

Fotosenzibilizatorji kot učinkovine v fotodinamični terapiji

doc.dr. Janez Mravljak, mag.farm.



Priporočena literatura

- *Pregledni članek*: B. Japelj, S. Pečar: **Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja**; *farm vestn* **2006**; 57, 131-139.
- *Poglavje v knjigi*: Socoteanu R. et al. **Trends in Interdisciplinary Studies Revealing Porphyrinic Compounds Multivalency Towards Biomedical Application**, Biomedical Engineering - From Theory to Applications, Reza Fazel-Rezai (Ed.), ISBN: 978-953-307-637-9, InTech, **2011**, Dostopno: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-from-theory-to-applications/trends-in-interdisciplinary-studies-revealing-porphyrinic-compounds-multivalency-towards-biomedical->

Demonstracijski poskus - kemiluminiscenca

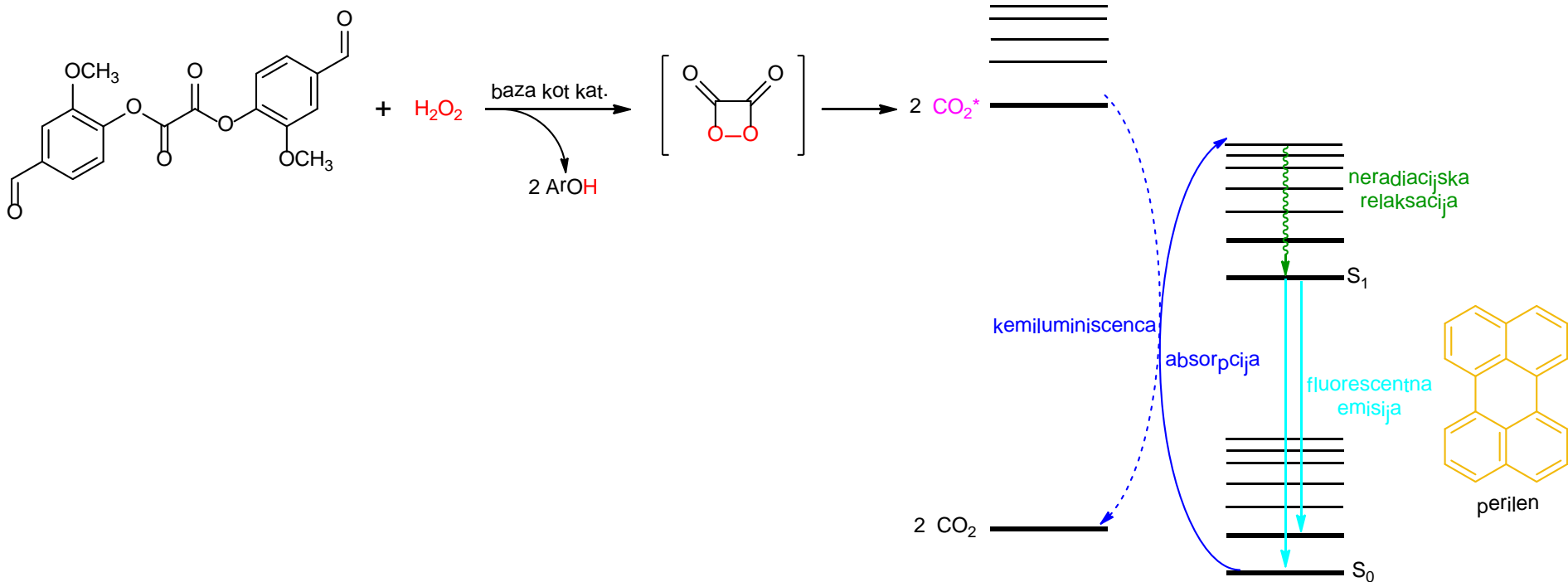
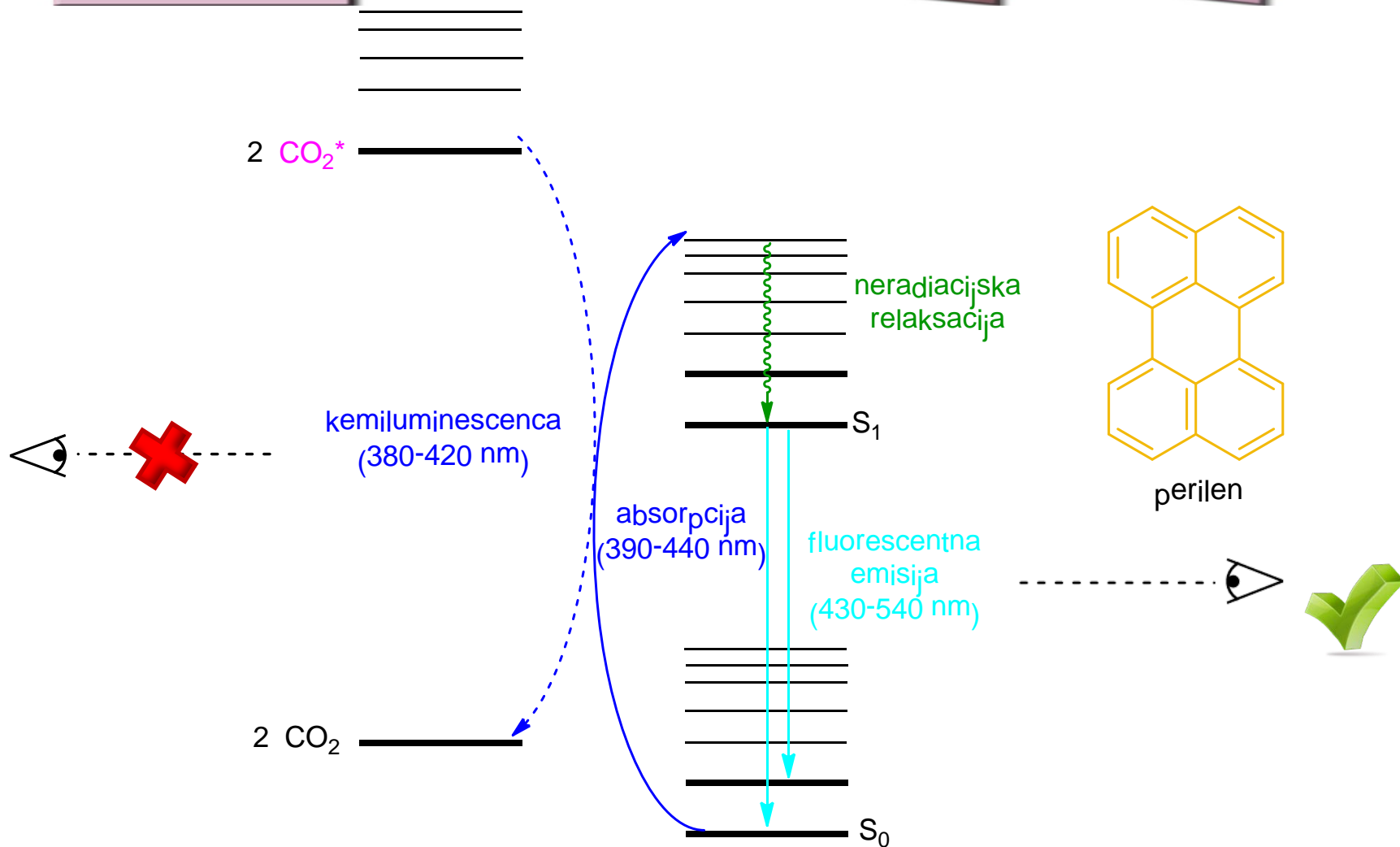



Diagram Jablonskega



Fotodinamična terapija - definicija

- 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.

- **fototerapija** - uporaba ultravijolične (UV), vidne in bližnje infrardeče svetlobe (IR) za zdravljenje bolezni, *npr.: neonatalne hiperbilirubinemije*
 - **fotokemoterapija** - uporaba UV, vidne in bližnje IR svetlobe skupaj s fotosenzibilizatorjem (fotokemoterapevtsko snovjo) za zdravljenje bolezni, *npr.: fotokemoterapija psoriaze in drugih kžnih bolezni*
 - **fotodinamično zdravljenje** - kjer uporabljamo vidno ali bližnjo IR svetlobo skupaj s fotosenzibilizatorjem in izkoriščamo prisotnost molekularnega (tripletnega) **kisika** v tkivu
- 

Fotodinamična terapija (PDT)




Kirurg v operacijski dvorani drži optično vlakno, po katerem potuje snop svetlobe. Vir svetlobe je laserski žarek z ustrezno valovno dolžino. Bolnik dobi **fotosenzibilizator** - zdravilo, ki ga absorbirajo rakave celice. Med operacijo se svetlobni žarek usmeri na mesto tumorja tako, da aktivira zdravilo, ki uničuje rakave celice.

