



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 8월

박사학위 논문

자궁경부암 마우스모델에서
포토론을 이용한 광역동치료의
효과

조선대학교 대학원

의 학 과

허 수 민

자궁경부암 마우스모델에서
포토론을 이용한 광역동치료의
효과

Effects of Photolon-induced photodynamic therapy
in uterine cervical cancer mouse model

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

허 수 민

자궁경부암 마우스모델에서
포토론을 이용한 광역동치료의
효과

지도교수 안 태 규

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

허 수 민

허수민의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 병 래 (인)

위 원 조선대학교 교수 안 태 규 (인)

위 원 이화여자대학교 교수 주 응 (인)

위 원 경북대학교 교수 흥 대 기 (인)

위 원 원광대학교 교수 김 병 룬 (인)

2023년 6월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	vi
1. 서론	1
A. 자궁경부암	1
B. 광역동요법	1
C. 광민감제	3
D. 광선	5
E. 광역동치료에 의한 세포사멸	6
F. 실험목적	7
2. 재료 및 방법	9
A. 실험재료	9
B. 실험동물	9
C. 세포배양	9
D. 생쥐 자궁경부암 모델	9
E. 광역동치료(PDT)	10
F. TUNEL 분석	11
G. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) 측정 ..	12
H. 종양조직 지질과산화물량 측정	12
I. Caspase 3 활성화도 측정	12

J. 통계처리	13
3. 결과	14
A. 광역동치료 후 생쥐 자궁경부암의 변화	14
B. 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice 종양의 조직학적 변화	16
C. 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 8-OHdG 량의 변화	18
D. 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 TBARS 량의 변화	19
E. 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 Caspase-3 활성화도 변화	20
4. 고찰	21
5. 결론	28
6. 참고문헌	30

표 목 차

Table 1. Selected examples of first, second
and third generation photosensitizers.
..... 3

도 목 차

Fig. 1. Tetrapyrrole photosensitizers.	3
Fig. 2. A diode laser(660nm red light) is irradiated onto the tumor of the SCID/ICR mouse.	11
Fig. 3. Photograph of CaSki cancer bearing mice after photodynamic therapy with photolon (5mg/Kg) and diode laser irradiation(660nm).	14
Fig. 4. Effects of PDT on tumor volume of CaSki cancer bearing mouse.	15
Fig. 5. H&E staining Images of tumor tissue of CaSki cancer bearing mice at 24 hrs after PDT. ..	16
Fig. 6. TUNEL images of tumor tissue of CaSki cancer bearing mice at 24 hours after PDT.	17
Fig. 7. The effects of PDT on TUNEL-positive nuclei content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse.	17
Fig. 8. The effects of PDT on 8-OHdG content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse.	18
Fig. 9. The effects of PDT on TBARS content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse.	19
Fig. 10. The effects of PDT on Caspase-3 activity in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse.	20

Fig. 11. Chemical structure of the Photolon. 21
Fig. 12. Mechanism of lipid peroxidation. 25

ABSTRACT

Effects of Photolon-induced photodynamic therapy in uterine cervical cancer mouse model

Heo Soo-Min

Advisor : Prof. Ahn Tae-Gyu, M.D, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Photodynamic therapy is a non-invasive treatment method that irradiates light after administration of a photosensitizer, and can be applied regardless of the type or stage of cancer. Photodynamic therapy experiments for cervical cancer were mostly conducted in vitro studies using cervical cancer cell lines, and there are very few in vivo experiments.

The purpose of this study was to observe the effect of photodynamic therapy on cervical cancer using a human cervical cancer cell line (CaSki cell) mouse model (tumor bearing mouse model).

Cultured CaSki cells were injected into mice (SCID/ICR mice), and mice with carcinoma in the back of the mice were used as a CaSki cancer bearing mouse model. Photodynamic therapy was performed by irradiating $80\text{J}/\text{cm}^2$ and $100\text{J}/\text{cm}^2$ of a laser beam (wavelength 660nm) 2 hours after intraperitoneal injection of Photolon (5mg/kg BW) into CaSki cancer bearing mice, respectively.

After 24 hours of laser irradiation, the experimental animals are

sacrificed and the tumor tissue is excised. A part of the tumor tissue was used as tissue material such as H&E staining and TUNEL assay, and the rest of the tumor tissue was used for biochemical tests such as 8-OHdG, TBARS and Caspase-3 assay.

As a result of photodynamic therapy using the photosensitizer Photolon in CaSki cancer bearing mouse model, the tumor volume of the photodynamic therapy 80J/cm² group was increased by 213% after 21 days of laser irradiation compared to before laser irradiation. The tumor volume of the photodynamic therapy 100J/cm² group was reduced by 48% after 21 days of laser irradiation compared to before laser irradiation. Tumor tissue H&E staining in the light microscopy findings, the tumor tissue of the 80J/cm² group of photodynamic therapy had an irregular nucleus, and a nucleus with an unclear nuclear membrane was observed. In the tumor tissue of the photodynamic therapy 100J/cm² group, the irregular shape of the nucleus morphology was more severe than that of the 80J/cm² group, and there were more cells with unclear nuclear boundaries. After 24 hours of photodynamic therapy, the percentage of TUNEL-stained nuclei in the tumor tissue of the 80J/cm² group was 47.2%. In the photodynamic therapy 100J/cm² group, the number of TUNEL-stained nuclei in the tumor tissue was 75.9%, and the ratio of TUNEL positive cells was 28% higher than that of the 80J/cm² group.

After 24 hours of photodynamic therapy, the 8-OHdG content in the tumor tissue was increased by 287% in the photodynamic treatment 80J/cm² group compared to the control group. Tumor tissue 8-OHdG content was increased by 133% in the photodynamic treatment 100J/cm² group compared to the photodynamic treatment 80J/cm² group. Tumor tissue TBARS contents was increased by 192% in the photodynamic treatment 80J/cm² group than in the control group. Tumor tissue TBARS content in the photodynamic treatment 100J/cm² group was increased by

64% compared to the photodynamic treatment 80J/cm² group. Tumor tissue Caspase-3 activity was increased by 141% in the photodynamic treatment group of 80J/cm² compared to the control group. The tumor tissue Caspase-3 activity of the photodynamic treatment 100J/cm² group was increased by 41% compared to the photodynamic treatment 80J/cm² group. As a result of the above experiment, it was shown that when photodynamic therapy was performed using the photosensitizer photolon in the CaSki cancer bearing mouse model, the volume of the tumor was reduced and thus there was an anticancer effect.

Reactive oxygen generated by photochemical reaction induces oxidative damage to DNA and cell membranes, and Cytochrome C is leaked due to decreased mitochondrial membrane function, thereby activating the intrinsic apoptosis pathway, which is thought to induce cancer cell death.

Photodynamic therapy using Photolon and CaSki tumor-bearing mouse model is a preclinical experimental model, and additional research is needed to apply it as a clinical cancer treatment method.

Key words: Photodynamic therapy, photolon, CaSki cells, ROS

1. 서 론

1) 자궁경부암 (cervical cancer)

자궁경부암은 자궁경부 상피에서 발생하는 암으로, 전 세계적으로 여성에게 발병하는 암 중 네 번째 흔한 암으로 알려져 있다. 2020년 604,000명의 환자가 발생하였고, 그 중 342,000명이 사망하였는데, 자궁경부암의 약 80%는 아시아, 남미, 아프리카 등의 개발도상국에서 발생하는 것으로 알려져 있다[1]. 2021년 12월에 발표된 중앙암등록본부의 보고(1999~2019년)에 의하면 우리나라의 2019년 자궁경부암 환자 수는 58,983명으로 여성 암 환자 중 갑상샘암(37만 7,586명), 유방암(25만 8,172명), 대장암(11만 3,755명) 및 위암(10만 8,259명)에 이어서 5위이다[2].

자궁경부암의 병기는 1기에서 4기까지 분류되어 있고, 각 병기에 따른 치료 원칙이 정해져 있다. 1기에서 2기 초에는 수술요법이나 동시 화학방사선요법이 시행되고, 2기 말보다 더 진행된 암에 대해서는 동시 화학방사선요법이 시행된다[3]. 수술요법은 암 조직을 절제하여 제거하는 방법으로 암 치료법 중 가장 우선적으로 시도하는 방법이다[3]. 암세포의 전이가 일어난 경우에는 수술요법과 화학요법이나 방사선요법을 병행하는 치료가 시도되고 있으나, 5년 생존율은 암 환자마다 많은 차이가 있다[4]. 따라서 5년 생존율을 증대시키기 위한 여러가지 치료법을 병행하여 시행하는 복합적 치료요법이 시행되고 있으나 환자 생존율의 증가는 높지 않기 때문에 새로운 항암 화학요법제나 치료방법의 개발이 필요하다.

