으로 하였고 광감작제를 투여하고 바로 레이저 조사를 시행하였다. 3종류의 광감작제에서 공통적으로 0.59 µg/ml에서부터 세포 독성능을 나타내기 시작하였다. Pheophytin-a의 IC₅₀ (50% inhibition concentration)은 16.41 µg/ml로 광감작제가 희석된 에탄올을 사용한 대조군의 IC₅₀ 26.12 µg/ml과 같이 낮은 세포 독성능을 보였고 9-HpbD-a, 9-HpbD-a red에서는 광감작제의 농도가 증가할수록 세포생존율은 감소되었는데 9-HpbD-a의 IC₅₀은 1.46 µg/ml로 9-HpbD-a red의 IC₅₀ 3.51 µg/ml보다 세포 독성능이 가장 우수한 광감작제임을 확인하였다(Fig. 2).

레이저 조사량에 따른 세포 독성능

세포 독성능이 가장 우수한 9-HpbD-a를 이용하여 레이저 조사량에 따른 세포독성을 확인하였다. 레이저 조사는 400 mW의 세기로 0 분, 1 분(0.1 J/cm²), 5 분(0.5 J/cm²), 30 분(3.2 J/cm²)으로 하였고 광감작제를 투여하고 바로 레이저 조사를 시행하였다. 레이저를 조사하지 않고 9-HpbD-a만을 투여한 실험군의 IC₅₀은 24.43 µg/ml로 가장 높았으며 1 분(0.1 J/cm²)의 IC₅₀은 11.72 µg/ml, 5 분(0.5 J/cm²)의 IC₅₀은 4.87 µg/ml 그리고 30 분(3.2 J/cm²)의 IC₅₀은 1.46 µg/ml로, 조사된 에너지의 양이 증가할수록 세포생존율은 감소되었다. 9-HpbD-a의 농도가 4.69 µg/ml에서 세포생존율은 0 분에서 89%, 1 분(0.1 J/cm²)에서 81%, 5 분(0.5

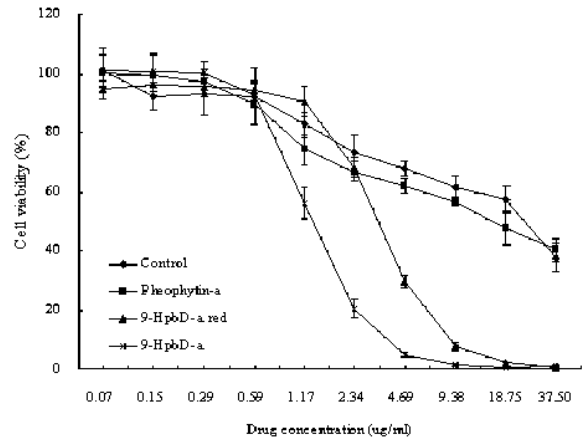


Fig. 2. Effects of various photosensitizers on cell viability. The control group were treated with ethanol containing same concentration of photosensitizers.

J/cm²), 30 분(3.2 J/cm²)에서 각각 52%, 5%로 나타났으며 9-HpbD-a의 농도가 37.5 µg/ml에서 0 분의 세포생존율은 10%로 감소하였고, 1 분(0.1 J/cm²), 5 분(0.5 J/cm²), 30 분(3.2 J/cm²)에서도 모두 세포생존율이 1%로 감소함을 보아 9-HpbD-a의 농도가 높아질수록 세포생존율도 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

9-HpbD-a 와 배양시간에 따른 세포 독성능

광감작제인 9-HpbD-a를 농도별로 96 well plate에 투여하고 레이저조사까지의 시간 간격을 0, 3, 6, 9, 12 시간으로 하여 세포생존율 확인한 결과 0시간에서의 IC₅₀은 1.43 µg/ml로 가장 높았으며 3 시간에서는 0.27 µg/ml, 그리고 6 시간, 9 시간, 12 시간에서는 각각 0.14 µg/ml, 0.12 µg/ml, 0.11 µg/ml로 6 시간까지 세포생존율이 통계적으로 의미 있게 감소하였다(p<0.05). 0 시간을 제외한 나머지에서 0.59 µg/ml 이상의 9-HpbD-a 농도에서 생존율이 모두 10% 미만으로

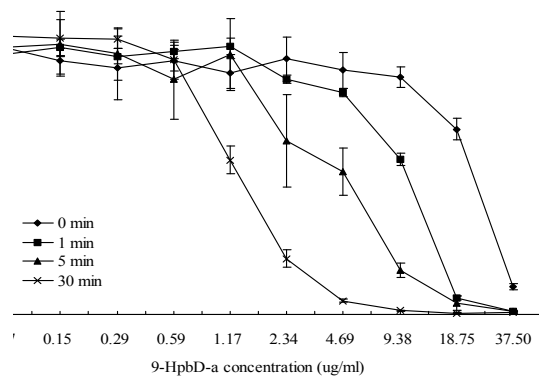


Fig. 3. Cell viability changes as a function of laser irradiation time. 10⁴ cells per well were treated with different amount of 9-HpbD-a. Immediately after various dose of laser irradiations were performed.

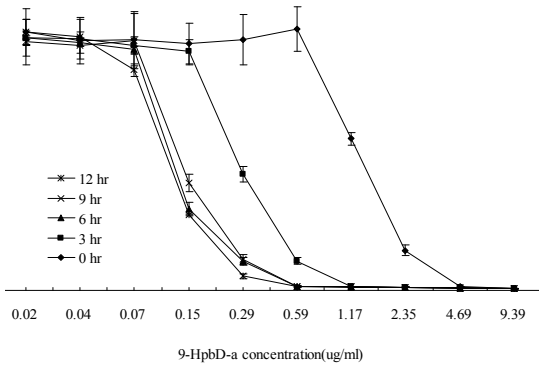


Fig. 4. Cell viability changes as a function of incubation time with 9-HpbD-a. 10^4 cells per well were incubated for various times in presence of different amount of 9-HpbD-a. Immediately after laser irradiations were performed (400 mW, 30 min).