Zakaj je v operacijski dvorani rdeča svetloba?


Fotodinamična terapija



- Pri interakciji svetlobe in fotosenzibilizatorja v prisotnosti $^3\text{O}_2$, se energija absorbirane svetlobe uporabi za pretvorbo $^3\text{O}_2$ v energetsko bogatejšo obliko - **singletni kisik** ($^1\text{O}_2$). To je oblika kisika, kjer sta elektrona v zadnji razvezni π^* orbitali v paru.
 - $^1\text{O}_2$ zato zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira. Pri fotodinamični terapiji na mestu, kjer foton svetlobe zadene molekulo fotosenzibilizatorja, nastaja $^1\text{O}_2$, ki poškoduje okolišno tkivo. Na teh poškodbah okolišnega tkiva temelji zdravilni učinek, ki ga izkoriščamo pri fotodinamični terapiji kožnega in nekaterih drugih oblik raka.
- 


Fotodinamična terapija



- Gre za kombinacijo **snovnega posega** (sistemska ali lokalna aplikacija fotosenzibilizatorja) in **obsevanja** samo določene površine organizma: površine kože, žile, mrežnice, lumna požiralnika ali sapnika, ...
 - Učinek je **omejen** samo na določen predel telesa.
 - Sodobna tehnologija omogoča svetlobne vire z ustreznimi valovnimi dolžinami (različne energije) in ustrezno gostoto energije, ter uporabo optičnih vodil (optičnih vlaken), s katerimi snop svetlobe usmerjamo na izbrano mesto.
- 

Fotodinamična terapija



- 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.
 - Fotodinamična terapija postaja pomembna tudi za zdravljenje luskavice, artritisa, AMD (*age-related macular degeneration*), nekaterih avtoimunskih bolezni (arthritis), ateroskleroze in celo kot antimikrobna in antivirusna terapija.
- 

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

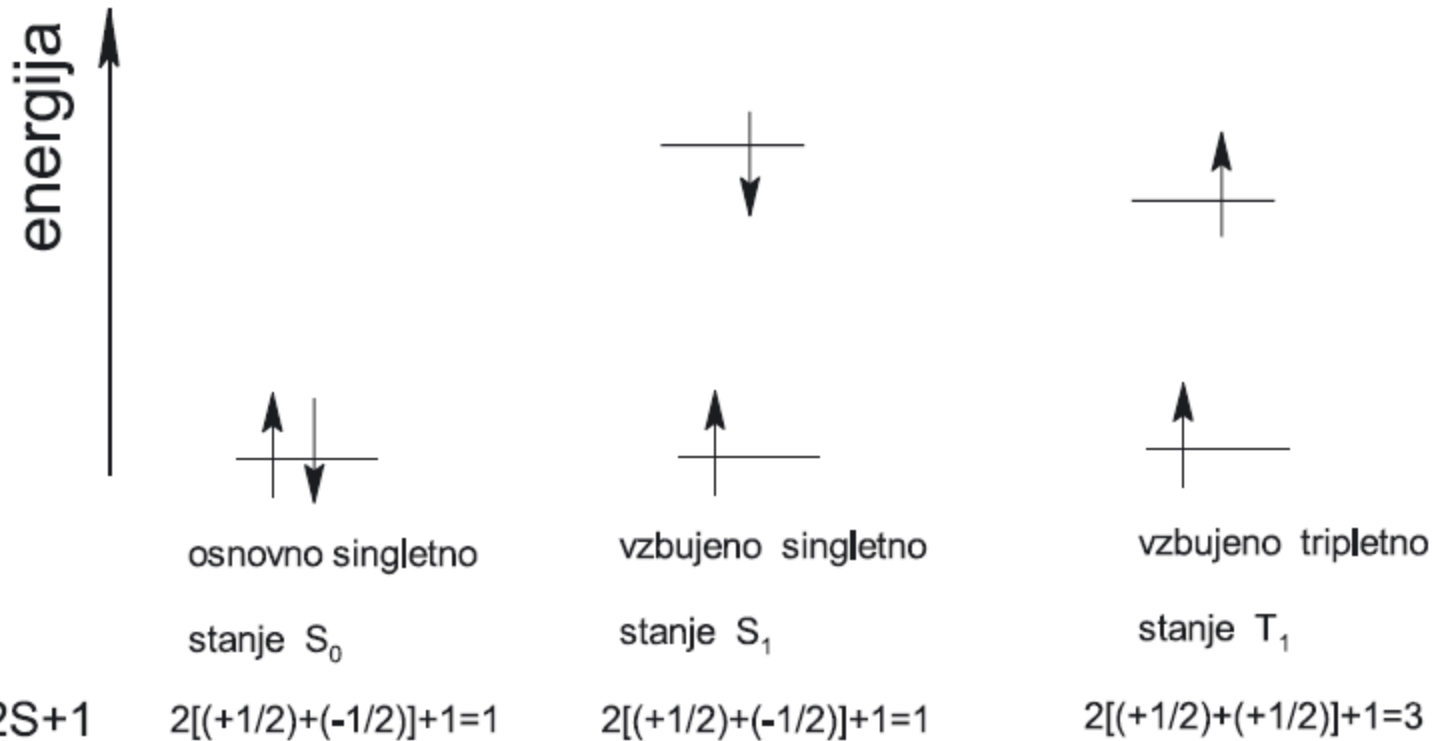
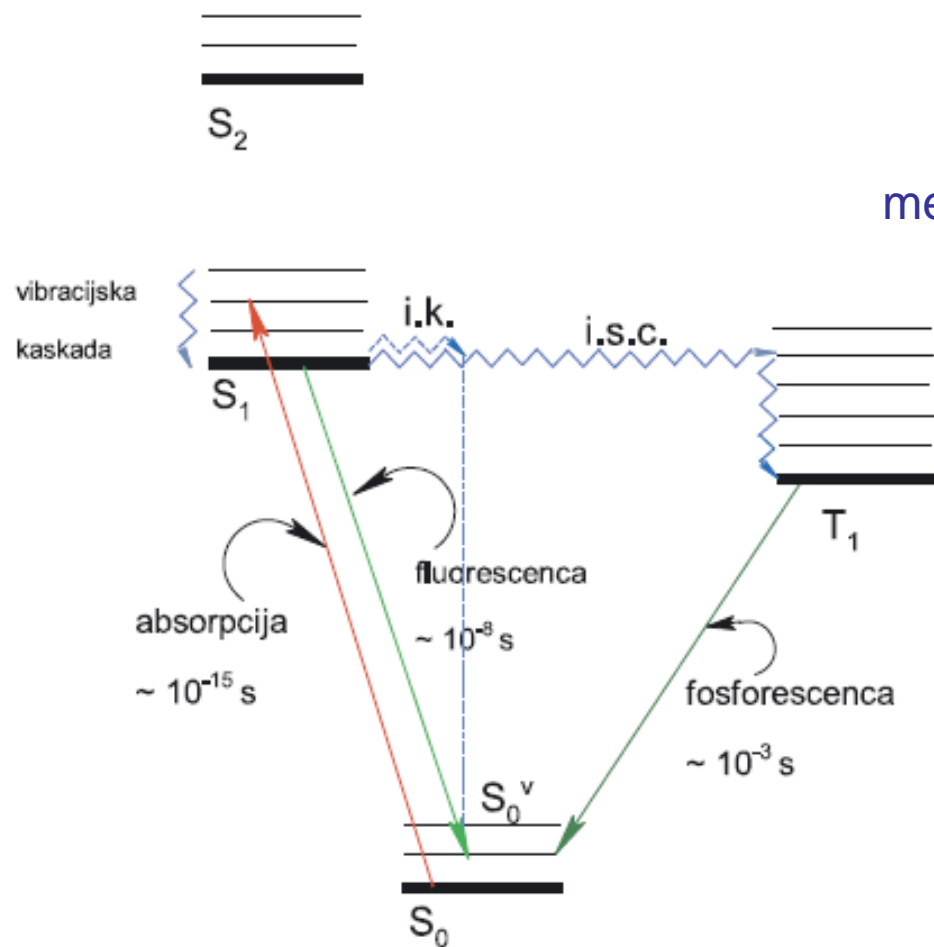


Diagram Jablonskega

energija



i.k. – interna konverzija
med stanjema z enako multipliciteto


i.s.c. – medsistemsko križanje
med stanji z različno multipliciteto

→ radiacijski prehodi
(absorpcija ali emisija)