2) 광역동요법(photodynamic therapy)

광역동치료는 광선, 광민감제 및 산소를 이용하여 질병을 치료하는 방법으로, 광민감제를 투여한 후 빛을 조사하여 시행하는 치료 방법이다[5].

인류는 수천 년 전부터 광선을 질병 치료에 이용해 온 것으로 알려져 있는데, 기원전 3000여 년 전 고대 이집트나 인도에서 태양 광선과 식물을 이용하여 피부질환을 치료하였다는 기록이 있고, 100여 년 전부터는 백반증, 건선 및 피부암 등의 질병 치료에 빛과 반응성 화학 물질이 함께 사용되었다[6]. 20세기에 들어서 독일의 과학자 von Tappeiner & Rabb은 합성 화학물질

과 광선 및 산소를 조합시키면 질병 치료 효과가 증가한다는 것을 처음 밝혔
다[7].

1990년대 러시아의 Andrey F. Mironov 팀에 의해서 광민감제 Photogem이
개발되면서 광역동치료는 급격한 진전을 이루게 되었다. Photogem은 러시아
보건당국의 허가를 받아서 1992년부터 1996년 사이에 암 환자를 상대로 임상
시험을 실시하였는데 1500명의 환자 중 91%에서 치료 효과가 있는 것으로 나
타났다[8].

광민감제에 특정 파장의 광선을 조사하면 광민감제는 광감작 반응
(photosensitizing reaction)이 일어나서 기저상태(ground state)에서 활성화
상태(excitation state)로 변화되고, 활성화된 광민감제와 산소는 광화학
반응(photochemical reactions)에 의해서 반응성 산소종(reactive oxygen
species)을 생성한다[7,8].

세포내에서 반응성 산소종(reactive oxygen species)은 단백질, 지질 및
핵산 등에 작용하여 이들 물질을 산화시켜 기능이 감소하면 세포 활성이 저
하되어 세포 사멸을 초래한다[9]. 반응성 산소의 수명은 10 ~ 320 ns 정도로
매우 짧기 때문에 암 세포 내에서 광화학반응에 의한 손상은 광민감제가 존
재하는 주변에서 일어난다[10]. 반응성 산소종이 단백질에 작용하면 구성 아
미노산 중 시스테인, 티로신, 트립토판, 히스티딘 및 메티오닌 등에서 주로
산화이 일어나는 것으로 알려져 있고, 세포막 불포화지방산에 반응성 산소종
이 작용하여 지질 과산화가 일어나면 세포막 기능이 감소되는 것으로 알려져
있다[10]. 또한 반응성 산소종이 세포의 DNA에 작용하면 8-OHG 과 같은 핵산
산화물이 생성되고, 핵산의 기능이 저하되어 세포 손상이 나타날 수 있다
[11].

세포가 반응성 산소종에 의해서 산화적 손상을 받으면 세포사멸(cell
death)이 일어날 수 있는데, 광역동치료에 의한 세포사멸은 세포 자멸사
(apoptosis)와 괴사(necrosis)가 주로 나타나는 것으로 알려져 있다[12]. 광
역동요법은 만성궤양, 화상감염, 여드름 및 기타 다양한 세균의 국소적 요법
으로 효과적인 것으로 알려져 있다[13].

3) 광민감제(Photosensitizers)

광민감제는 광역동치료의 핵심물질로서 헤모글로빈에서 유래한 프로토포르피린(protoporphyrin)이 항암 치료에 이용된 이후 광역동치료에 테트라피롤 골격(tetrapyrrole backbones)을 가진 포르피린(Porphyrin)이나 클로린(Chlorin)계의 광민감제가 많이 사용되고 있다(Fig.1).

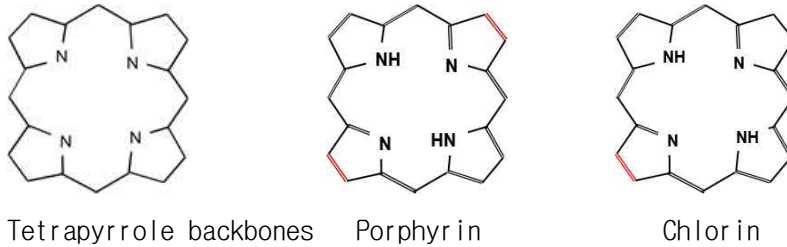


Fig. 1. Tetrapyrrole photosensitizers.

광민감제의 이상적 조건은 안정성이 높고 값이 싸야 하며, 투여 후 빠른 시간 내에 대상조직(target tissue)에 축적되어야 한다[14]. 또한 빛에 의해 활성화가 잘 되고, 빛을 조사하지 않았을 때 세포독성(dark toxicity)이 낮으며, 몸에서 배출되는 시간이 빠른 제제가 좋아야 한다[14].

광민감제는 특성에 따라서 1세대, 2세대 및 3세대 광민감제로 나눌 수 있다.

First generation PSs	Second generation PSs	Third generation PSs
Porphyrin Hematoporphyrin	Benzoporphyrin 5-Aminolevulinic acid Protoporphyrin IX Phthalocyanine Chlorin	Antibody conjugates Encapsulated agents into carriers (e.g. liposomes, micelles, nanoparticles)

Table 1. Selected examples of first, second and third generation photosensitizers.

1세대 광민감제는 천연추출물 또는 이들의 유도체로서 헤모글로빈에서 유래한 포르피린(Porphyrin)과 헤마토포르피린(hematoporphyrin) 유도체가 있다. 1967년 Lipson 등은 헤마토포르피린(hematoporphyrin) 유도체를 개발하여 식도암, 기관지암, 자궁경부암, 대장암 및 유방암의 치료를 시도하였다

[15]. 1960년도에 개발된 헤마토포르피린(hematoporphyrin) 유도체 포토프린(photofrin)은 1995년 식도암 치료제로서 FDA 승인을 받았고, 1999년 초기 비소세포폐암(early non-small-cell lung cancer) 치료제로 FAD 승인을 받았다[16]. 포토프린은 투여 후 종양조직에서 광역동치료 최적 농도에 도달하는 시간이 48시간 소요되고, 체내에 배출되는데 수 주일이 소요되기 때문에 일광손상을 예방하기 위해서는 수 주 동안 햇빛을 차단해야 한다[17].

1세대 광민감제는 빛에 의해 활성화율이 낮고, 빛을 조사하지 않았을 때 세포독성(dark toxicity)이 크며, 투여 후 몸에서 배출되는 시간이 길기 때문에 여러 가지 부작용을 안고 있어 이러한 문제점을 보완하기 위한 2세대 광민감제가 개발되었다[18]. 2세대 광민감제는 650nm 이상의 파장 광선조사로 활성화되고 광독성이 비교적 적으며, 몸에서 배출되는 시간이 포토프린보다 짧다[18].

2세대 광민감제는 5-아미노레블린산(5-aminolevulinic acid), 벤조포르피린(benzoporphyrin), 클로린(chlorin), 박테리오 클로린(bacteriochlorin), 메틸렌블루(methylene blue) 및 프탈로사이아닌(phthalocyanine) 등이 있다. 5-아미노레블린산은 포르피린의 전구체로서 투여 후 세포 내에서 포르피린으로 합성되어 효과를 나타내고, 벤조포르피린은 포르피린으로부터 개발된 제제이다[19]. 클로린은 엽록체(chloroplast)에 들어있는 헤모글로빈의 포르피린과 유사한 구조의 색소인 클로로필(chlorophyll)로부터 개발된 제제이고, 박테리오 클로린은 광합성이 일어나는 세균의 박테리오 클로로필(bacteriochlorophyll)로부터 개발된 제제이다[14].

2세대 광민감제가 1세대 광민감제에 비하여 상대적으로 독성이 적다고 하지만 여전히 독성이 높고 안정성이 낮기 때문에, 이를 더 보완한 3세대 광민감제를 개발하였다[20]. 3세대 광민감제는 조직 targeting을 높이기 위하여 2세대 광민감제를 특정 항체와 결합(conjugation)시키거나 안전성을 증가시키기 위해서 리포솜(liposome)이나 미셀(micelles)과 같은 운반 캡슐로 포장(encapsulation)하여 만들어진 제제이다[21]. 2세대에 비하여 안정성을 높이고, 목표로 하는 조직(target tissue)에 더 정확하게 광민감제를 보냄으로서 정상조직의 손상을 감소시킬 수 있게 되었다[20].

광역동치료의 효율성을 높이기 위해 리포솜이나 미셀 이외에도, 퀴텀 당

(quantum dot), 덴드리머(dendrimer), 폴리머(polymer), 자성 금(magnetic gold) 및 탄소 기반 나노 입자(carbon based nanoparticles) 등 다양한 캐리어 분자가 개발되고 있다[22].