감소되었다(Fig. 4).

9-HpbD-a의 세포 독성능

세포 독성능이 가장 우수한 9-HpbD-a와 660 nm diode laser를 이용하여 레이저조사량은 400 mW의 세기로 30 분(3.2 J/cm^2)으로 하였고, 9-HpbD-a를 농도별로 96 well plate에 투여하고 레이저조사까지의 시간 간격을 6 시간으로 하여 세포 생존율을 확인하였다. 대조군으로는 400 mW의 세기로 30 분(3.2 J/cm^2)간 레이저 조사만을 시행한 실험군, 다양한 농도의 9-HpbD-a만을 투여한 실험군 그리고 세포에 아무런 처치도 하지 않은 실험군으로 하여 세포생존율을 확인한 결과 9-HpbD-a의 농도가 0.29 $\mu\text{g/ml}$ 에서 9-HpbD-a를 투여하고 레이저조사를 시행한 실험군의 세포생존율은 13%, 레이저조사만 시행한 실험군, 9-HpbD-a만을 투여한 실험군 모두 87%로 광역학치료를 시행한 실험군에서 우수한 세포독성을 확인하였고 9-HpbD-a의 농도가 높아질수록 광역학치료를 시행한 실험군에서는 급속한 세포 생존율의 감소를 확인할 수 있었다. 반면에 대조군인 레이저조사만 시행한 실험군, 9-HpbD-a만 투여한 실험군에서는 세포생존율의 감소가 적었음을 확인하였다(Fig. 5).

세포사멸 분석

피사세포와 고사세포 염색

광역학치료 시 사멸기전을 확인하기 위하여 세포고사와 세포피사를 구별할 수 있는 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)염색을 시행하였다. 9-HpbD-a 농도 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포고사는 $30.1 \pm 2.6\%$, 세포피사는 $1 \pm 1.5\%$ 로 세포고사가 주된 세포사멸기전임을 확인하였다. 9-HpbD-a 농도 0.29 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포고사는 $4.1 \pm 3.2\%$, 세포피사는 $37.4 \pm 8.5\%$ 로 9-HpbD-a 농도가 높아질수록 세포피사가 증가됨을 확인하였고 0.29 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서도 세포피사가 증가됨을 확인하였다(Fig.

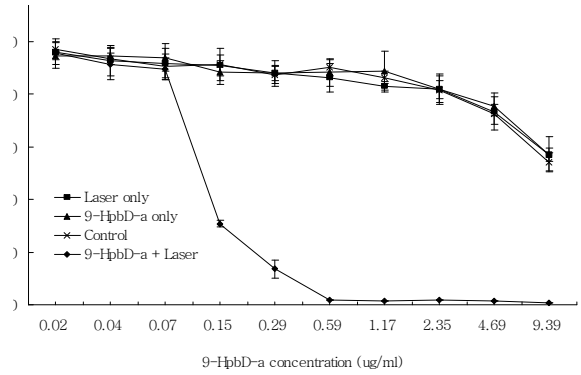


Fig. 5. Effect of various concentrations of 9-HpbD-a on cell viability upon irradiation. 10^4 cells per well were incubated for 6 hours in presence of different amount of 9-HpbD-a. Immediately after laser irradiations were performed (400 mW, 30 min). Control group were treated with ethanol containing same concentration of 9-HpbD-a.

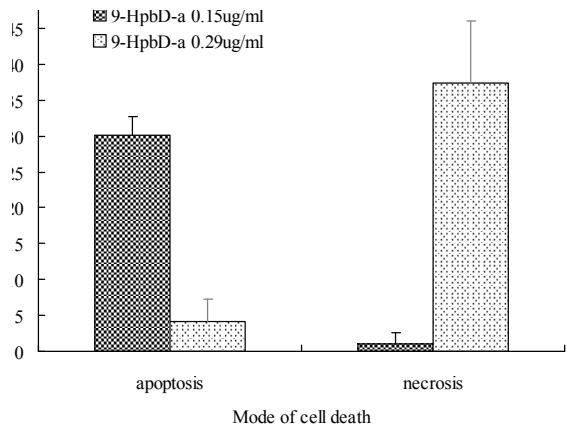


Fig. 6. The pattern of cell death after photodynamic therapy with 9-HpbD-a by Hoechst 33342 and propidium iodide dual stain.

6). 세포고사의 형태학적 관찰결과 세포가 배양 플라스크에서 떨어졌으며 세포의 핵은 형광현미경(UV filter 330 nm~385 nm) 하에서 파란색으로 염색되었고 chromatin의 농축과 fragmentation이 일어났으며 핵의 크기도 정상세포의 핵에 비해 작아졌음을 확인하였다. 피사세포의 경우 배양 플라스크에서 떨어진 세포 외에 붙어있는 세포에도 형광현미경(UV filter 330~385 nm) 하에서 빨간색의 동그란 핵을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

투과전자현미경

투과전자현미경 하에서 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 의 9-HpbD-a 농도에서 고사세포가 관찰되었으며 chromatin의 농축을 확인하였으며 세포의 전체적인 크기도 감소함을 관찰하였다. 핵의 크기도 정상세포의 핵에 비해 작아졌음을 확인하였다. 0.29 $\mu\text{g/ml}$ 의 9-HpbD-a 농도에서 세포막이 손상된 피사세포가