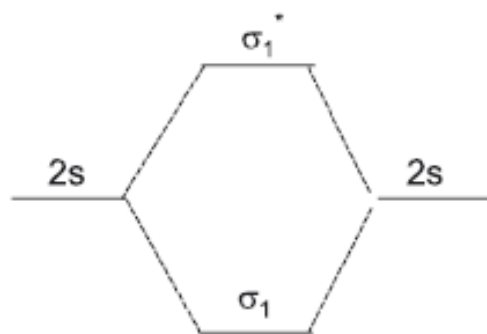
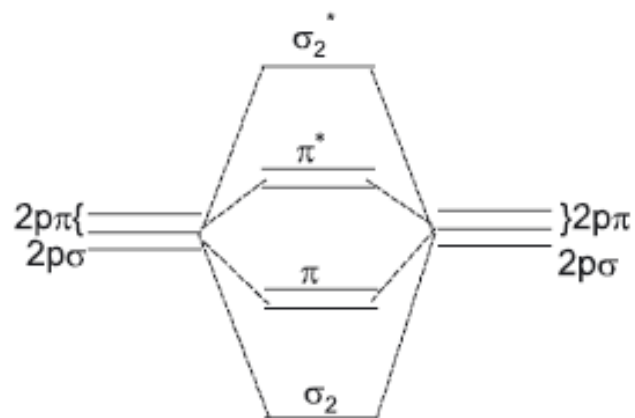
⚡ neradiacijski prehodi

Molekula v vzbujenem stanju



- odda foton (seva svetlobo) in se vrne v osnovno stanje (fluorescenca → **fotodiagnostiki** za lokacijo tumorjev)
 - preide v drugo (vzbujeno) stanje: T_1
 - vstopi v kemijsko reakcijo: npr. fotoionizacija, fotoadicija, fotociklizacija
 - prenese energijo vzbujenega stanja na drugo molekulo
- 

Elektronske konfiguracije molekul



N₂ ³O₂ (³ Σ_g^-) ¹O₂ (¹ Δ_g) ¹O₂ (¹ Σ_g^+)

vzbujeni singlet
 $t_{1/2} < ps$

—	—	—	—
—	↑↑	↑↓, —	↑↓, ↓
↑↑, ↑↑	↑↑, ↑↑	↑↑, ↑↑	↑↑, ↑↑
↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
↑↓	↑↓	↑↓	↑↓

atom 1

atom 2

red vezi

3

2

energija
atomskih
orbital

energija
molekulskih
orbital

energija
atomskih
orbital

energija
disociacije
vezi (kJ/mol)

941

493.5

magnetizem

dia

para

dia

dia

Energije in življenjske dobe stanj O_2

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	∞

Mehanizem fotokemičnega delovanja

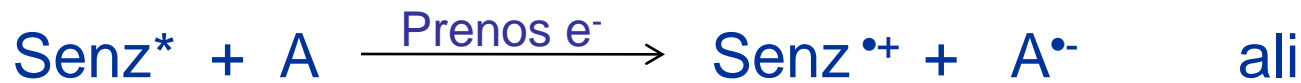
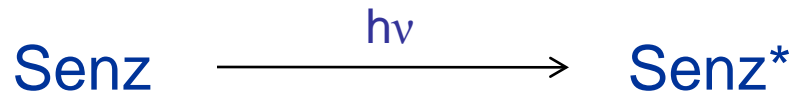
Poznamo dva mehanizma po katerih lahko svetloba v prisotnosti fotosenzibilizatorja in kisika sproži kemijsko reakcijo v substratu in poškoduje tkivo:

- Tip 1 – prenos elektrona
- Tip 2 – prenos energije

Globina, do katere sega svetloba je odvisna od valovne dolžine:

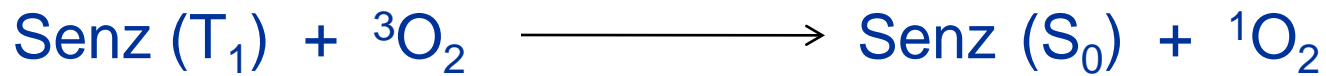
valovna dolžina (nm)	globina (mm)
400	cca 2,2
500-550	cca 3,5
630-650	do 20

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 ${}^3\text{O}_2$, kar vodi do nastanka reaktivnih kisikovih intermediatov (superoksidni ali peroksilni radikal), ki napadejo celične tarče.

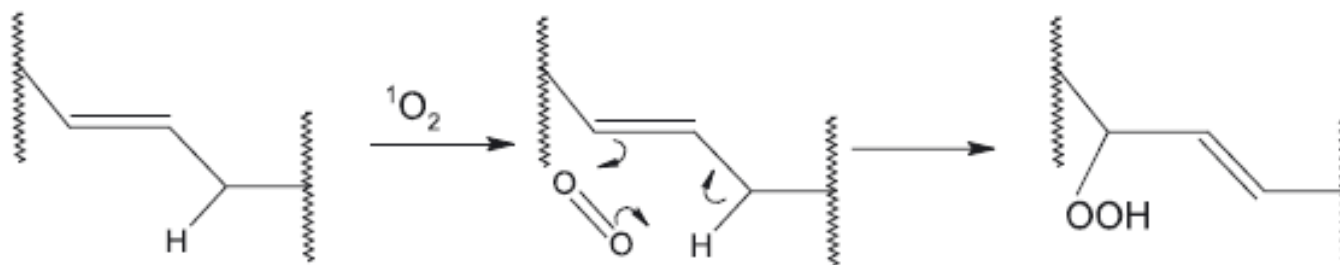
Tip 2 – prenos energije



- Fotosenzibilizator je torej posrednik, ki energijo svetlobe (fotona) preko lastnih vzbujenih stanj prenese na molekulo tripletnega kisika s katero trči, pri tem pa nastaja ${}^1\text{O}_2$.
- Pogoju, da senzibilizator lahko posreduje pri nastajanju ${}^1\text{O}_2$ je, da je **energija** (vzbujeno stanje senzibilizatorja) *večja od 94 kJ/mol* (energija singletnega kisika nad osnovnim tripletnim stanjem).

Reaktivnost $^1\text{O}_2$

- $^1\text{O}_2$ se adira na nenasičene spojine, npr. na maščobne kisline pri čemer v eni stopnji nastane hidroperoksid:




- reagira kot elektrofil, ki napada alkene bogate z elektroni. Z 1,3-dieni reagira kot dienofil po Diels-Alderjevi reakciji
- pomembna je reakcija $^1\text{O}_2$ s purinskimi bazami (gvanin) in aminokislinami (Trp, His, Met ...), ki nepopravljivo poškoduje DNA oziroma prizadene funkcionalne lastnosti nekaterih encimov
- Življenjska doba $^1\text{O}_2$ je v biološkem sistemu 10 - 40 ns z difuzijsko potjo med 10 - 20 nm.

Zdravilne učinkovine pri FT




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 $^1\text{O}_2$, 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 $^1\text{O}_2$ nad osnovnim stanjem)
 - prenos energije $\text{Senz}(T_1) \rightarrow ^1\text{O}_2$ mora biti učinkovit
 - monomerna (neasociirana) oblika je bolj fotodinamično učinkovita zato ni zaželeno, da fotosenzibilizatorji **agregirajo**
- 



Generacije fotosenzibilizatorjev

1. Generacija: derivati **hematoporfirina** in sorodne spojine
 2. Genetacija: fotosenzibilizatorji, **razviti iz porfirinov** z večjo učinkovitostjo in selektivnostjo
 3. Generacija: fotosenzibilizatorji, ki so še v razvojni fazi, in so **kovalentno vezani na določena monoklonska protitelesa**, s čimer bi lahko dosegli izredno prostorsko selektivnost nastajanja $^1\text{O}_2$
- 