4) 광선

광역동치료는 광민감제를 투여한 후 광선을 조사하여 이루어진다. 광선은 광민감제를 활성화시키는 역할을 하는데, 광민감제가 활성화되는 광선의 파장은 광민감제의 종류에 따라서 다르다. 일반적으로 광민감제는 최대 흡광계수를 나타내는 파장의 광선에 의해서 활성화가 잘 일어나며, 광선의 파장이 800nm 이상이 되면 에너지가 부족하여 광화학반응 유도가 잘 일어나지 않는다[23].

광역동요법에 의한 암 치료는 광민감제를 투여한 후 일정 시간이 경과되어 암 조직에 광민감제가 축적되면 알맞은 파장의 광선을 암 조직에 조사하여 광역동치료를 실시한다. 따라서 광역동치료에 이용되는 광선의 파장은 투여하는 광민감제의 종류에 따라서 달라질 수 있다. 광역동치료는 암 조직 내에 들어있는 광민감제를 활성화시킨 후 항암효과가 나타나기 때문에 조사한 광선이 암 조직 내로 침투를 해야 한다. 광선의 조직 침투력은 광선의 파장과 비례하기 때문에 긴 파장의 광선일수록 조직 침투력이 좋아서, 긴 파장 광선에 의해 활성화되는 광민감제가 항암 치료에 유리하다고 할 수 있다[23].

광역동치료에 처음 사용됐던 포르피린의 흡수 스펙트럼 파장은 400nm 근처와 650nm 근처에서 나타나는데, 400nm는 조직 침투력이 낮아서 광역동치료에 이용할 수 없고, 광역동치료에는 650nm 근처 파장의 광선이 이용된다[18].

광역동치료의 광원으로는 레이저나 비레이저가 이용되고 있고 최근에는 LED도 사용되고 있는데, 저출력의 간단한 반도체 레이저(diode laser)가 많이 이용되고 있으며, 광선의 침투력 제한을 해결하기 위한 방법으로 광섬유(optic fiber)나 내시경을 이용하여 광선을 신체 내 장기로 직접 전달하는 방법 등이 개발되고 있다[23].

광역동치료는 목적에 따라서 사용되는 광민감제의 종류가 다르고 이에 따라서 사용되는 광선의 광원이나 조사 방법이 다르기 때문에 광역동치료의 효율을 증가시키기 위한 광원의 종류나 조사 방법에 대한 많은 연구가 이루어

지고 있다[23].

5) 광역동치료에 의한 세포사멸(cell death)

광역동치료에 의한 세포사멸 기전은 세포 자멸사(Apoptosis), 자가포식(Autophagy) 및 면역적 효과(Immunologic effect) 등이 알려져 있다[25].

세포 자멸사는 다세포 생물체에서 볼 수 있는 세포예정사(Programmed cell death)의 일종으로 이 과정은 세포의 팽창과 균열, 세포막의 변화, 핵 단편화, 염색질 응축과 염색체 절단이 일어나고 최종적으로 손상 세포가 사멸된다[26]. 광역동치료에 의해서 세포사멸이 일어난다는 것은 1991년 Agarwal 등에서 생쥐 임파종 세포를 이용한 실험을 통해 처음 확인되었다[27].

미토콘드리아에 대한 광손상은 막 투과성을 증가시켜서 미토콘드리아 내에 있던 사이토크롬 C(Cytochrome C)를 세포질로 유리시켜서 세포 자멸사를 유도 할 수 있고(26), Bcl family는 미토콘드리아 막의 투과성을 낮춰 사이토크롬 c의 유출을 막음으로써 세포 자멸사를 막는 단백질인데, 광역동치료에 의해서 Bcl-2 및 Bcl-xL가 광손상으로 인하여 기능이 감소되면 세포 자멸사가 초래될 수 있다[28].

세포 자멸사의 증거인 DNA 손상은 광손상 후 매우 빠른 시간 내에 발생할 수 있는데, 림프종 세포에 광역동치료 후 수 분이 경과하면 게놈 DNA(Chromosomal DNA)의 손상이 나타나기 시작하며, 1시간 이내에 DNA 절단(DNA fragmentation)이 나타날 수 있다[27,28].

자가포식(Autophagy)이란 세포의 항상성과 기능 유지를 위해서 세포 내 소기관인 라이소좀(Lysosome)을 통해 변형된 단백질이나 손상된 소기관 등을 분해시키는 과정으로 자신의 불필요한 성분을 스스로 분해하여 보호하는 작용을 한다[30]. Kessel 등은 라이소좀이 광손상을 받으면 자가포식의 억제에 의한 세포 손상이 유도된다고 하여, 광역동치료에 의한 세포손상이 자가포식과 연관되어 있다고 하였다[31].

면역 체계는 암 발병, 진행 및 치료에 중추적인 역할을 하는데, 항암 치료에서 죽어가는 암세포와 면역 세포의 상호 작용이 암 치료 효율을 결정하는 중요한 요소라고 알려져 있다[32]. 광역동치료는 선천적 면역반응과 후천적 면역반응에 모두 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, 광역동치료에 의해서

종양 조직에 손상이나 산화 스트레스가 나타나면 급성 염증반응이 활성화되고, 광역동치료에 의해 유도된 면역원성 세포사(Immunogenic cell death)는 면역을 자극하는 손상 관련 물질(Damage-associated molecules)을 통해 항종양 면역을 활성화한다[33].

면역원성 세포 사멸은 선천적 및 후천적 면역 반응을 자극하여 장기면역기억(long-term immunological memory)을 생성하는 세포의 사멸이다[32]. 암세포의 면역원성(Immunogenicity)은 죽어가는 암세포의 항원성과 보조성에 의해 결정되는데, 종양 세포에 대한 면역반응은 종양 관련 항원과 항원 제시 세포의 활성화에 필요한 면역반응 보조물질이 작용하여 나타난다[32,34]. 손상 관련 물질이 세포에서 능동적으로 분비되거나, 수동적으로 세포 외로 방출되거나, 죽어가는 세포 표면에 노출되면 면역반응 보조물질의 작용으로 항원 제시 세포(Antigen presenting cells)가 활성화되어 임파구에 항원 제시를 촉진한다[32].

6) 실험목적

광역동요법은 광민감제를 투여한 후 광선을 조사하는 비침습적 치료방법으로 암의 종류나 병기에 관계없이 적용이 가능하다. 1976년 Kelly JF와 Snell ME는 방광암 환자에게 헤마토포르피린 유도체를 이용하여 광역동 암 치료 임상 적용 결과를 발표하였고[35], 1978년에 Dougherty는 헤마토포르피린 유도체를 이용한 임상 적용 결과 암 환자 113명 중 111명에서 부분적 또는 전체적으로 병변의 호전이 있었다고 하였다[36].

포토프린과 아미노레블린산 및 그 유도체를 광민감제로 사용하는 광역동치료는 악성 피부 종양의 치료에서 효과적이며[37], 구강, 인두 및 후두의 초기 암 치료에 이용하면 정상적인 조직과 언어 및 연하의 중요한 기능을 보존한다고 한다[38].

현재 다양한 광민감제가 광역동치료에 사용되고 있는데, 포토프린은 1993년 캐나다에서 방광암 치료에 대해 처음으로 승인을 받았고, 네덜란드, 프랑스 독일에서는 폐암 치료제로 승인받았다[39]. Copper 등은 다발성 원발성 두경부 종양에 광역동치료를 시행한 결과 병기 1기 환자는 치료 효율이 85%, 11/111기 환자는 치료율이 38%로 두경부 종양치료에 효과가 있다고 하였고

[40], 소화기계암, 전립선암, 방광암 등 비뇨기계암, 폐암, 뇌암 등 여러 가지 암의 치료에 대한 전임상 실험에서 항암효과가 있다고 한다[41].

자궁 경부암에 대한 광역동치료 실험은 주로 자궁경부암 세포주를 이용한 실험이 보고되어 있고, 세포주 중에서도 대부분 HeLa 세포주를 이용한 시험관 내 연구가 주로 수행되었다. Panzarini E 등[42]은 HeLa 세포주를 이용한 실험에서 Rose Bengal Acetate를 광민감제로 사용한 광역동치료 실험에서 광역동치료는 세포자살을 유도한다고 하였고, Li Z 등[43]은 아미노레블린산을 이용한 HeLa 세포주 실험에서 ER stress에 의해서 세포자살이 유도된다고 하였고, Li K 등[44]은 HeLa 세포주를 이용한 tumor-bearing mice 실험에서 silicon(IV) 프탈로사이아닌을 광민감제로 사용한 광역동치료 실험에서 광역동치료는 세포자살을 유도한다고 하였다. Bae SM 등[45]은 포토젬(Photogem)을 이용한 자궁경부암 세포주 CaSki, HT3, HeLa 및 SKOV-3 세포를 이용한 시험관 내 실험에서 광역동치료가 세포 손상을 유도된다고 했고, Oliveira PM 등[46]은 베르베린(berberine)을 광민감제로 이용한 CaSki 세포 시험에서 광역동치료가 세포 손상을 유도된다고 하여 자궁경부암에 대한 광역동치료 실험은 주로 세포주를 이용한 시험관 내 실험이 이루어지고 있다.