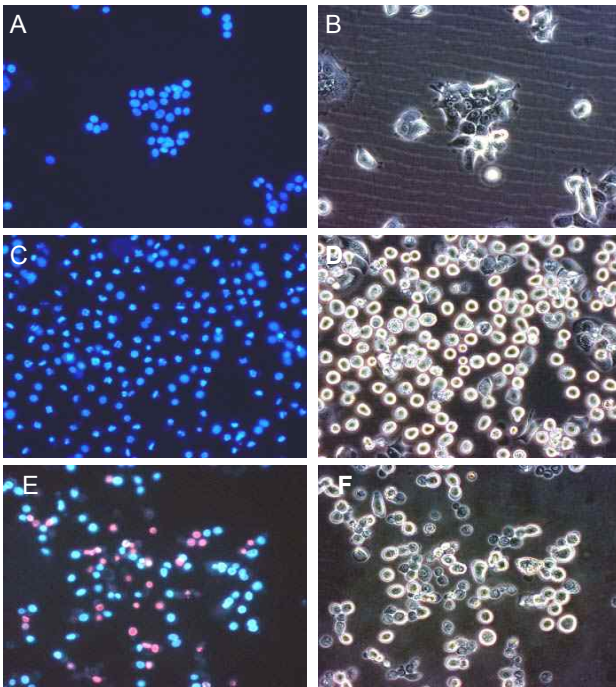


Fig. 7. Effects of photodynamic therapy. Left panels show distinct living, necrotic, apoptotic SNU1041 cells by fluorescence microscopy (Original magnification: X200). Cells were incubated for 6h after laser irradiation in the absence of 9-HpbD-a (A and B), in the presence of 0.15 µg/ml 9-HpbD-a (C and D) or in the presence of 0.29 µg/ml 9-HpbD-a (E and F). Right panels show SNU1041 cells by light microscopy (Original magnification: X200).

관찰되었다(Fig. 8).

이종이식된 종양의 광역학치료

세포주의 이종이식

Nude mouse의 등에 피하로 30 G 인슐린 주사기를 이용하여 10^7 cells/100 µl의 두경부 평면상피암세포주를 주입하고 종양의 형성유무를 관찰하고 1주 간격으로 종양의 부피를 측정된 결과 1주 후 34.3 ± 24.2 mm³로 28 마리 nude mouse 모두 종양이 형성됨을 확인하였다. 종양의 크기는 2주 후 82.9 ± 40.1 mm³, 3주 후 171.1 ± 67.9 mm³ 그리고 4주 후 352.9

± 126.8 mm³로 시간이 지남에 따라 종양부피의 증가를 확인하였다(Fig. 9).

종양의 광역학치료

제1군: 정상대조군: 광역학치료전 종양의 크기가 335.0 ± 141.4 mm³에서 광역학치료1주 후 402.3 ± 190.4 mm³, 2주 후 439.7 ± 99.8 mm³, 3주 후 733.7 ± 199.9 mm³, 4주 후 792.0 ± 244.2 mm³로 종양의 크기가 4 마리 모두 지속적으로 증가하였다(Fig. 10). 또한 2주 후부터 종양의 중심부위에 조직의 괴사가 일어나기 시작하였고 종양의 바깥부위는 지속적인 종양의 성장을 관찰할 수 있었다.

제2군: 9-HpbD-a만 종양에 투여군: 9-HpbD-a만 종양에 투여한 2군에서는 9-HpbD-a투여 시 종양의 크기가 364.8 ± 75.8 mm³에서 광역학치료1주 후 393.7 ± 154.7 mm³, 2주 후 519.8 ± 298.1 mm³, 3주 후 651.3 ± 211.9 mm³, 4주 후 830.5 ± 201.0 mm³로 종양의 크기가 4 마리 모두 제1군인 정상대조군과 같이 지속적으로 증가하였다(Fig. 11). 정상대조군과 같은 양상으로 2주 후부터 종양의 중심부위에 조직의 괴사가 일어나기 시작하였고 종양의 바깥부위는 지속적인 종양의 성장을 관찰할 수 있었다.

제3군: 레이저만 종양에 조사한군: 660 nm diode laser만을 종양에 조사한 실험군에서는 총 4 마리의 nude mouse중 3 마리의 nude mouse는 치료가 되지 않았고 1 마리의 nude mouse는 재발되었다. 치료가 되지 않은 종양의 크기는 치료 전 종양의 크기가 428.0 ± 48.5 mm³에서 치료1주 후 888.9 ± 372.5 mm³, 2주 후 1051.7 ± 213.9 mm³, 3주 후 1260.2 ± 479.5 mm³, 4주 후 1142.7 ± 389.0 mm³로 종양의 크기가 4주까지 지속적으로 증가하였고 4주 이후 종양의 크기가 감소하였다. 재발된 종양조직은 치료 전 종양의 크기가 428.0 mm³에서 치료1주 후 140 mm³, 2주 후 27 mm³, 3주 후 0 mm³로 종양이 완치되는 것 같았으나 4주 후 12 mm³로 새로운 종양의 형성을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

제4군: 광역학치료군: 9-HpbD-a와 660 nm diode laser를 이용하여 광역학치료를 시행한 실험군에서 2 마리의 nude mouse에서 치료가 되지 않았고 종양의 크기는 광역학치료전 429.0 ± 85.5 mm³에서 광역학치료1주 후 721.2 ± 454.6 mm³, 2주