Fotosenzibilizatorji glede na strukturo

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

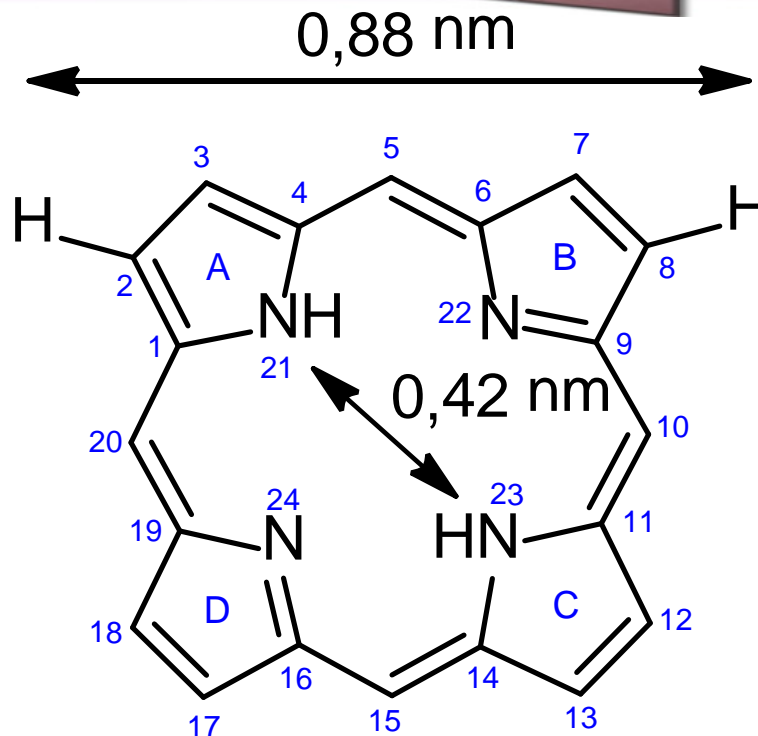
Porfirini, klorini in ftalocianini

- dobro absorbirajo v vidnem delu spektra zato so potrebni nizki odmerki
- so stabilni (aromska stabilnost) na svetlobi
- nizka toksičnost v temi
- **Teranostiki (terapevtiki + diagnostiki)**

Najbolj obetavne učinkovine druge generacije. Osnovni skelet je hidrofoben. Za povečanje topnosti v vodi uvajamo v molekulo dodatne sulfonske, karboksilne in hidroksilne funkcionalne skupine.

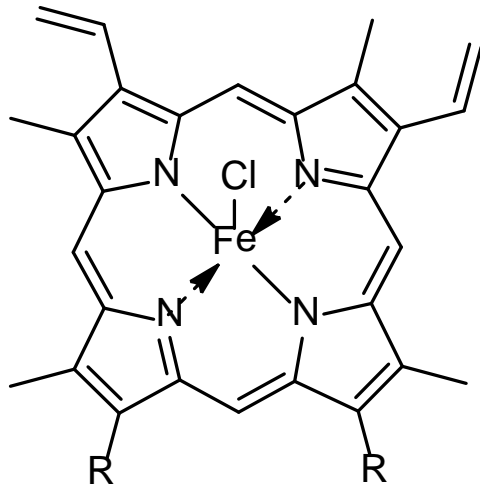
Pridobivajo jih iz hemoglobina, s popolno sintezo in z manipulacijo biosintezne poti sinteze protohema.

Porfirini

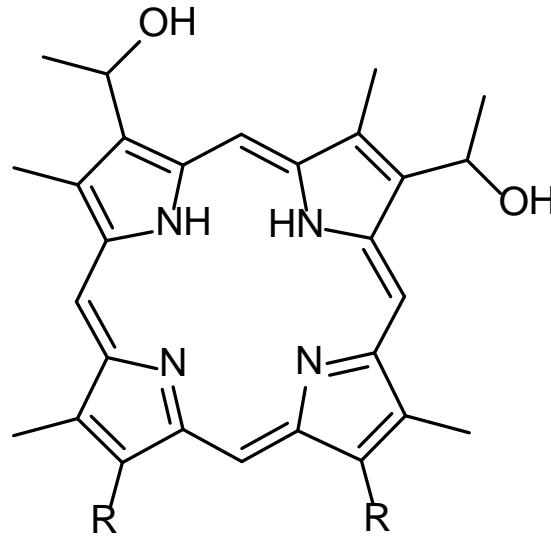


- planaren in aromatičen 18- π elektronski sistem
- Za fotodinamično terapijo so primerni kompleksi z relativno dolgo življenjsko dobo z Al^{3+} ali Zn^{2+} ioni.

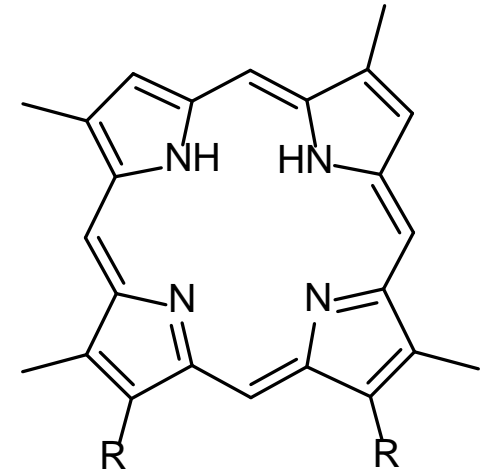
Porfini iz hemoglobina



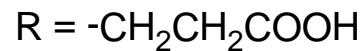
Protohemin



Hematoporphirin



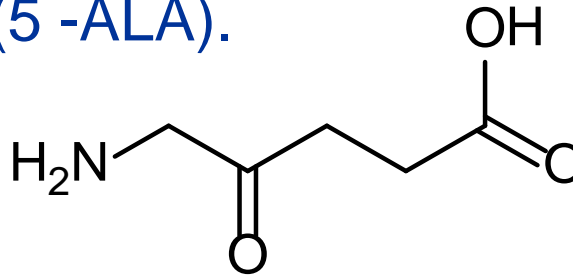
Deuteroporphirin



- Pridobivajo jih iz krvi
- Začetne spojine za sintezo fotodinamičnih senz. iz hemoglobina

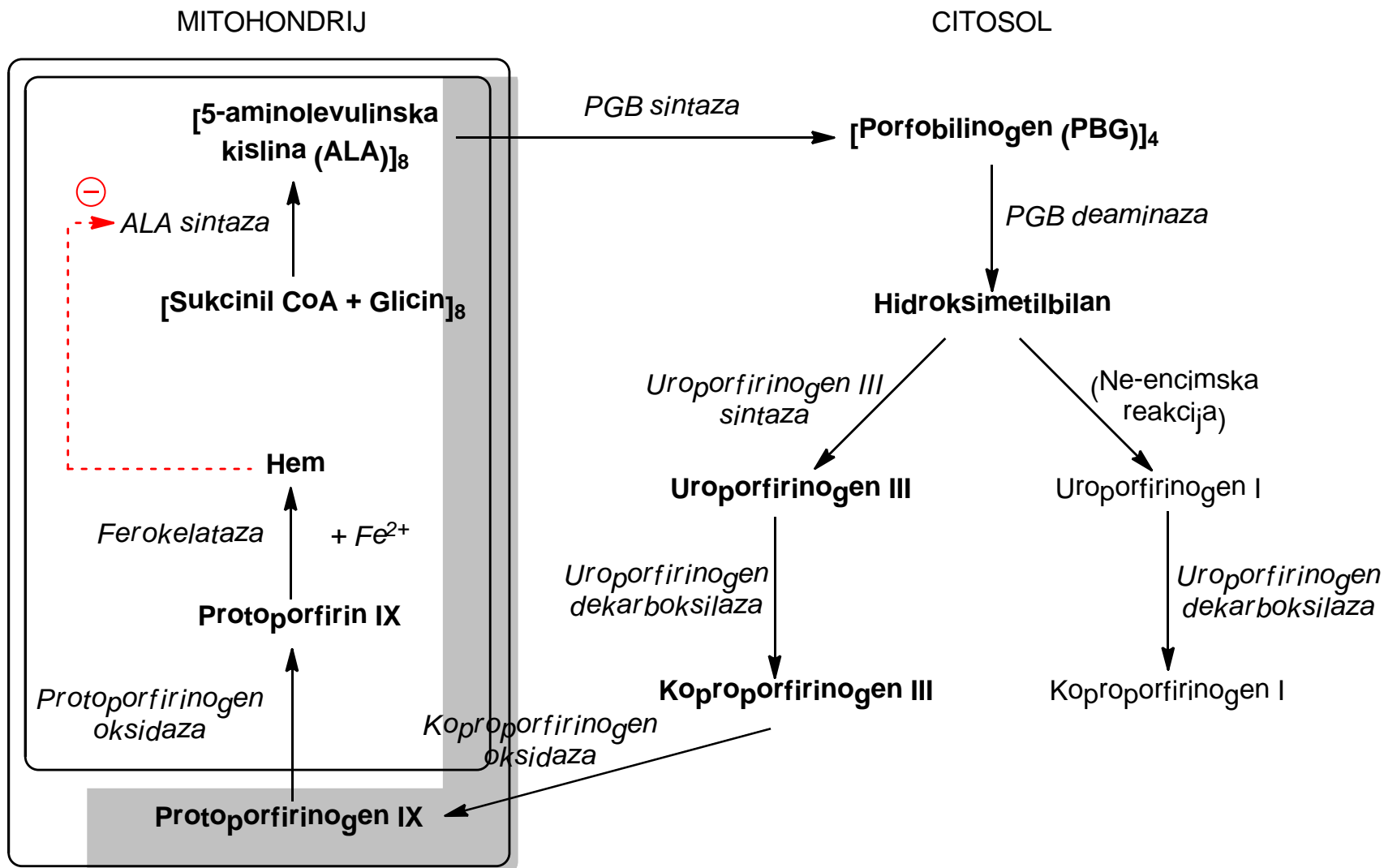
Manipulacija biosintezne poti sinteze hema

- Kontrolni mehanizem biosintezne poti je koncentracija (proto)**hema**, ki po sistemu povratne zveze vpliva na aktivnost encima **ALA sintaza** in na ta način regulira količino 5-aminolevulinske kisline (5 -ALA).