본 연구의 목적은 자궁경부암에 대한 광역동요법의 효과를 검증하기 위한 연구의 일환으로 자궁경부암세포주(CaSki cell) 생쥐 암모델(tumor bearing mouse model)을 만들어서 광민감제로 포토론을 사용하여 광역동치료를 실시하여 자궁경부암에 대한 광역동치료의 효과를 관찰하고자 한다.

생쥐 암 모델은 사람 자궁암 세포주(CaSki cells)를 생쥐(SCID/ICR mouse)에 주사하여 암종이 생성된 생쥐를 이용하였고, 광역동치료를 실시한 후 암종의 크기와 암 조직의 조직검사 및 생화학적 검사를 실시하여 광역동치료 효과를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에 사용된 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde), 자일렌(xylene), Protenase K, In Situ Cell Death Detection kit, Fluoroshield with DAPI kit, Antimycotic Solution (100×)과 Trypsin-EDTA Solution (10X)은 시그마알드리치코리아(서울, 한국)에서 구매하였고, 10% 태우혈청, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지, PBS(phosphate buffered saline, 인산염 완충액) 등은 Gibco BRL(NY, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 포토론(photolon)은 동성제약 연구부(서울, 한국)에서 기증받아 실험에 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 ICR 종 SCID 생쥐(6주령, 암컷)로서 중앙 실험동물(주)(Seoul, KOREA)에서 구매하였다. 실험동물의 사육환경은 명암주기 12시간, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 상대습도 $60 \pm 5\%$ 의 조건이 유지되는 환경이었고, 조선대학교 동물실험 윤리 위원회의 승인(승인번호: CIACUC 2019-A0034)을 받아 실험 윤리규정을 준수하여 동물실험을 진행하였다.

3) 세포배양

사람 자궁암 세포주(CaSki cell)는 한국 세포주은행(서울, 한국)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 사람 자궁암 세포는 10% 태우혈청과 Antimycotic solution을 함유한 RPMI 1640 배지를 사용하여, 37°C 로 유지되는 CO_2 배양기에서 배양하였다.

4) 생쥐 자궁암 모델(Cervical cancer bearing mouse model) 확립

ICR 종 SCID 생쥐를 구매하여 1주일 간 사육하여 환경에 적응시킨 후 암종을 유도하기 위한 동물로 사용하였다. 사람 자궁암 세포주(CaSki cell)를 배양한 후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집한 후 암세포를 인산염 완충액에 부유시켜 생쥐에 주사하였다. 생쥐의 등 쪽 털을 제모한 인산염 완충액에

부유된 자궁 암세포(CaSki cells : 5×10^5 cells/mouse)를 생쥐의 피하에 주사하였다. 암세포 주사 후 암종이 발생하는 것을 육안으로 관찰하고 암종의 크기를 디지털 캘리퍼(digital caliper, EDC 150, EX-power, 경북, Korea)로 측정하여 암종의 용적이 300-400 mm³ 인 것을 생쥐 자궁암 모델로 실험에 사용하였다. 암종의 용적(tumor volume)은 디지털 캘리퍼로 크기를 측정하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Tumor volume(mm}^3\text{)} = (\text{width}^2 \times \text{length})/2$$

5) 광역동치료 (Photodynamic therapy: PDT)

자궁암 모델(암종의 크기 300-400 mm³) 생쥐 10마리씩을 한 실험군으로 하였고, 실험군은 대조군, 레이저 80J/cm² 조사군 및 레이저 100J/cm² 조사군 등 3군으로 나누어 실험을 실시하였다. 레이저 80J/cm² 조사군과 레이저 100J/cm² 조사군에는 2mg 포토론을 200mL 생리식염수에 용해시켜서 포토론 용액(0.01mg/mL)을 만들어서 생쥐 체중 kg 당 포토론 5 mg(5 mg/kg BW) 용량을 생쥐 복강에 주사하였다.

포토론을 복강 주사하고 2시간 경과 후에 실험동물을 4% isoflurane을 사용하여 마취시킨 후 반도체 레이저 기기(UPL-PDT laser; BelOMO, Minsk, Belarus, $\lambda=660 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$)를 이용하여 파장 660nm 레이저 광선을 종양의 표면에 조사하였다. 이 때 레이저 조사량은 레이저 80J/cm² 조사군은 80J/cm² 을 조사하였고, 레이저 100J/cm² 조사군은 100J/cm² 을 조사하였다(Fig. 2). 종양에 레이저를 조사하고 24시간 경과 후 각 실험군 당 5 마리씩 경추탈골하여 희생시킨 후 종양을 절제하여 종양조직 일부는 H&E 염색과 TUNEL 분석 등 조직검사를 위한 시료로 사용하였고, 조직 일부는 Caspase-3, 8-OHdG, 및 지질과산화물량 측정을 위한 시료로 사용하였다. 각 실험군 당 5마리씩은 레이저 조사 후 시간 경과에 따라서 21일까지 암종의 상태를 관찰하고 디지털 캘리퍼를 이용하여 암종(tumor mass)의 크기를 측정하였으며 암종의 형태를 사진을 촬영하였다.



Fig. 2. A diode laser(660nm red light) is irradiated onto the tumor of the SCID/ICR mouse.

6) TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 분석

실험동물에서 채취한 암 조직은 즉시 4% 파라포름알데히드 용액에 고정시킨 후, 고정된 조직을 파라핀에 포매하고 4 μ m 두께로 절단하여 조직 절편을 만들었다. 조직절편은 슬라이드글라스에 붙인 후 자일렌(15분 2회)과 에탄올(100%, 95%, 85%, 70%, 50% 각각 5분)에 넣어 파라핀을 제거하였다. 파라핀이 제거된 조직 절편 중 일부는 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 일부는 TUNEL 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

TUNEL analysis는 *In Situ* Cell Death Detection kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 manufacturer's instructions에 따라서 실시하였다. 간단히 설명하면, 4 μ m 두께의 파라핀 포매 조직의 절편을 슬라이드글라스에 붙인 후 자일렌과 에탄올을 처리하여 파라핀을 제거한 후 proteinase K (proteinase K 20 μ g/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)를 처리한 후 TUNEL reaction mixture에서 반응시켰다. PBS로 세척한 후 조직장착배지 (Fluoroshield with DAPI; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 도포하고 커버글라스로 덮은 다음 형광현미경(EVOS Digital Color Fluorescence Microscope; Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

7) 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) 측정

조직 내 8-OHdG 량은 8-OHdG ELISA kit (Arigobio, Hsinchu, Taiwan)를 사용하여 제조사의 측정방법(manufacturer's instructions)에 따라 측정하였다. 간단하게 설명하면 암 조직을 정량하여 10배(w/v)의 균질화 용액(homogenization buffer; 0.1M PBS, pH 7.4)를 첨가한 후 호모겐나이저(polytron-homogenizer; Thomas Scientific, Gloucester County, NJ, USA)로 균질화시킨 다음 원심분리하여 상층액을 8-OHdG 측정시료로 사용하였다. 상층액 200 μ L를 취해서 G-spin Total DNA Extraction kit(iNtRON, 성남, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하고, Nuclease P1(NEB, Ipswich, MA, USA)를 첨가하여 처리한 후 8-OHdG 정량 시료로 사용하였다. 시료 50 μ L를 96 well plate에 넣고 HRP-conjugated 8-OHdG antibody를 반응시킨 후 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 8-OHdG를 정량하였다.

8) 종양조직 지질과산화물량 측정

종양조직의 지질과산화물량은 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)량으로 측정하였다. 암 조직을 정량하여 10배(w/v)의 균질화 용액(homogenization buffer; 0.1M PBS, pH 7.4)를 첨가한 후 호모겐나이저(polytron-homogenizer; Thomas Scientific, Gloucester County, NJ, USA)로 균질화시킨 후 TBARS량 측정을 위한 시료로 이용하였다. TBARS량은 OxiSelect™ TBARS Assay Kit(고마바이오택(주), 서울, Korea)을 이용하여 제조사의 측정 방법에 따라서 측정하였다.

9) Caspase 3 활성도 측정

조직 내 Caspase-3 활성도는 Caspase 3 Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich, CASP3C-1KT)를 사용하여 제조사의 방법(manufacturer's instructions)에 따라 측정하였다. 간단하게 설명하면 암 조직을 정량하여 10배(w/v)의 균질화 용액(homogenization buffer; 0.1M PBS, pH 7.4)를 첨가

한 후 호모겐나이저(polytron-homogenizer; Thomas Scientific, Gloucester County, NJ, USA)로 균질화시킨 다음 원심분리하여 상층액을 Caspase-3 측정 시료로 사용하였다. 시료 50 μ L를 96 well plate에 넣고 10분간 반응시켜 Caspase-3 가 Ac-DEVD-pNA를 분해하여 유리되는 p-nitroaniline (pNA) 량을 450 nm에서 흡광도를 측정하여 pNA의 흡광계수($\epsilon_{mM} = 10.5$)로 계산하여 표시하였다.