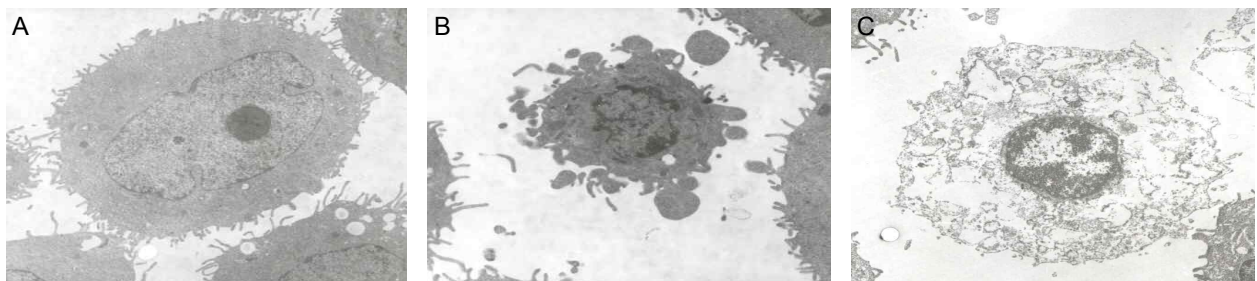


Fig. 8. Electron micrographs of SNU1041 cells 6h after laser irradiation. (A) shows a normal untreated cell (×8,000). (B) shows a cell with apoptotic nuclei (×9,000). (C) shows a necrotic cell, with shrinkage and cytoplasmic membrane disruption (×8,000)

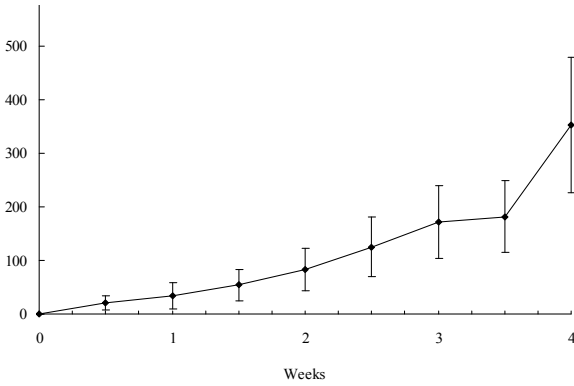


Fig. 9. Growth curve of xenografted tumor in nude mouse.

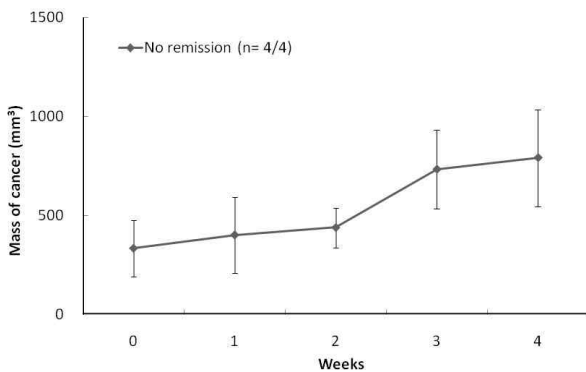


Fig. 10. Tumor volume change of xenografted SNU-1041 cells in normal control group. Group I (no 9-HpbD-a and no laser irradiation) was a control group which showed a continuous tumor growth.

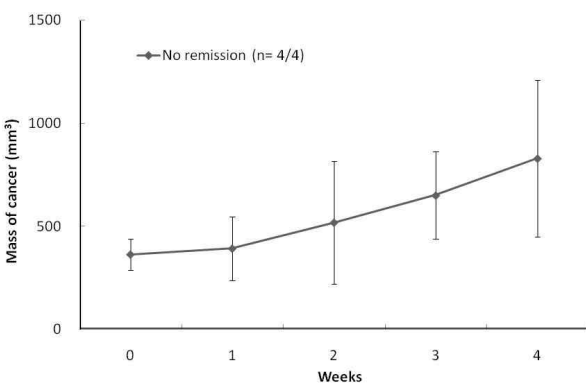


Fig. 11. Tumor volume change of xenografted SNU-1041 cells in 9-HpbD-a injection only group. Group II showed no response.

후 812.1±411.4 mm³, 3주 후 907.1±353.6 mm³, 4주 후 629.5±262.1 mm³로 종양의 크기가 4주까지 지속적으로 증가하였고, 4주 이후 종양의 크기가 감소하였다(Fig. 15). 그리고 4 마리의 nude mouse 종양에서 재발을 확인하였는데 종양의 크기가 광역학치료전 428.4±37.4 mm³에서 광역학치료1주 후 157.3±104.4 mm³, 2주 후 114.7±86.5 mm³, 3주 후 0 mm³로 종양이

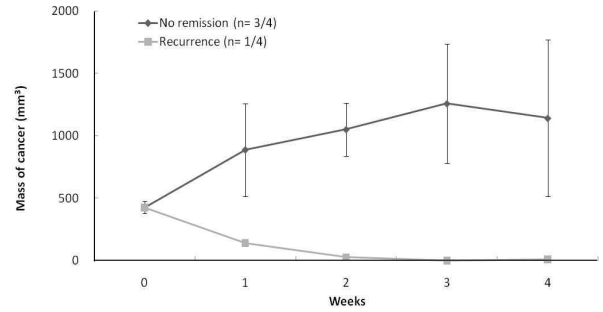


Fig. 12. Tumor volume change of xenografted SNU-1041 cells in laser irradiation only group. Group III showed 1 recurrence out of 4.

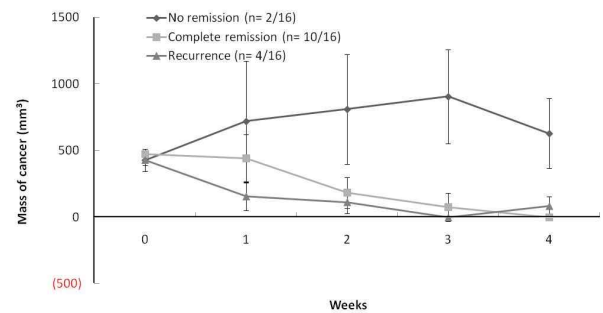


Fig. 13. Tumor volume change of xenografted SNU-1041 cells in PDT group. Group IV showed 10 complete remission, 4 recurrence and 2 no remission out of 16. Group IV showed significant remission rate, comparing to other groups.