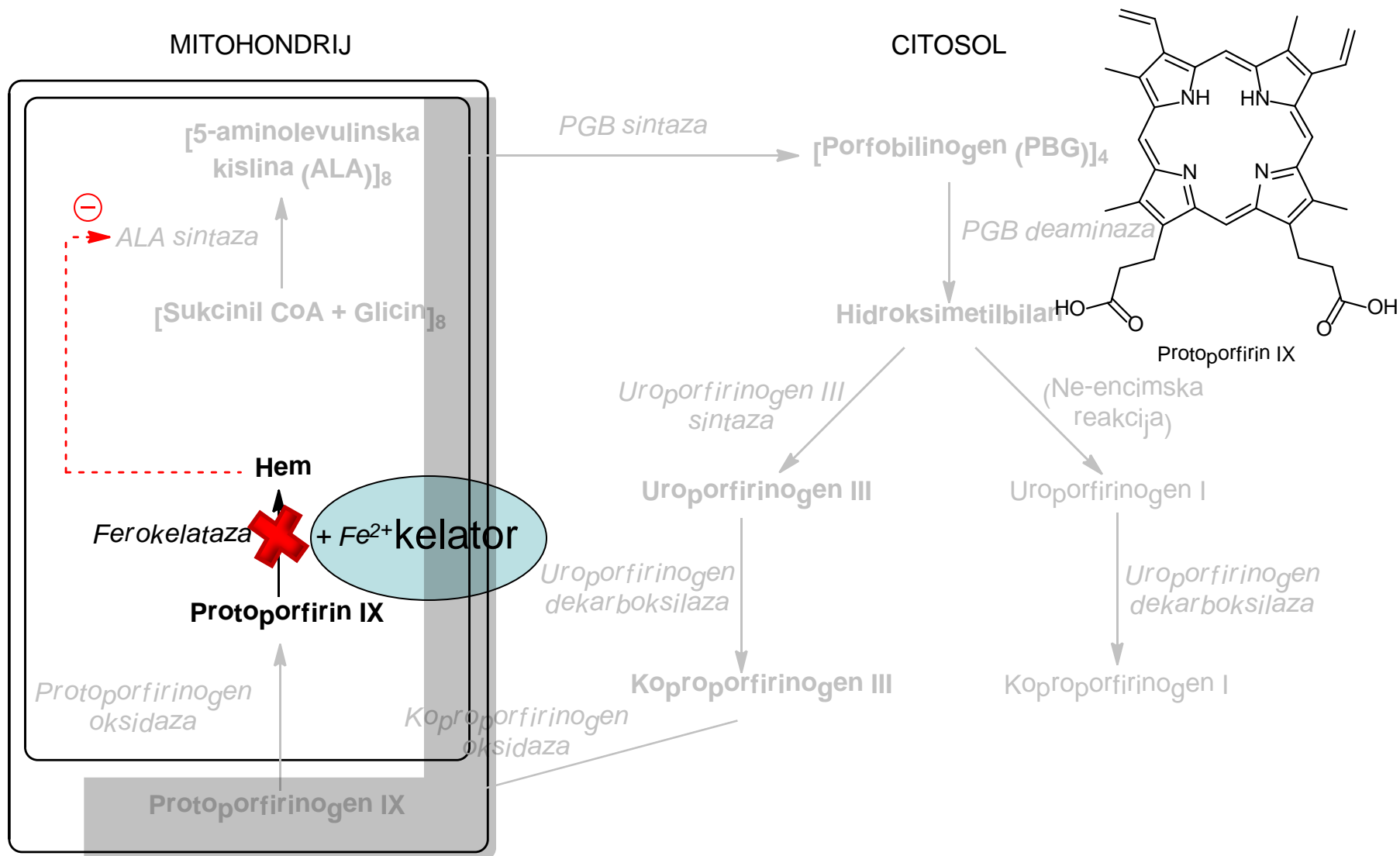


- Če dodamo 5 -ALA v organizem, lahko na ta način pospešimo biosintezo **porfirinogenov** in **protoporfirina IX**.
- Ta metoda se je izkazala predvsem pri zdravljenju nekaterih površinskih tumorjev.
- S pripravo alkilnih estrov (npr. heksilni ester 5-ALA) izboljšamo penetracijo skozi membrane.

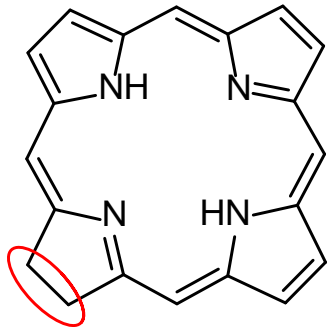
Biosinteza hema



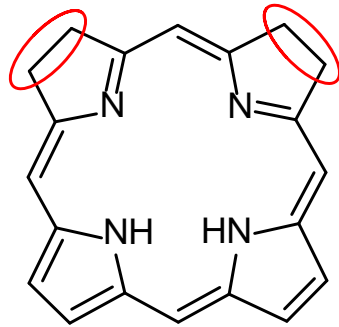
Uporaba kelatorjev Fe



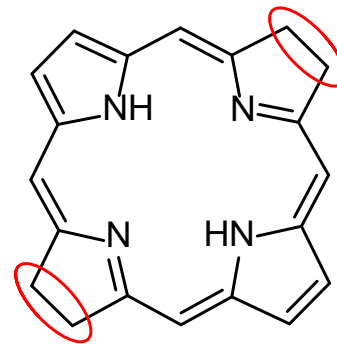
Klorini in bakterioklorini



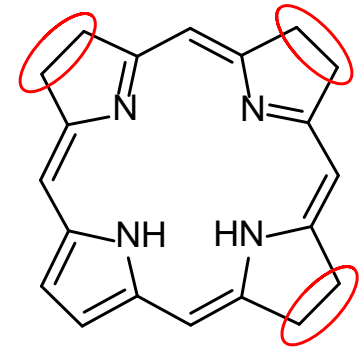
klorin



izobakterioklorin



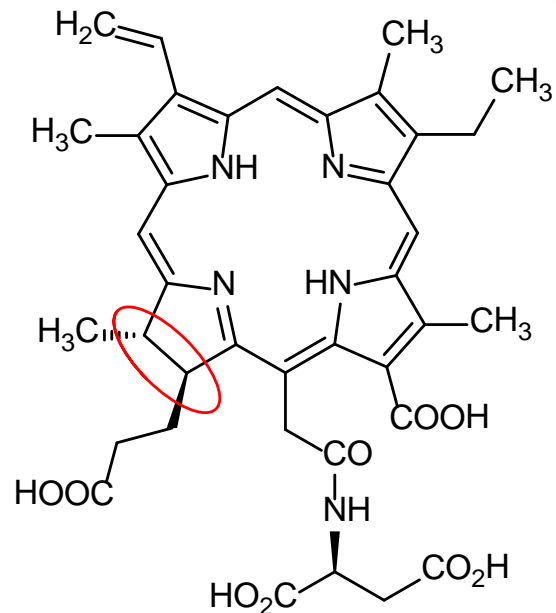
bakterioklorin



β -heksahidroporfirin

- 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.
- Vse spojine lahko prehajajo v porfirin s počasno avtooksidacijo.
- **Klorin** je kromofor klorofila a in klorofila b, **bakterioklorin** pa bakterijskega fotosintetskega pigmenta bakterioklorofila a.
- Pridobivamo jih z izolacijo in sintezno modifikacijo naravnih spojin ter s popolno sintezo.