10) 통계처리

모든 측정 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였고, 실험결과 분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결 과

1) 광역동치료 후 생쥐 자궁암의 변화

생쥐 자궁암모델을 이용하여 포토론을 주사한 뒤 광역동치료 후 21일 경과한 종양의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

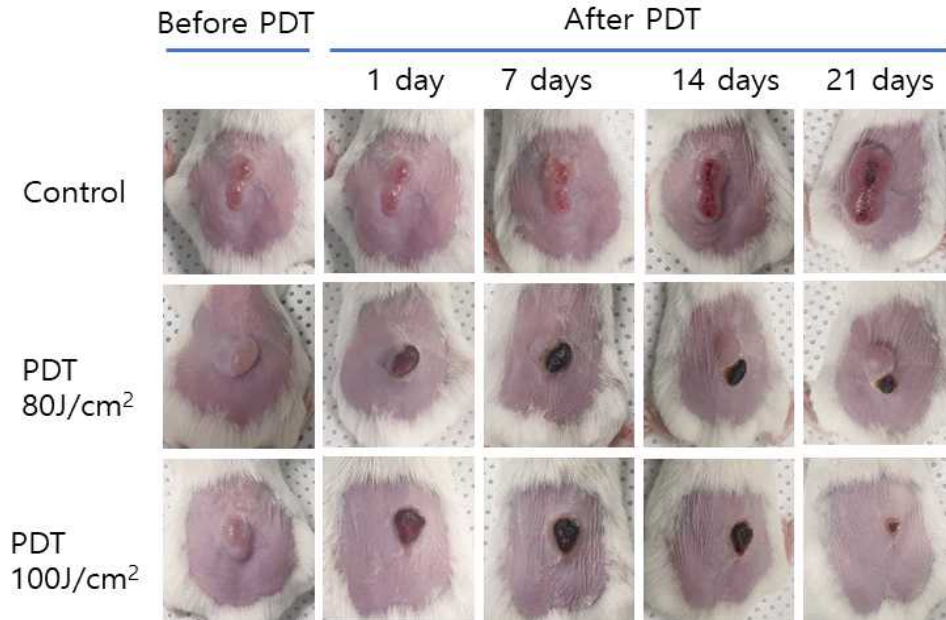


Fig 3. Photograph of CaSki cancer bearing mice after photodynamic therapy with photolon(5mg/Kg) and diode laser irradiation(660nm).

종양의 육안적 형태는 대조군에서 21일까지 종양의 크기는 지속적으로 증가되는 것으로 보였고, 14일에는 종양의 중앙부위 피부 색깔이 검게 변하면서 괴사가 일어난 것으로 보였고, 21일에는 종양 중앙부 색이 검게 변하고 일부 피부가 떨어져 나가서 괴사 부위가 더 커졌다. 광역동치료 80J/cm² 군은 치료 1일 후 종양표면 피부가 검게 변화되었고, 7일 경과시는 종양 중앙부위가 괴사되고 표면이 함몰되고 가피가 형성되었으며, 14일 경과시에는 기존 종양부위는 수축이 일어났으나 주변 부위에서 종양이 다시 관찰되었고, 21일에는 종양의 크기가 증가되어 종양이 성장하고 있음을 보여주고 있다. 광역동치료 100J/cm² 군은 치료 1일 후 종양표면 피부가 검은색으로 변화되

었고, 7일 경과시는 종양 중앙부위가 괴사되고 가피가 형성되었으며, 14일 경과시에는 기존 종양 부위 수축이 일어나 크기가 감소하였고, 21일에는 기존 종양 부위에 형성된 가피가 떨어져 나가 종양이 육안으로 관찰되지 않았다.

생쥐 자궁암모델을 이용하여 포토론을 주사한 뒤 광역동치료 후 21일 경과한 종양의 용적을 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다.

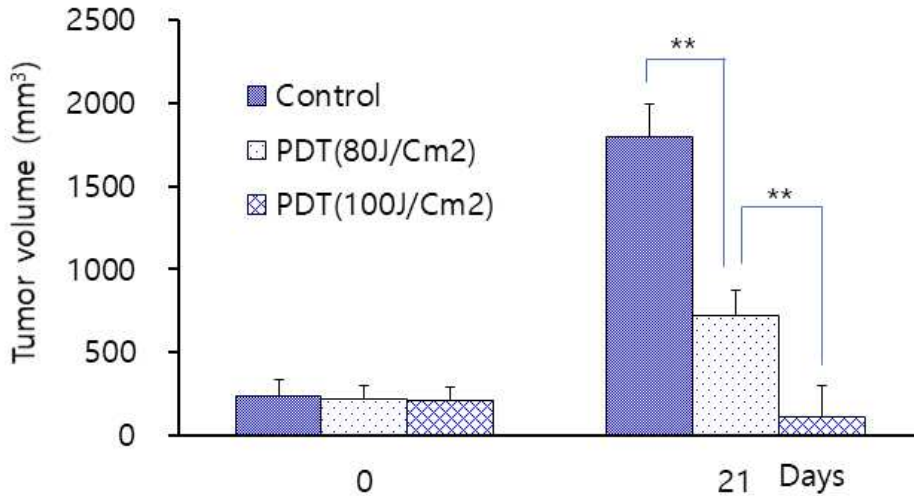


Fig. 4. Effects of PDT on tumor volume of CaSki cancer bearing mouse. Values are mean ± D, n=5. ** : p<0.01.

종양 용적은 대조군에서 레이저조사 직전인 0일과 조사 후 21일에 각각 238 ± 95 과 $1797 \pm 197 \text{ mm}^3$ 을 각각 나타내서 실험 시작할 때와 비교하여 21일 경과 시에 종양의 용적은 655%가 증가되어 대조군에서 종양이 지속적으로 증가됨을 알 수 있다.

광역동치료 80 J/cm^2 군의 종양 용적은 레이저조사 직전인 0일과 레이저 조사 후 21일에 각각 217 ± 85 과 $720 \pm 151 \text{ mm}^3$ 을 각각 나타내서 레이저 조사전에 비교하여 레이저 조사 21일 경과시에 종양의 용적은 213%가 증가되어 종양이 성장하고 있음을 알 수 있다.

광역동치료 100 J/cm^2 군의 종양 용적은 레이저조사 직전인 0일과 레이저조사 후 21일에 각각 208 ± 79 과 $107 \pm 120 \text{ mm}^3$ 을 각각 나타내서 레이저 조사전

에 비교하여 레이저 조사 21일 경과 시에 종양의 용적은 48%가 감소되어 종양이 사멸되고 있음을 알 수 있었다.

2) 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice 종양의 조직학적 변화

CaSki cancer bearing mice에 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양조직을 H&E 염색하여 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

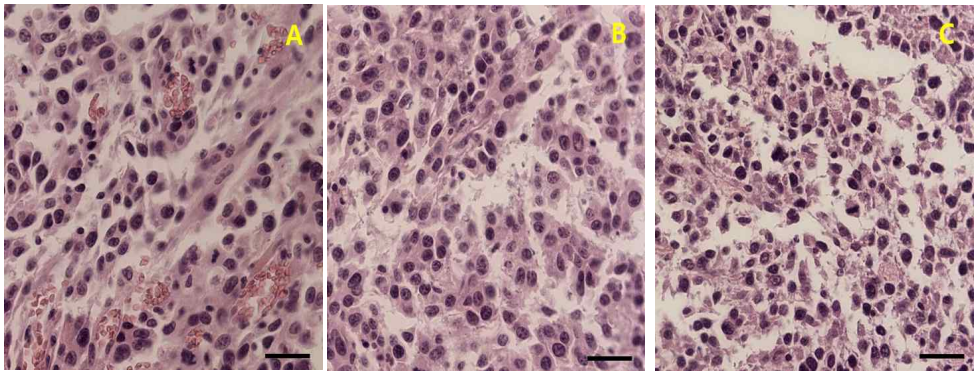


Fig. 5. H&E staining Images of tumor tissue of CaSki cancer bearing mice at 24 hrs after PDT.

A: control group, B: PDT($80\text{J}/\text{cm}^2$) group, C: PDT($100\text{J}/\text{cm}^2$) group.
($\times 400$ magnification and Scale bars= $400\ \mu\text{m}$).