완치되었으나 4주 후 84.4±70.2 mm³로 새로운 종양의 형성을 확인할 수 있었다(Fig. 16). 광역학치료 후 10 마리의 nude mouse가 완치되었으며 종양의 크기는 광역학치료전 475.7±38.2 mm³에서 광역학치료1주 후 442.4±180.2 mm³, 2주 후 185.6±116.3 mm³, 3주 후 76.8±107.6 mm³, 4주 후 0 mm³로 종양의 크기가 점차 줄어들었다(Fig. 14). 종양의 치료 중 특별한 독성반응은 보이지 않았고 치료 중에 온도센서를 이용하여 측정된 종양내의 온도는 평균 42°C이었다(Fig. 13).

고 찰

광역학치료를 수행하기 위해서는 특정파장의 빛에 활성을 나타내는 광감작제와 광감작제를 충분히 활성화시킬 수 있는 빛이 필요한데 이러한 광원으로 레이저가 주로 광역학치료에 이용된다. 광역학치료용 레이저는 다른 광원에 비해 광감작제를 활성화시킬 수 있는 충분한 에너지를 가지고 있으며 단일 파장의 빛을 방출할 수 있어 광감작제의 활성을 최대로 유도할 수 있는 장점을 가지고 있다. 현재 광역학치료용 레이저는 continuous wavelength (CW) 형식의 diode laser가 보편적으로 사용되고 있다. 본 연구에 사용된 diode laser는 광감작제의 최대흡수 스펙트럼인 660 nm의 레이저로서 새로 개발된 광감

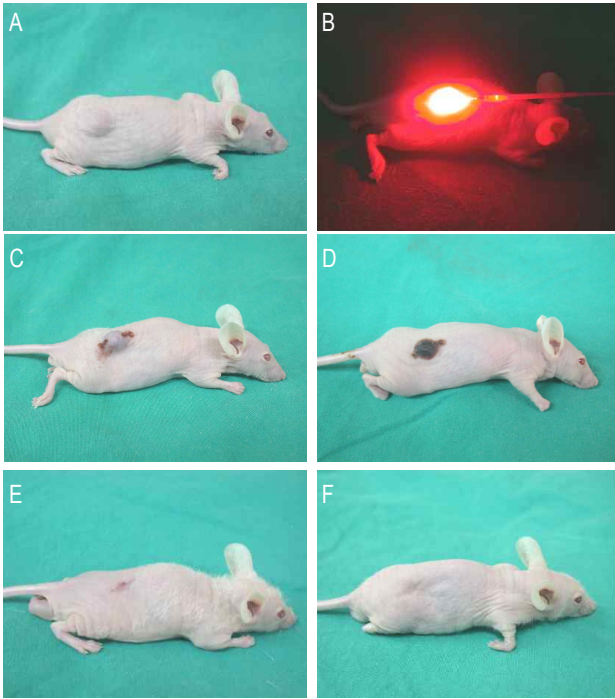


Fig. 14. complete tumor remission after PDT. Tumor appearance before (A) PDT. Laser irradiating (B). Immediately after laser irradiation (C). 1 week (D), 2 weeks (E) after PDT. Follow-up at 4 weeks shows complete tumor remission (F).

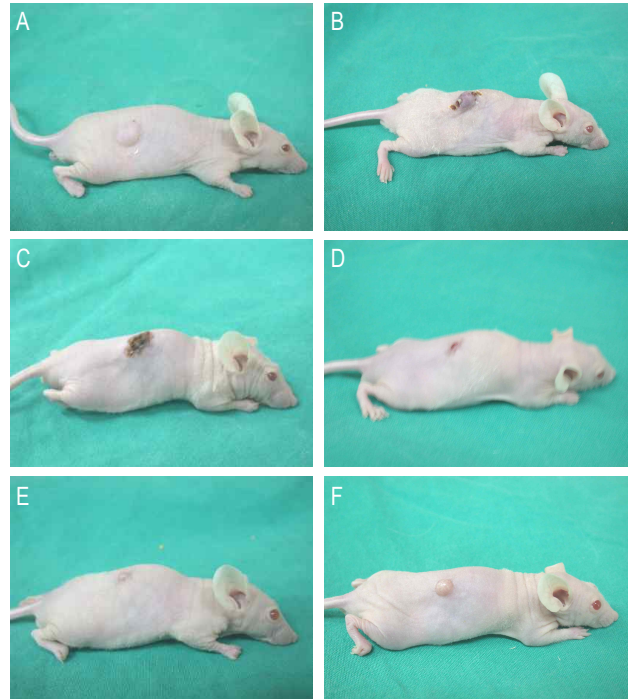


Fig. 16. Tumor recurrence after PDT. Tumor appearance before (A) PDT. Immediately after laser irradiation (B). 1 week (C), 2 weeks (D) and 3 weeks (E) after PDT. Follow-up at 4 weeks shows recurrence (F).

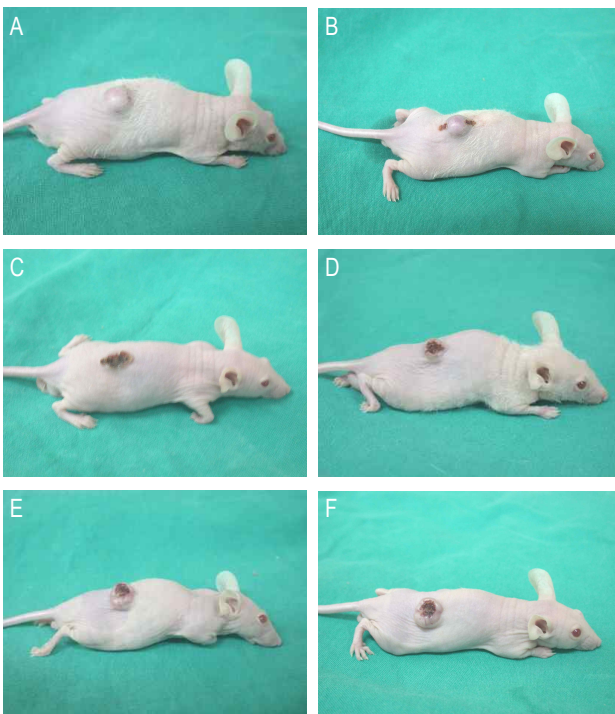


Fig. 15. No tumor remission after PDT. Tumor appearance before (A) PDT. Immediately after laser irradiation (B). 1 week (C), 2 weeks (D) and 3 weeks (E) after PDT. Follow-up at 4 weeks shows no tumor remission (F).