Talaporfin, Monoaspartil klorin e₆ /LASERPHYRIN/

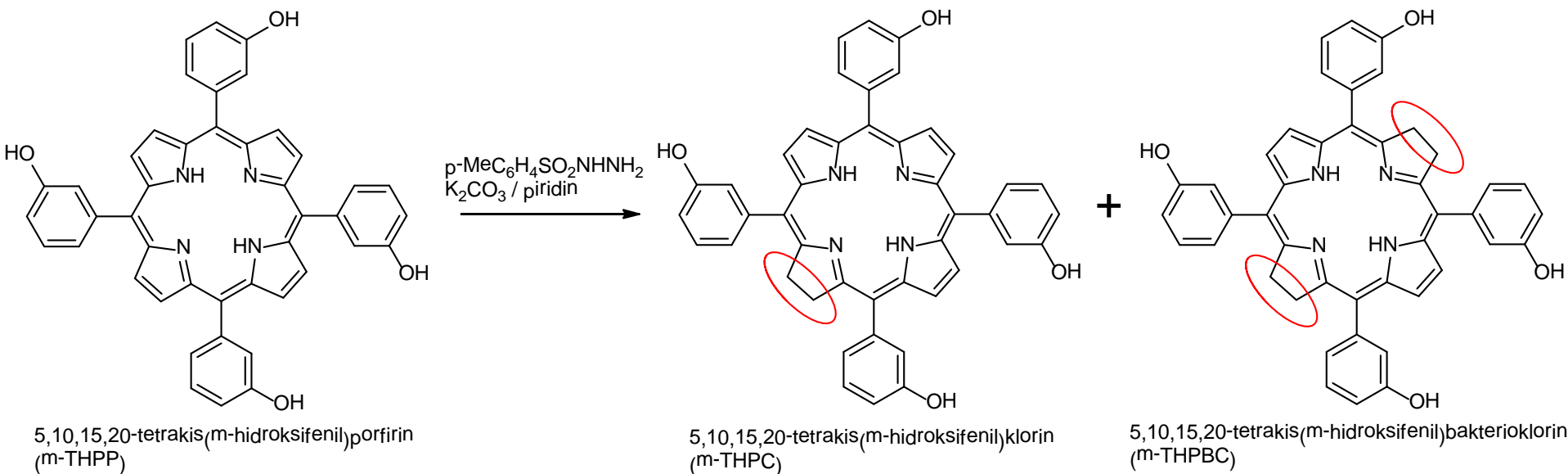


$\lambda @ 664 \text{ nm}$

monoaspartil klorin e₆

- Klorin, pridobljen iz naravnih virov – izveden iz klorofila
- Ima kratko dobo fotosenzibilizacije.
- Uporabljajo ga pri zdravljenju ponavljajočih se adenokarcinomov prsi, karcinomov bazalnih celic in karcinomov v koži.

Sintezni klorini in bakterioklorini

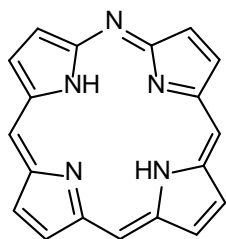


Fotodinamični efekt se povečuje z redukcijo v seriji spojin m-THPP, m-THPC, m-THPBC.

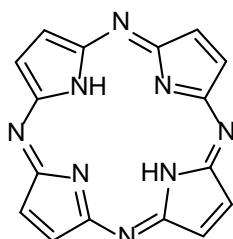
Sintezni klorini in bakterioklorini

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

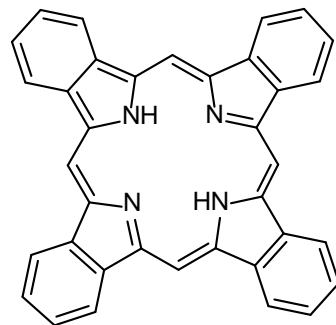
Ftalocianini in naftalocianini



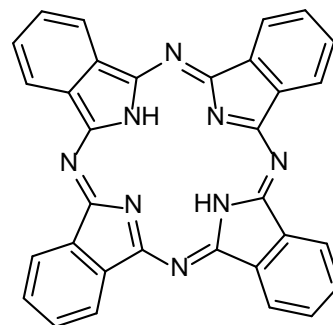
5-azaporphirin



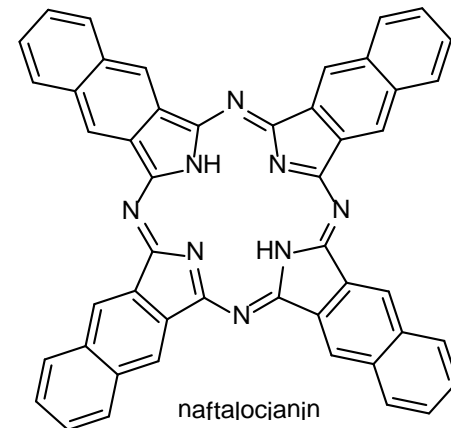
porpirazin



tetrabenzoporphirin



ftalocianin



naftalocianin


Z zamenjavo mezo ogljikovega mostička v porfirinu z dušikom nastane **azaporphirin**, z zamenjavo vseh štirih mezo ogljikovih mostičkov, dobimo **porpirazin**. Če na vse štiri β, β' -vezi porfirina vžemo benzenove obroče, dobimo **tetrabenzporfirin**.

Ftalocianin dobimo, če zadnji spojini zamenjamo še vse štiri ogljikove mostičke z dušikom.

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

Naftalocianini



- Če se število aromatskih obročev povečuje, se absorpcijski maksimum premika proti ***daljšim valovnim dolžinam***. Naftalocianini tako absorbirajo v območju 770-800 nm.
 - Možost uporabe teh spojin v zdravljenju **melanomov**: pokazali so, da se **Zn(II) kompleks naftalocianina** kopiči v pigmentiranih celicah melanoma in tam povzroči fotoinaktivacijo.
 - Razlika v selektivni toksičnosti na celice, ki vsebujejo melanin in na tiste brez melanina nastopi, **ker melanin deluje kot optični filter**.
- 

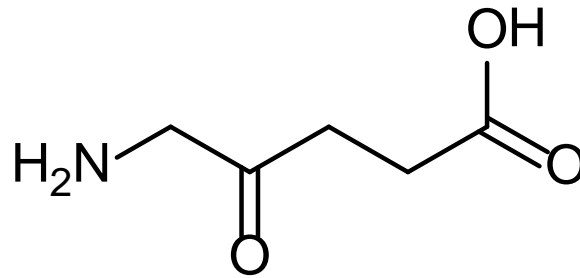


Pregled struktur

POMEMBNEJŠI FOTOSENZIBILIZATORJI



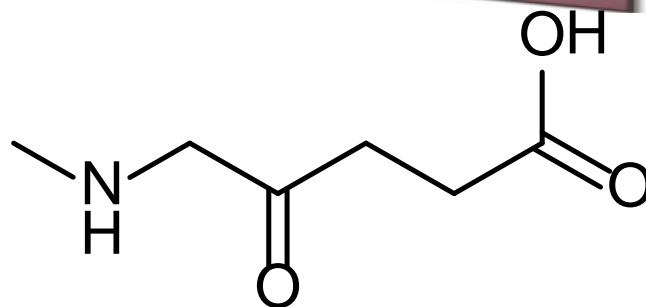
5-aminolevulinska kislina /LEVULAN/



$\lambda @ 630 \text{ nm}$

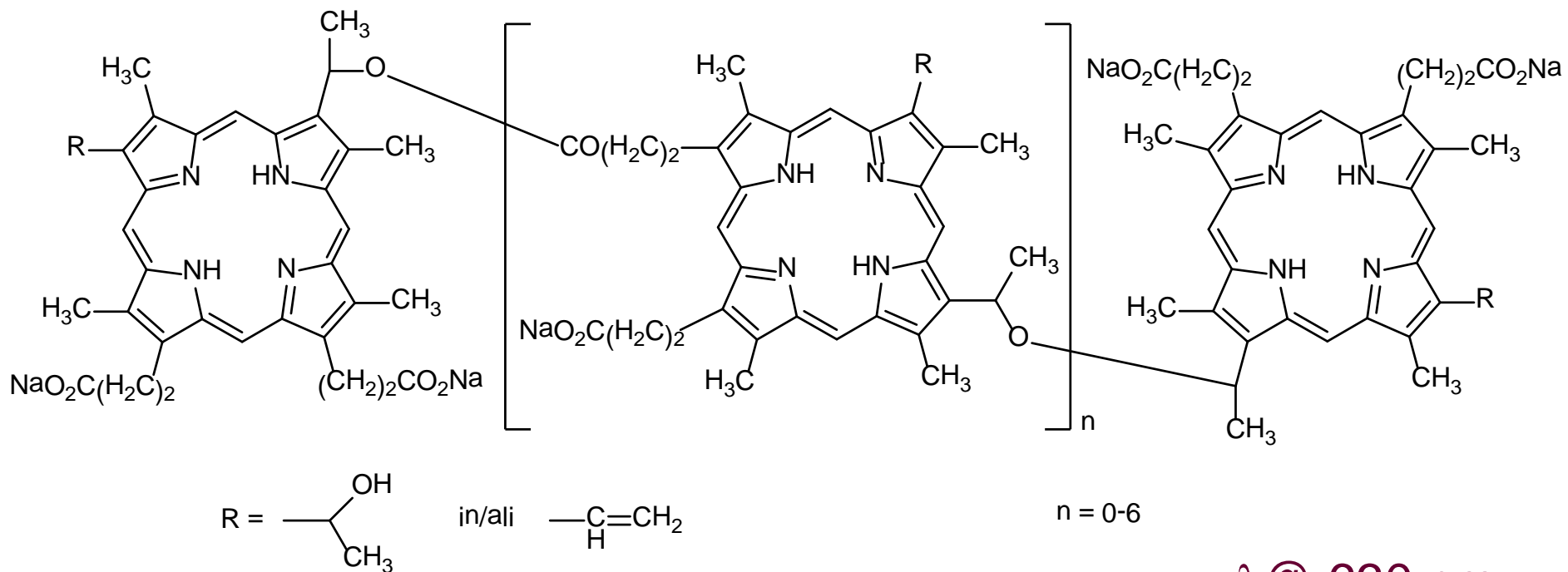
- 5-aminolevulinska kislina je predzdravilo. Iz nje v telesu nastane protoporfirin IX. Uporablja se predvsem v fotodinamični terapiji površinskih tumorjev (karcinom bazalnih celic, Bowenova bolezen in aktinska keratoza). Pri topikalni (dermalni) aplikaciji dosegamo selektivnost brez neželjene fotosenzibilizacije ostalih predelov.