대조군 생쥐의 종양 조직 광학 현미경 관찰 소견은 암세포는 핵의 크기나 모양이 다양한 모습을 보였고, 세포 형태나 크기도 다양하게 나타났다. 광역동치료 $80\text{J}/\text{cm}^2$ 군의 종양 조직에서는 세포핵의 형태가 불규칙적(irregular nucleus)이고, 핵의 경계가 명확하지 않은 세포가 나타났으며, 세포질의 형태가 불규칙적이고, 세포질의 염색밀도가 균일하지 않게 나타났다. 광역동치료 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 군의 종양 조직에서는 세포핵의 형태가 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 군보다 더 불규칙적이고, 핵의 경계가 명확하지 않은 세포가 많으며, 세포질이 매우 적은 세포가 많이 관찰되었다.

CaSki cancer bearing mice에 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양조직을 TUNEL 염색하여 형광 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 6 및 Fig. 7과 같다.

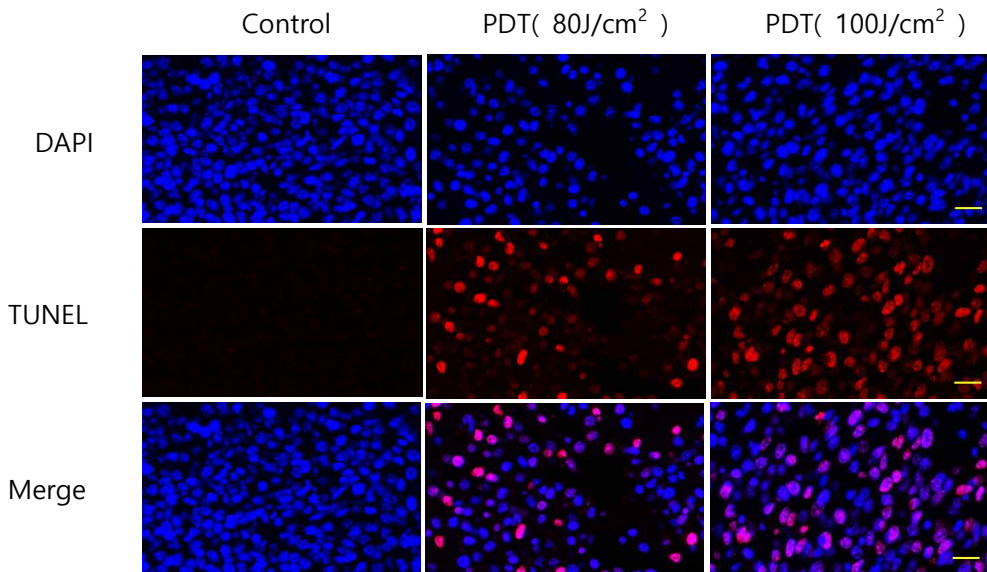


Fig. 6. TUNEL images of tumor tissue of CaSki cancer bearing mice at 24 hours after PDT. DAPI : 6-diamidino-2-phenylindole. ($\times 400$ magnification and Scale bars=400 μm).

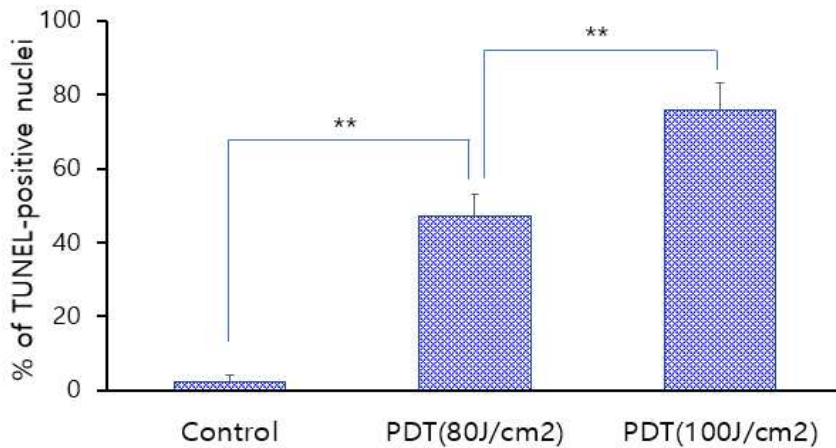


Fig. 7. The effects of PDT on TUNEL-positive nuclei content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse. TUNEL-positive nuclei are quantified as the percent of total counted nuclei in random fields. Values are mean \pm D, n=5. ** : $p < 0.01$.

대조군의 종양조직에서 DAPI 염색된 세포핵은 많은 수가 관찰되었으나, TUNEL 염색된 세포핵이 거의 관찰되지 않았다. 광역동치료 80J/cm² 군의 종양 조직에서 TUNEL 염색된 세포핵이 관찰되어 DAPI 염색된 핵의 수에 대한 TUNEL 염색된 핵의 수 비율이 47.2 %를 나타내었다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직에서 TUNEL 염색된 세포핵의 수가 PDT군 보다 더 많이 관찰되었는데, DAPI 염색된 핵의 수에 대한 TUNEL 염색된 핵의 수 비율이 75.9% 를 나타내서 TUNEL positive cells 비율은 80J/cm² 군보다 28%가 더 높았다.

3) 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 8-OHdG 량의 변화

CaSki cancer bearing mice에 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직 8-OHdG 량을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다.

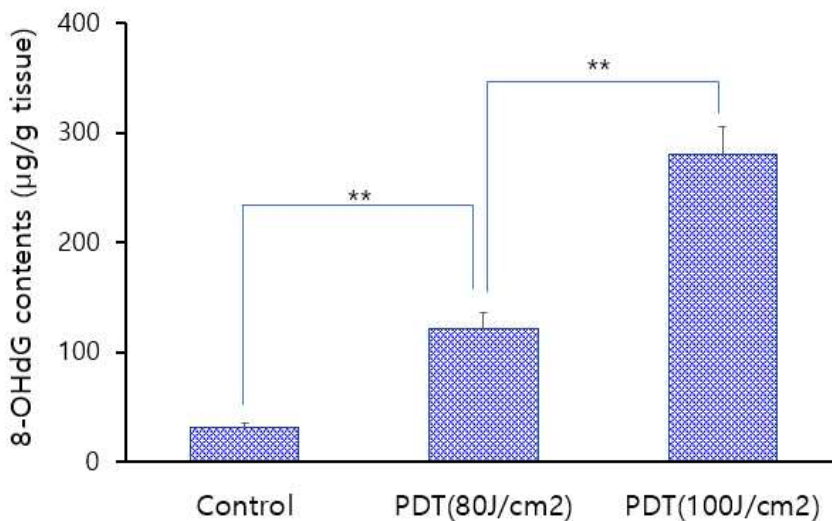


Fig. 8. The effects of PDT on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse.

Values are mean ± D, n=5. **: p<0.01.

대조군의 종양 조직 8-OHdG 함량은 31.4±4.1µg/g tissue 로 나타났고, 광역동치료 80J/Cm² 군의 종양 조직 8-OHdG 함량은 120.9±15.8µg/g tissue

로 나타나서 대조군보다 8-OHdG 함량이 287% 가 증가되어 PDT 시행으로 종양 세포의 DNA에 산화적 손상이 증가됨을 보여주었다.

광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 8-OHdG 함량은 280.9±25.1μg/g tissue 로 광역동치료 80J/cm² 군보다 133%가 증가되어 암세포 DNA의 산화적 손상이 더 증가되었다.

4) 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 TBARS 량의 변화

CaSki cancer bearing mice에 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직 TBARS 량을 측정한 결과는 Fig. 9와 같다.

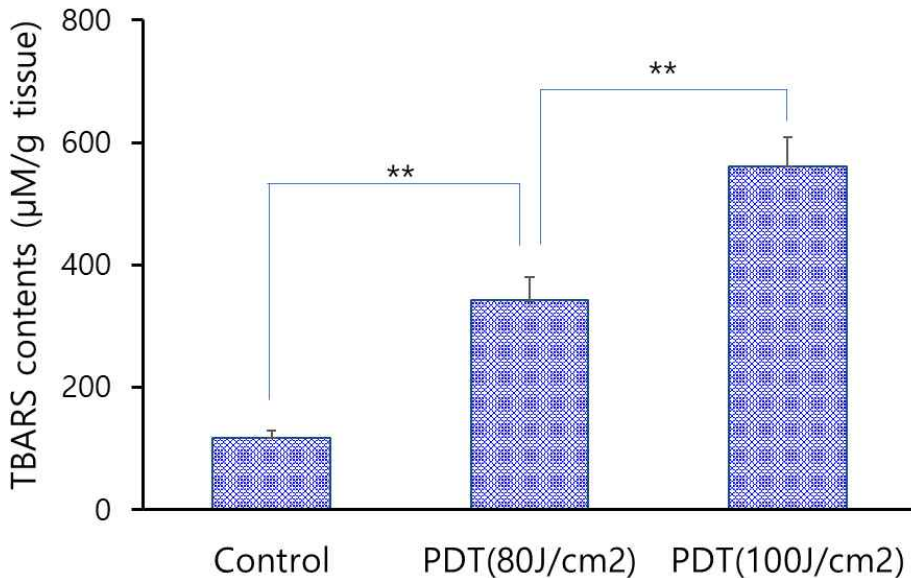


Fig. 9. The effects of PDT on TBARS content in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse. Values are mean±D, n=5. **: p<0.01.