작제에 적합한 레이저라 할 수 있다. 광역학치료에 사용한 레이저의 방사방식에 따라서도 세포독성효과의 차이가 있을 수 있는데 필요한 광선의 양을 짧은 기간 동안 최대 동력으로 방사하여 인접한 정상세포에 특별한 손상 없이 종양세포에 집중적으로 조사하는 펄스 방식이 더 효과적이라고 하였다 [27]. 펄스 방식의 레이저는 일반적으로 CW방식의 레이저 보다 조직 내 침투효과가 더 깊고 레이저 발생시 나타나는 열도 낮은 것으로 알려져 있어 광역학치료의 효과를 높이는데 적합한 레이저라고 생각되나 660 nm의 펄스형 레이저 아직까지는 개발이 안되어 CW방식의 레이저를 사용하였다.

본 연구에서 사용된 광감작제는 녹조류인 *Spirulina platensis*의 chlorophyll a로부터 금속이온을 제거한 피오파이틴 a 와 이의 피톨기를 가수분해 시킨 피오바이드 a로부터 개발한 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a)는 기존의 hematophorphyrin derivative (HpD) 광감작제가 갖는 단점을 보완할 수 있는 광감작제로 체내에서 배설되는데 시간이 오래 걸리는 단점을 줄여 체내의 누적을 방지할 수 있는 장점이 있다. 또한 광감작제의 최대 흡수파장이 높아지면 이러한 광감작제에 맞는 레이저를 선택하여야 하는데 가시광선 영역에서 높은 파장의 레이저일수록 조직에 침투되는 깊이가 깊어져 광역학치료의 효과를 높일 수 있다. 기존의 HpD 광감작제가 630 nm 영역의 최대 활성을 보이는 반면 9-HpbD-a의 최대 흡수 파장은 660 nm로 기존의 광감작제보다 높은 파장의 레이저를 사용

할 수 있는 장점을 갖고 있다.

본 연구에서 세포 독성능이 가장 우수한 9-HpbD-a를 이용한 세포 독성능은 전처리된 광감작제의 농도가 높을수록 세포 생존율의 지수적 감소현상을 확인 하였는데 광역학치료의 효과는 단순히 광감작제의 총 세포 내 농도보다는 얼마나 효과적으로 세포내 작용부위에 위치하는가 하는 세포 내 분포가 더 중요하다고 하였다[16]. 광감작제의 세포내 분포는 감작제의 물리화학적 성질에 따라 차이를 나타내는데 흔히 사용되는 HpD류의 Photofrin, Photogem과 같은 친지질성 감작제나 5-ALA-induced protoporphyrin IX 등은 주로 사립체, 소포체막, 핵막 그리고 세포핵 주변에 축적된다[2,37] 반면에 AIPcS₄, TPPS 등의 친수성 감작제는 세포막을 투과하는 성향이 적기 때문에 주로 간질내나 종양의 혈관기질에 축적된다[19]. 광감작제의 약동학적 연구에 의하면 친지질성 감작제는 혈중 HDL, LDL 등의 지단백과 친수성 감작제는 주로 알부민과 결합하며 종양세포로 이동된 감작제는 선택적으로 흡수되어 정상조직과는 분포의 차이를 나타낸다[1]. 산성 pH의 종양조직은 친지질성 감작제에 친화력이 강한 기질로 구성되어 있고 종양세포는 LDL 수용체가 많이 분포되어 있는 특징적인 구조로 되어있어서 감작제의 흡수정도가 정상조직과는 차이가 있다[17]. 친지질성 감작제가 지질막을 통과하여 세포내 소기관과 결합하기 쉬워 광감작효과가 좋다고 하였다[14]. 본 연구에 사용된 광감작제는 친수성 광감작제로 체내에서 대사되는 시간이 친지질성 광감작제보다 빠르다는 장점을 가지고 있고 기존의 광감작제와 동등한 세포 독성능을 확인하여 세포 내 독성효과를 나타내는 다른 기전이 존재함을 시사한다.

세포독성효과는 조사한 에너지량에 비례하여 증가되었는데 이는 세포내로 흡수된 감작제를 반응시킬 수 있는 광물리 현상이 증가하기 때문인 것으로 생각된다. 9-HpbD-a 투여 후 레이저를 조사하기까지 9-HpbD-a와 배양시간에 따른 세포생존율은 6 시간 이후부터 12 시간까지 비슷한 세포 독성능을 확인하였고, 시간간격을 두지 않은 실험군과는 확연한 차이를 보였다. 이는 세포 내 광감작제의 침투시간이 6 시간 이후부터 충분한 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이는 광역학치료 시 중요한 요소 중의 하나로 광감작제와 세포의 충분한 반응시간을 갖게 하는 더 높은 치료효과를 가져올 것이라고 사료된다.