Metilaminolevulinska kislina /METVIX/



- Uporablja se 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.

Porfimer natrij /PHOTOFRIN/




$\lambda @ 630 \text{ nm}$

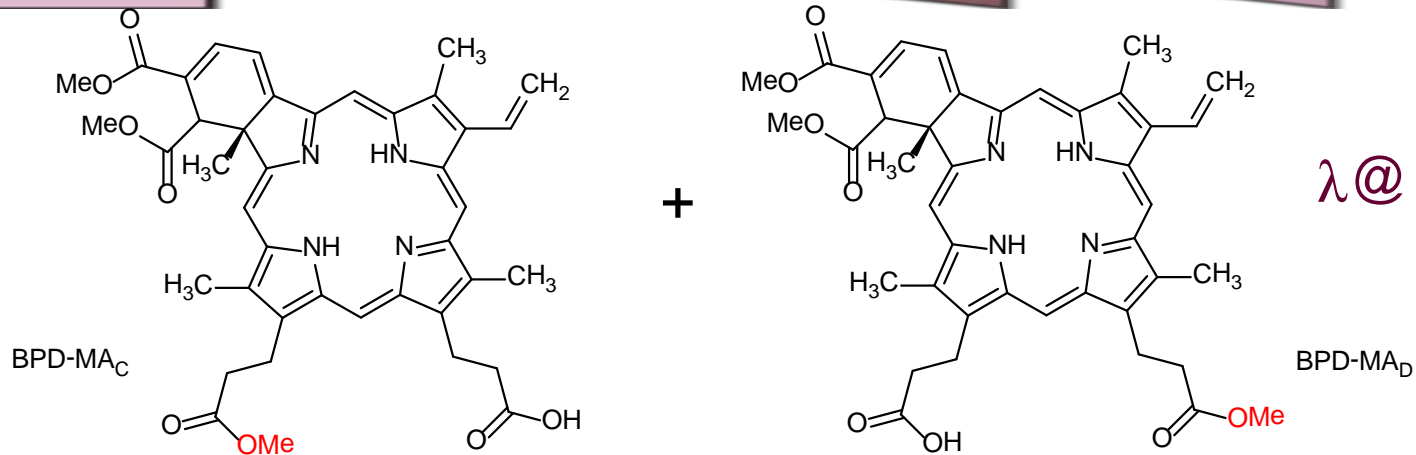
- Je mešanica oligomerov porfirinskih enot (lahko jih je do osem), povezanih z eterskimi in esterskimi vezmi, pripravljena s kemijsko obdelavo hematoporfirina.

Porfimer natrij /PHOTOFRIN/



- Uporablja se v fotodinamični terapiji **tumorjev**. Učinkovino zmešamo z raztopino dekstroze ali natrijevega klorida in ga *injiciramo intravensko*. Učinkovina se odstrani iz večine tkiv po 40 do 72 urah, **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. Uničenje tumorja je posledica tvorbe $^1\text{O}_2$, posledično pa se tvorijo tudi superoksidni in hidroksilni radikali.
 - Njegovo učinkovitost so preizkušali v kliničnih študijah proti raku požiralnika, endobronhialnemu raku in raku na mehurju.
- 

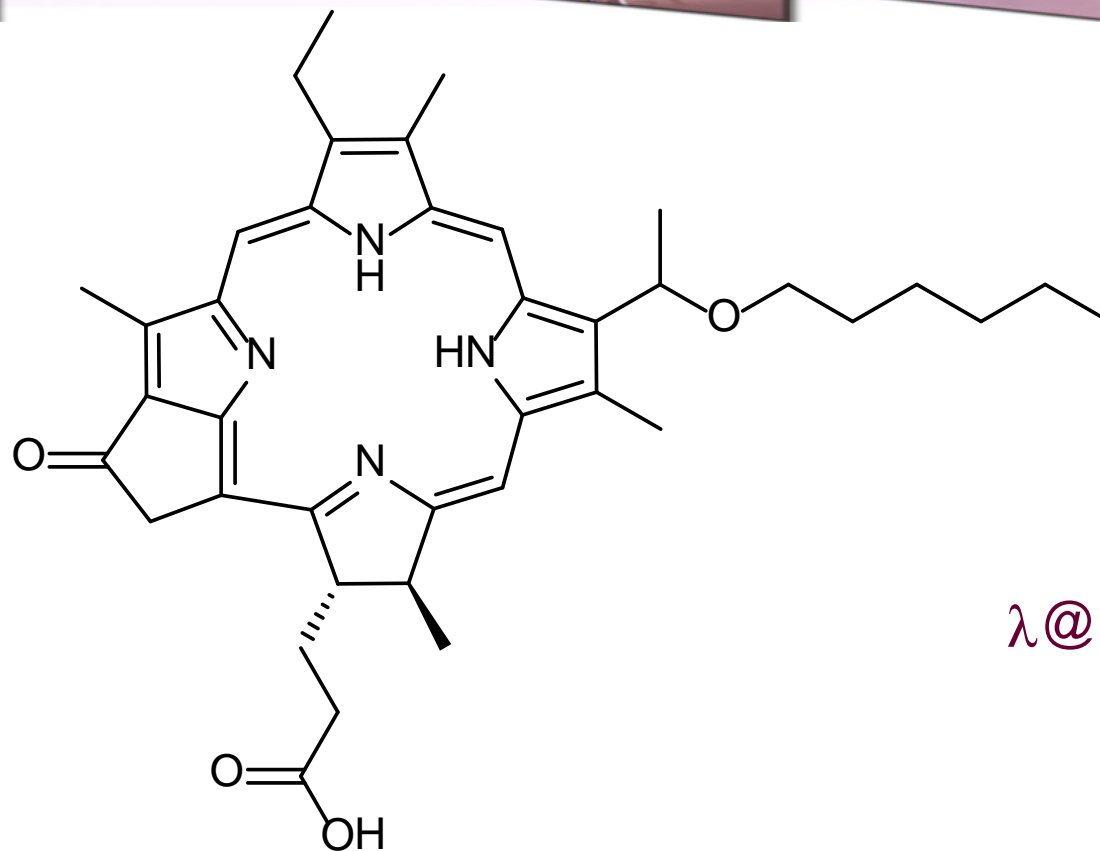
Verteporfin /VISUDYNE/



$\lambda @ 690 \text{ nm}$

Uporablja se v obliki sterilnega praška za *intravensko infuzijo*. Obe strukturni izomeri, BPD-MA_C in BPD-MA_D (1:1), sta enako učinkoviti. Terapija poteka v dveh stopnjah, podobno kot pri porfimer natriju. Razpolovna doba je 4,7 h. Problem pri verteporfinu 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.