대조군의 종양 조직 TBARS 함량은 117.2±11.3μM/g tissue 로 나타났고, 광역동치료 80J/cm² 군의 종양 조직 TBARS 함량은 342.5±37.1μM/g tissue 로 나타나서 대조군보다 TBARS 함량이 192%가 증가되어 PDT 시행으로 종양세

포 지질의 산화적 손상이 증가됨을 보여주고 있다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 TBARS 함량은 561.8±47.5 μM/g tissue로 광역동치료 80J/cm² 군보다 64%가 증가되어 암세포 지질 과산화물이 더 증가되었다.

5) 광역동치료 시행 후 CaSki cancer bearing mice의 종양 조직 Caspase-3 활성도 변화

CaSki cancer bearing mice에 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직 Caspase-3 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 10과 같다.

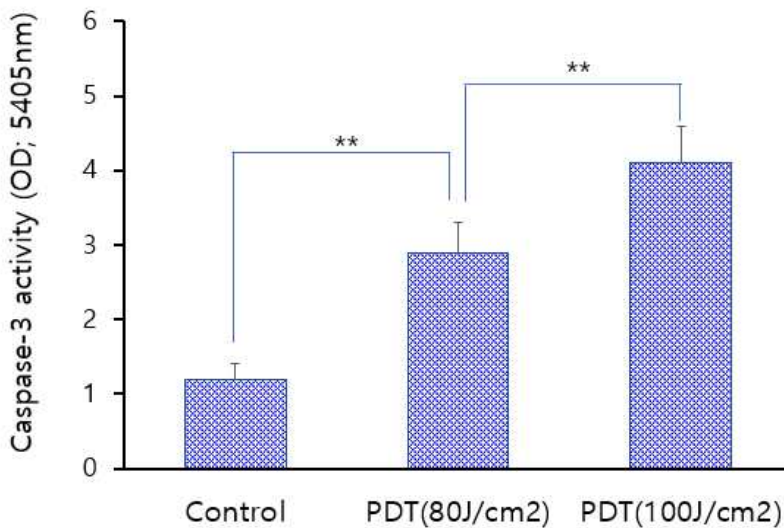


Fig. 10. The effects of PDT on Caspase-3 activity in tumor tissue of CaSki cancer bearing mouse. Values are mean±D, n=5. **: p<0.01.

대조군의 종양 조직 Caspase-3 활성도는 1.2±0.2 로 나타났고, 광역동치료 80J/cm² 군의 종양 조직 Caspase-3 활성도는 2.9±0.4 로 나타나서 대조군보다 Caspase-3 활성도가 141% 가 증가되어 PDT 시행으로 종양세포의 세포 자멸사가 증가됨을 보여주고 있다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 Caspase-3 활성도는 4.1±0.5 로 광역동치료 80J/cm² 군보다 41%가 증가되어 암세포 자멸사가 더 증가되었다.

4. 고 찰

본 연구는 자궁경부암에 대한 광역동치료 효과를 관찰하기 위하여 CaSki cancer bearing mouse에 포토론을 투여하고 2시간 후에 레이저 광선(파장 660nm)을 $80\text{J}/\text{cm}^2$ 와 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 을 각각 조사하여 광역동치료를 실시한 결과 레이저 광선 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 조사한 군에서 항암효과가 더 큰 것으로 나타났다.

CaSki 세포주는 1974년에 Patillo 등[47]이 확립한 사람 자궁경부암 세포주(squamous cell carcinomas)로서, 본 실험에서 배양한 CaSki 세포를 ICR/SCID mouse에 주사하여 암종(tumor)이 생성된 마우스를 CaSki cancer bearing mouse로 이용하였다.

본 실험에 사용된 광민감제 포토론은 엽록소에서 유래한 클로린 계열의 2세대 광민감제인데, 엽록소는 광합성이 일어나는 식물, 박테리아 및 조류(algae)의 세포내 엽록체(chloroplast)에서 발견되는 색소로서 포르피린과 유사한 구조로 되어 있다[16].

클로린 e6(Ce6)는 1994년 개발되어 암 치료에 사용된 광민감제인데, 물에 녹지 않아서 수용성 물질인 polyvinylpyrrolidone(PVP)과 중합시켜서 수용성 제제로 개발된 것이 포토론(Ce6-PVP)(Fig. 11.)이다[48]. 포토론은 정맥주사가 가능하고 주사 후 암 조직에 최고 농도에 도달하는 시간이 2시간 정도로 짧으며, 주사 후 12시간 정도 지나면 체외로 배출되기 때문에 광역동치료 후 일상복귀 시간을 단축시킬 수 있다[48].

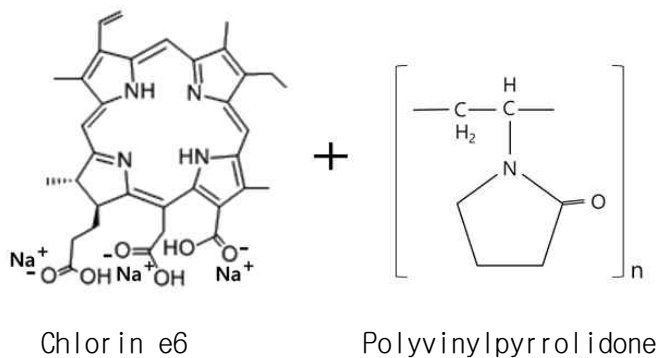


Fig. 11. Chemical structure of the Photolon.

광민감제는 광선을 조사하여 활성화시키는데, 이때 광민감제가 활성화되는 광선의 파장은 최대 흡광계수를 나타내는 파장에서 잘 일어나며, 현재 사용되는 광민감제의 대부분은 흡광계수가 적색-근적외선 영역(600-850 nm)이다 [16]. 광민감제는 투여 후 암 조직에 축적되면 암 조직에 침투된 광선에 의해서 광민감제가 활성화되며 광선의 암 조직 침투력은 파장이 길수록 증가한다[48].

광민감제인 포르피린의 흡수 스펙트럼은 400 nm 근처와 650 nm 근처에서 나타나는데, 400 nm는 파장이 짧아서 조직 침투력이 거의 없기 때문에 적색인 650 nm 근처 파장을 광역동치료에 이용하였다[48]. 본 실험에 사용한 포토론의 활성화 파장은 660 nm로 포르피린 계열보다 파장이 더 길어서 조직 침투력이 더 크기 때문에 포르피린보다 더 심부의 암에도 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

Cancer bearing animal model은 배양 암세포를 실험동물에 주사하여 종양이 유발된 동물 모델로서 암에 대한 In vivo 실험에 이용되고 있는데, 본 실험에서 CaSki cancer bearing mouse에 생성된 종양을 육안으로 관찰한 소견은 대조군에서 21일까지 지속적으로 종양의 크기가 증가되어 암종 내 암세포의 성장이 계속됨을 보여주고 있다.

광역동치료 80J/cm² 군은 치료 1일 후 종양표면 피부의 색이 검게 변화되었고, 7일 경과 시는 종양 중앙부위에 가피가 형성되었으며, 14일 경과시에는 종양 부위는 가피의 수축이 일어나고 주변 부위에서 종양이 다시 관찰되었고, 21일에는 종양이 다시 성장하여 광역동치료에 의한 종양 세포의 사멸이 일어났으나 일부 암세포가 생존하여 다시 성장한 것으로 추측된다. 광역동치료 100J/Cm² 군의 1일과 7일 육안소견은 광역동치료 80J/Cm² 군과 유사하였고, 14일 경과 시에는 종양 부위에 생긴 가피의 위축이 일어나 크기가 감소하였으며, 21일에는 기존 종양 부위에 형성된 가피가 떨어져 나가고 종양은 육안으로 관찰되지 않아서 광역동요법에 의해서 종양세포가 모두 사멸된 것으로 추측된다.

광역동치료가 종양 세포에 미치는 영향을 조직학적으로 관찰하기 위하여 광역동치료 24시간 경과 후 H&E 염색한 종양 조직의 광학현미경 소견은 광역동치료 80J/cm² 군은 핵의 형태가 매우 불규칙적이었고, 핵막이 부분적으로

보이지 않는 세포가 관찰되었으며, 광역동치료 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 군은 핵의 형태가 매우 불규칙적이거나, 핵막이 부분적으로 보이지 않는 세포의 수가 광역동치료 $80\text{J}/\text{cm}^2$ 군보다 더 많았다. 세포핵의 형태와 세포 에너지량은 상호연관되어 있으며, 세포 내 에너지가 감소되면 세포핵의 형태가 불규칙적으로 변화되는 것으로 알려져 있는데[49], 본 실험에서 광역동치료 $80\text{J}/\text{cm}^2$ 군의 암조직에서 핵의 모양이 변화되어 불규칙적인 형태로 나타나서 암세포가 손상을 받아 에너지량이 감소되어 나타난 결과로 생각된다. 또한 광역동치료 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 군에서 세포핵 형태의 변화가 광역동치료 $80\text{J}/\text{cm}^2$ 군보다 더 크기 때문에 세포의 손상도 광역동치료 $100\text{J}/\text{cm}^2$ 군이 더 클 것으로 생각된다.