최근의 연구에서 광역학치료 시 레이저조사세기와 세포의 종류에 따라 세포의 반응이 세포고사와 세포괴사로 세포괴괴 기전의 비율이 다른데[2] 돌연변이형 p53유전자를 가진 human bladder carcinoma의 경우 LD₅₀ (50% lethal dose)의 광량에서는 세포고사가, LD₉₀의 광량에서는 세포괴사를 통한 세포괴괴가 더 활성을 갖는 것으로 보고 되고 있다[35]. 본 연구에서도 이와 같은 현상을 관찰할 수 있었는데 낮은 광감작제 농도에서는 세포고사가 주된 사멸기전으로 확인되었고, 높은 감작제 농도에서는 세포괴사가 주된 세포사멸 기전임을

확인하였는데 광역학치료 후 일어나는 괴사의 진행과정은 직접적인 세포막 손상에 의하여 세포 내 ATP 저장고 고갈되면서 세포 복제나 복구과정이 장애를 입거나[11] 세포 내로 아미노산 이동이 저하되고[28] 세포 내 pH의 감소가 일어난다[15]. 또한 리소솜막이 손상되면서 여러 단백질 분해효소들이 해리되고 이로인한 종양세포의 파괴와 괴사반응이 진행 하는 것으로 알려져 있다[24]. 이밖에 세포막의 손상은 아라키돈산 대사과정의 장애와 혈관손상이 가능하고[7] 동반된 보체계 (complement system)의 자극, 히스타민과 다른 염증매개물질의 배출은 괴사과정을 가속화한다[21]. 직접적인 세포손상은 세포막의 이온 전달을 매개하는 여러 단백질에도 손상을 입혀 전해질 균형에도 장애를 유발하는데[33] 세포 내 칼슘이 증가하면 endonuclease의 활성화로 DNA가 분해되는 칼슘의존형 세포고사를 유발한다[22,26]. 이러한 세포고사는 광역학치료 후 모든 경우에서 발견되는 것은 아니고 사용한 광감작제의 종류와 대상 세포주에 따라서 차이를 보인다[35]. 또한 세포가 세포고사와 세포괴사로 가는 중요한 열쇠는 adenosine triphosphate의 역할이라 하였고 해당과정과 산화적 인산화의 저해제로 인한 에너지생산의 저해가 광역학치료 후 세포괴사를 유도한다고 하였다.

누드마우스에 이종이식된 종양의 광역학치료는 치료효과를 높이고 종양 내 광감작제 치료농도를 유지하기 위하여 광감작제를 직접 종양 내에 주입하였고, 종양중심부의 응고 및 탄화를 막아 레이저의 종양 내 투과성을 향상시키기 위하여 diffuser tip을 종양내에 직접 삽입하여 치료하는 간질성 레이저치료(interstitial laser therapy)를 시행하였다. 치료된 종양이 완치되는 경우 치료 2주 후부터 종양의 크기가 줄어들기 시작하고 종양 변연부(marginal area)의 종양성장도 관찰할 수 없었다. 그러나 종양의 재발 또는 치유가 되지 않은 종양에서는 공통적으로 종양 변연부에서 성장하는 것으로 보아 광역학치료시 종양 변연부 치료도 중요시 고려해야할 사항이라고 사료된다.

앞으로 9-HpbD-a가 광역학치료에서 효과적인 광감작제로 사용되기 위해서는 9-HpbD-a가 정상세포뿐만 아니라 종양세포와의 작용기전에 대한 이해가 필요하고 광감작제가 정상조직에는 빠른 대사를 통하여 빠져나가고 종양조직에만 많은 양의 광감작제가 선택적으로 축적되어 광역학치료의 효과를 높여야 할 것이고 새로운 광감작제와 함께 인체 조직의 침투력이 좋은 우수한 레이저의 개발도 함께 이루어져야 한다. 이러한 연구를 토대로 더 나은 광역학치료의 치료기전에 대한 이해와 효과적인 임상적 이용이 가능할 것으로 기대된다.

요 약

녹조류인 *Spirulina platensis*에서 추출하여 만든 새로운 광감작제와 660 nm의 다이오드 레이저를 이용한 광역학치료의

항암효과와 치료기전을 알아보았다. 세포 독성능은 MTT assay를 이용하였고, 세포사멸기전은 propidium iodide과 Hoechst 33342 염색법과 투과전자현미경으로 확인하였다. 또한 암세포가 이종 이식된 누드마우스 모델에서 광역학치료를 시행하여 항암효과를 확인하였다. 3종류의 클로로필 유도체 중 9-hydroxyphorbide-a (9-HpbD-a)의 세포 독성능이 가장 우수하였고, 9-HpbD-a의 적정 레이저조사 시간은 30분(3.2 J/cm²), 광감작제를 투여하고 레이저조사시간까지의 배양시간은 최소 6시간 이상임을 확인하였다. 광역학치료를 세포사멸기전은 낮은 9-HpbD-a 농도에서 세포고사가 주된 세포사멸기전이었고, 높은 농도의 9-HpbD-a에서는 세포괴사에 의한 세포사멸이 주된 기전임을 확인하였다. 투과전자현미경 하에서도 같은 양상을 관찰하였다. 그리고 암세포가 이종 이식된 누드마우스 모델에서의 광역학치료를 제1군 정상대조군과 제2군 9-HpbD-a만을 투여한 중앙조직모두 지속적인 중앙의 성장(100%)을 보였고, 제3군인 레이저만을 중앙조직에 조사한 실험군에서는 3 마리는 치료가 되지 않았고(75.0%), 1 마리는 재발(25.0%)하였다. 제4군 광역학치료군에서 총16 마리의 중앙에서 10 마리는 완치(62.5%), 4 마리는 재발(25.0%), 2 마리는 치유되지 않았음(12.5%)을 확인하였다. 9-HpbD-a와 660 nm 다이오드 레이저를 이용한 광역학치료를는 유의한 항암효과를 나타내었고 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료를는 새로운 치료방법으로서 향후 암치료의 유용한 치료방법으로 기대된다.