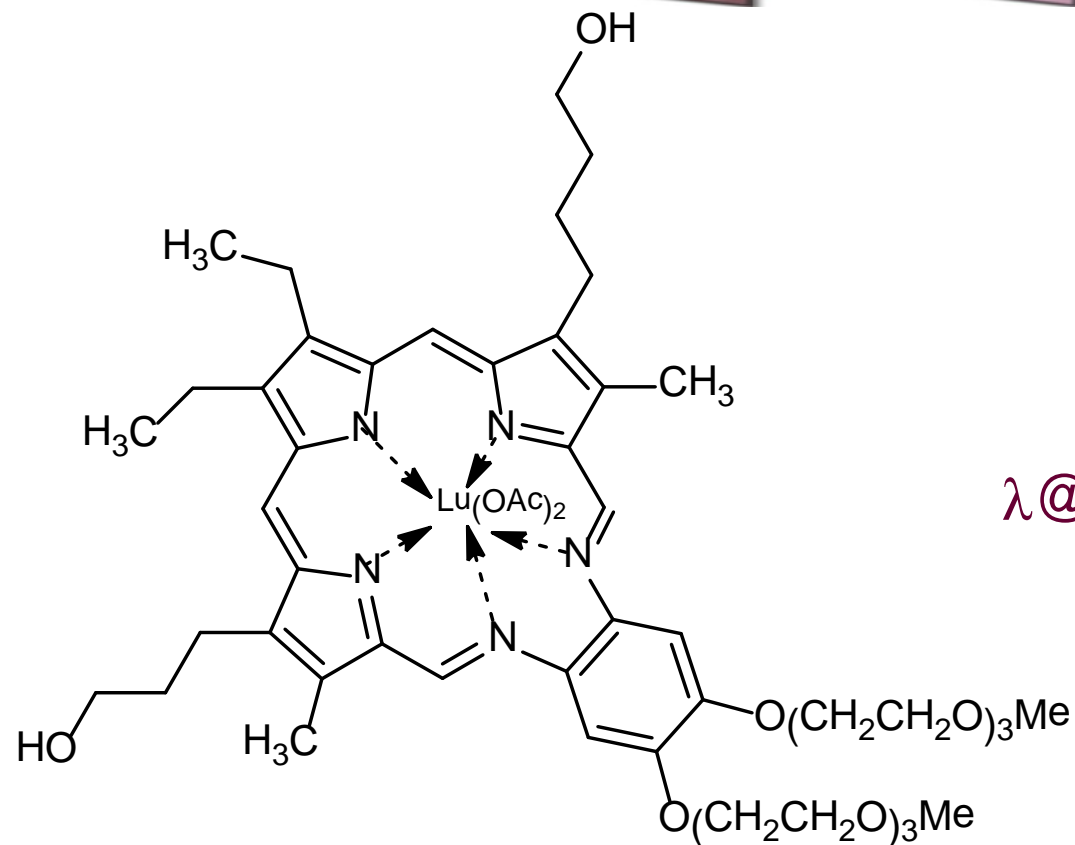
HPPH /PHOTOCHLOR/



$\lambda @ 665 \text{ nm}$

- V I/II fazi kliničnih preskušanj za zdravljenje raka na požiralniku in raka na pljučih.

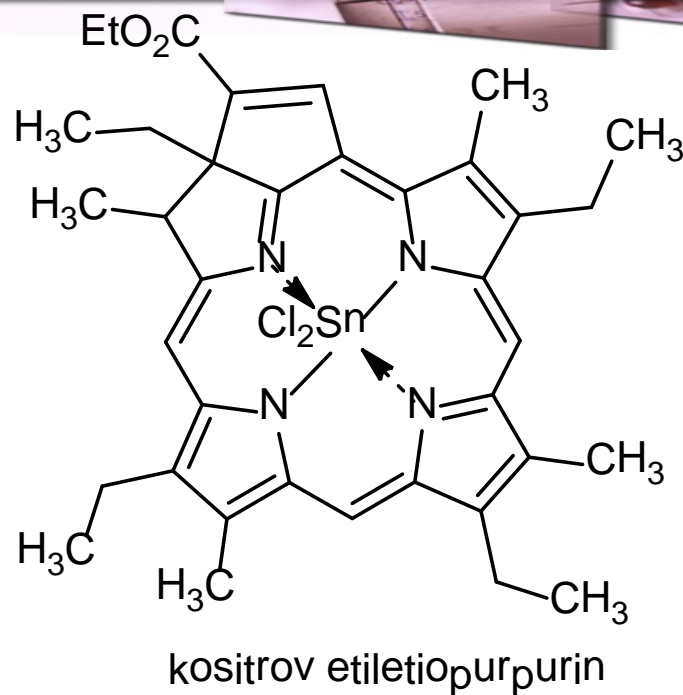
Motexafin lutetium /LUTRIN, ANTRIN/



$\lambda @ 732 \text{ nm}$

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

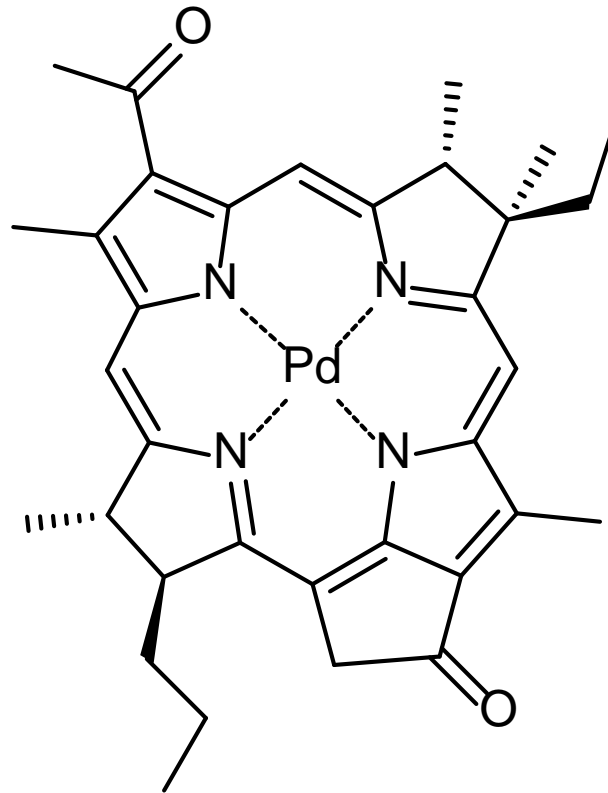
Etiletiopurpurin / *Purlytin*



$\lambda @ 660 \text{ nm}$

- Uporablja se za zdravljenje *raka na prostati* in *starostne degeneracije centralnega dela očesne mrežnice*.
- Ker je zelo hidrofoben, uporabljamo posebne sisteme za njegovo dostavo na mesto delovanja. Za etilopurpurin se uporabljajo biološko razgradljive cianoakrilatne **nanosfere** s premerom 150-250 nm.

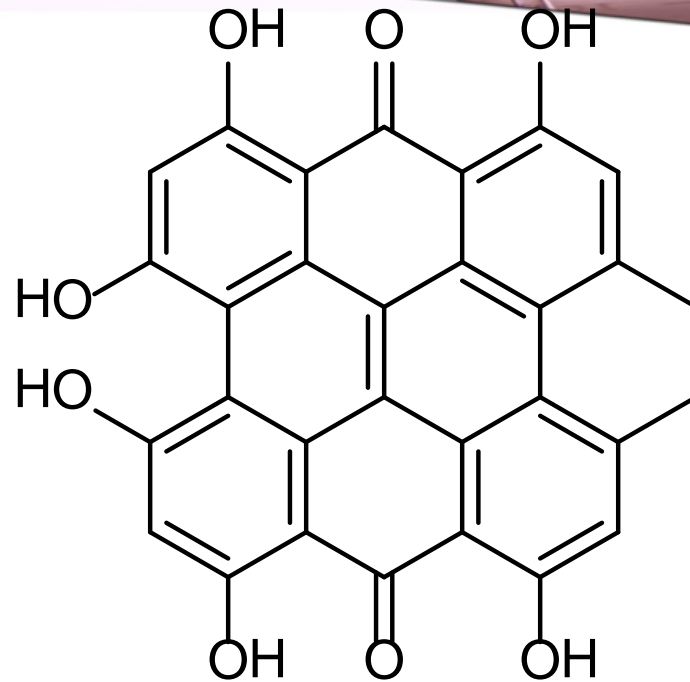
Pd-bakteriofeoforbid /TOOKAD/



$\lambda @ 763 \text{ nm}$

- Koplči se v žilah in poškoduje žile; je toksičen za rakave celice.
- V kliničnih preiskavah za zdravljenje **raka na prostati**.

Hipericin



- V I/II fazi kliničnih preskušanj za zdravljenje luskavice, kožnih oblik raka, možganskih tumorjev, bradavic (topikalni pripravki),
- Protivirusna učinkovina proti Hepatitisu C, HIV/AIDS

Shematski povzetek