References

- Berg, K., J. C. Bommer, and J. Moan. 1989. Evaluation of sulphonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* **44**, 7-15.
- Berg, K. and J. Moan. 1997. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* **65**, 403-409.
- Carl, D. 2000. Update on photodynamic therapy. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **11**, 166-170.
- Crissman, M. J. 1995. *Cell cycle analysis by flow cytometry. Cell Growth and apoptosis*, 2nd edition. Studzinski, G. P.(ed.). 21-43. IRL press: Oxford.
- Dahle, J., H. B. Steenand, and J. Moan. 1999. The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *photochemistry and photobiology*: **70**, 363-367.
- Dougherty, T., J. Kaufman, A. Goldfarb, K. Weishaupt and D. Boyle. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38**, 143-151.
- Fingar, V. H., T. J. Wieman, and K. W. Doak. 1990. The role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy induced tumor destruction. *Cancer Res.* **50**, 2599-2603.
- Foot, C. S. 1987. Type I and Type II mechanisms of photodynamic action, In Heitz, J. R. and K. R Downum (eds.), *Light-Activates Pesticides*, American Chemical Society, Washington DC. 22-38.
- Fujishima, I., T. Sakai, T. Tanaka, H. Ryu, K. Uemura, Y. Fujishima, K. Horiuchi, N. Daikuzono, Y. Sekiguchi. 1991. Photodynamic therapy using pheophorbide a and Nd:YAG laser. *Neurol. Med. Chir.* **31**, 257-263.
- Furukawa, K., H. Yamamoto, D. H. Crean, H. Kato, T. S. Man. 1996. Localization and treatment of transformed tissues using the photodynamic sensitizer 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a. *Lasers Surg. Med.* **18**, 157-166.
- Gibson, S. L., T. L. Checkler, and T. G. Bryant. 1989. Effects of laser photodynamic therapy on tumor phosphate levels and pH assessed by p-NMR spectroscopy. *Cancer Biochem Biophys.* **10**, 319-328.
- Gomer, C. J., A. Rucker, and A. Ferrario. 1989. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat. Res.* **120**, 1-8.
- Hampton, J. A., and S. H. Selman. 1992. Mechanism of cell killing in photodynamic therapy using a novel *in vivo* drug/*in vitro* light culture system. *Photochem. Photobiol.* **56**, 235-243.
- Henderson, B. W., and G. Farrell. 1989. Possible implications of vascular damage for tumor cell inactivation *in vivo* vomparison of different photosensitizers. *SPIE Conf. Proc.* **1065**, 2-10.
- Hetzell, F. W. and M. Chopp. 1989. Modifications in intratumor microenvironment with PDT. *SPIE Conf. Proc.* **1065**, 41-7.
- Jin, H., M. F. Horng, T. Deahl, N. L. Oleinick, and H. H. Evans. 1998. Variation in photodynamic efficacy during the cellular uptake of two phthalocyanine photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **67**, 720-728.
- Jori, G., E. R. Beltrami, B. Salvato, L. Z. Pagnan, and T. Sanov. 1984. Evidence for a major role of plasma lipoproteins a hematoporphyrin carriers *in vivo*. *Cancer Lett.* **24**, 291-297.
- Kato, H. 1996. History of photodynamic therapy-past, present and future. *Gan To Kagaku Ryoho* **23**, 8-15.
- Kessel, D., P. Thompson, K. Saito, and K. D. Nanturri. 1987. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem. Photobiol.* **45**, 787-790.
- Lee, W. Y., J. H. Park, B. S. Kim, M. J. Han, B. S. Hahn. 1990. Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells *in vitro*. *Yonsei Med J.* **31**, 225-233.
- Lim, H. W. 1989. Role mediators of inflammation and cells in porphyrin induced phototoxicity. *SPIE Conf. Proc.* **1065**, 28-33.
- McCabe, M., P. Nicotera, and S. Orrenius. 1992. Calcium dependent cell death: role of the endonuclease, protein kinase C and chromatin formation. *Ann. NY Acad. Sci.* **663**, 269-278.
- McCaughan, L. 1990. Lasers in photodynamic therapy. *Nurs. Clin. North Am.* **25**, 725-738.

24. Milanesi, C., C. Zhou, R. Biolo, and G. Jori. 1990. Zn(II)-phthalocyanine as photodynamic agent for tumors. Studies on the mechanism of photosensitized tumor necrosis. *Br. J. Cancer*. **61**, 846-850.
25. Moan, J., and K. Berg. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53**, 549-553.
26. Moor, A. 2000. Signaling pathway in cell death and survival after photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **57**, 1-13.
27. Muller, S., H. Walt, U. Hallr, and D. Fiedler. 1998. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. *Photochem. Photobiol.* **42**, 67-70.
28. Newsholme, E. A., and A. R. Leech. 1984. *Biochemistry for the medical sciences*. Wiley. New York.
29. Noodl, B., T. Berg, O. Sttoke, J. Peng, and J. Nesland. 1996. Apoptosis and necrosis induced with light and 5-ALA derived protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer*. **74**, 22-29.
30. Ochsner, M. 1997. New trends in photobiology (Invited review) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* **39**, 1-18.
31. Rosenthal, I. 1991. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* **53**, 859-870.
32. Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827-4833.
33. Specht, K. G., and M. A. Rodgers. 1990. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* **51**, 319-324.
34. Tomio, L., G. Redi, P. L. Jori, and G. B. Zorat. 1980. Hematoporphyrin as a sensitizer in tumor phototherapy: effect of medium polarity on the photosensitizing efficiency and role of the administration pathway on the distribution in normal and tumor bearing rats, In Pratesi, R. and C. A. Sacchi (eds.), *Lasers in photomedicine and photobiology*, Springer-Verlag, Berlin. 76-82.
35. Wyld, L., M. W. R. Reed, and N. J. Brown. 2001. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Bri. J. Cancer*. **84**, 1384-1386.
36. Xiao-Yan, H., A. S. Robert, S. Thomsen, W. K. Leland, and S. L. Jacques. 1994. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.* **59**, 468-473.
37. Zhou, C. 1989. Mechanism of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **3**, 299-318.