세포 자멸사가 일어날 때 핵막에서 작은 주머니 모양(bleb)이 만들어 지면서 핵막의 손상이 일어나는데[50], 본 실험에서 광역동치료군에서 핵막이 부분적으로 보이지 않는 세포나 핵의 형태가 변화된 세포는 핵막의 손상과 연관이 있을 것으로 생각되므로 광역동치료군에서 세포손상은 세포 자멸사와 연관이 있을 것으로 추측된다.

광민감제가 활성화되면 광감작반응에 의해서 반응성 산소를 생성하고, 반응성 산소는 단백질 구성 아미노산 중 트립토판, 티로신, 히스티딘, 시스테인 및 메티오닌 등과 반응하고, 지질인 불포화지방산이나 콜레스테롤과 반응하며, 핵산의 구아닌과 반응할 수 있다[51].

따라서 광역동치료는 광감작반응으로 생성된 반응성 산소가 주위의 단백질, 지질 및 핵산에 작용해 이들 물질을 산화시킴으로서 치료 효과가 나타난다[12]. 반응성 산소가 DNA에 작용하여 DNA 염기산화(DNA base oxidation), 이중 및 단일 가닥 파손(double- and single-strand breaks), 가닥 내 및 가닥 간 가교(intra- and interstrand cross links) 및 무염기 부위(abasic sites)등 다양한 유형의 산화 DNA 손상이 유발될 수 있다[52]. 반응성 산소가 염색체 DNA 작용하여 이중 및 단일 가닥 파손이 일어나면 염색체 DNA 단편화(chromosomal DNA fragmentation)을 유발할 수 있는데, 염색체 DNA 단편화가 일어난 세포는 세포자멸사가 유발될 수 있다[53].

TUNEL 검사는 염색체 DNA 손상을 검사하는 방법으로서 세포의 핵에 들어있는 DNA 가닥(DNA strand)이 절단되어 있으며 TUNEL 반응에 의해서 표지된 물질의 형광이 관찰되기 때문에 TUNEL positive cells 이라고 하며 TUNEL

positive cells 은 세포 자멸사와 연관이 있어서 TUNEL 검사를 세포자멸사 검사법으로도 이용하고 있다[54].

본 실험에서 광역동치료 24시간 경과 후 암 조직을 절제하여 TUNEL 염색을 시행하여 관찰한 결과 TUNEL positive cells 비율이 광역동치료 80J/cm² 군은 47.2%, 광역동치료 100J/cm² 군은 75.9%를 나타내서 광역동치료 시행으로 DNA 가닥의 손상이 나타나며, 광역동치료 100J/cm² 군의 TUNEL positive cells 비율이 광역동치료 80J/cm² 군보다 더 커서 DNA 가닥 손상도 광역동치료 100J/cm² 군이 더 큰 것으로 생각된다.

Mai NNH 등[55]은 Human biliary cancer cell line(NOZ)에서 광민감제 phosphorus tetraphenylporphyrin를 이용한 실험에서 PDT 후 24시간에 TUNEL positive cells 수가 64.2% 증가된다고 하였고, Lin C 등[56]은 사람 폐암세포주 A549 cell와 광민감제 헤마토포르피린 유도체를 이용한 광역동치료 후 TUNEL positive cells 수가 증가된다고 하여 본 실험에서 광역동치료 후 TUNEL positive cells 수가 증가된 결과와 유사하다.

DNA에 들어있는 염기(base)는 반응성 산소가 작용하면 산화될 수 있는데, DNA를 구성하는 염기 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 시토신(cytosine) 및 티민(thymine) 중에서 구아닌이 다른 염기보다 산화가 더 잘 일어나며 [57], 구아닌의 산화 산물인 8-하이드록시-2'-데옥시구아노신(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG)은 산화적 DNA 손상에 대해 표지자로 가장 널리 사용되고 있다[11].

최근 소변, 혈액, 조직 및 타액에서 8-oxoG 및 8-oxodG 량을 측정하여 인체의 산화스트레스에 대한 전반적인 영향을 평가 지표로 이용하거나, 자가면역 질환, 염증, 신경변성 질환, 심혈관 질환, 당뇨병, 암 및 기타 연령 관련 질환 등의 발병 가능성, 진단 및 치료에 대한 반응 평가에 대한 지표로 이용하고 있다[58].

본 실험에서 광역동치료 24시간 후 광역동치료 80J/cm² 군 종양 조직 8-OHdG 함량은 대조군에 비하여 287%가 증가되었고, 광역동치료 100J/cm² 군 종양 조직 8-OHdG 함량은 광역동치료 80J/cm² 군보다 133%가 증가되었다. 이는 종양 조직 8-OHdG 함량의 증가는 종양조직의 세포 DNA에 산화적 손상이 더 증가되어 나타난 결과로 추측되며, 종양조직 8-OHdG 함량이 광역동치료

80J/cm² 군보다 광역동치료 100J/cm² 군에서 더 증가되어 종양조직에 조사하는 광선의 양을 증가시키면 반응성 산소량이 증가되어 DNA의 산화적 손상도 증가한 것으로 추측된다.

반응성 산소는 세포막 지질에 작용하여 산화적 손상(oxidative stress)에 의해서 지질과산화를 유발할 수 있는데, 지질과산화가 일어난 세포는 세포막 기능 장애로 인하여 세포사멸을 초래할 수 있다[59].

지질과산화는 반응성산소가 불포화 지방산에 작용하여 일어나는 유리기 연쇄 반응에 의해 진행되며 생성물로 malondialdehyde 등과 같은 지질과산화물이 생성되며, 개시(initiation), 전파(propagation) 및 종료(termination)의 세 가지 단계로 이루어진다[59](Fig. 12.).

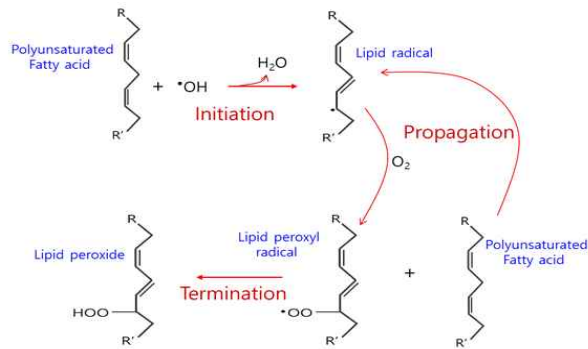


Fig. 12. Mechanism of lipid peroxidation.

개시는 반응성 산소와 불포화 지방산이 반응하여 지방산 라디칼(lipid radicals)가 생성되는 단계이며, 전파는 지방산 라디칼에 산소가 반응하여 퍼옥시 지방산 라디칼(peroxy lipid radicals)을 생성하고, 퍼옥시 지방산 라디칼은 불포화 지방산에 작용하여 지방산 라디칼을 형성하고 자신은 지질과산화물로 전환된다. 지방산 라디칼은 다시 지방산화 과정이 반복될 수 있는데, 항산화 물질에 의해서 지방산 라디칼을 제거하면 지방산 산화 연쇄반응이 종료된다.

세포막 지질의 과산화는 막 유동성, 지질-지질 및 지질-단백질 상호작용, 막 투과성, 이온 및 영양소 수송, 신호 전달 경로 등을 변화시켜서 결국 세포사멸을 유도하게 된다[60].

본 실험에서 광역동치료 24시간 후 광역동치료 80J/cm² 군 종양 조직 지질 과산화 산물인 TBARS 함량은 대조군에 비하여 증가하였고, 광역동치료 100J/cm² 군 종양 조직 TBARS 함량은 광역동치료 80J/cm² 군보다 46%가 증가하였다. 이는 종양 조직 TBARS 함량의 증가는 산화적 세포막손상이 증가되어 나타난 결과로 추측되며, 종양조직 TBARS 함량이 광역동치료 80J/cm² 군보다 광역동치료 100J/cm² 군에서 더 증가하고 종양 조직에 조사하는 광선의 량을 증가시키면 반응성 산소량이 증가되어 세포막 지질의 산화적 손상도 증가한 것으로 추측된다.

세포자멸사는 여러 가지 카스파제들이 순서대로 절단되어 활성화되는 신호 전달 과정을 거쳐 최종적으로 chromatin의 절단, 세포막 bleb의 형성, apoptotic body 형성 등의 형태학적 특징을 보이며 세포가 사멸하는 현상이다[26]. 세포자멸사는 자외선이나 감마선, 화학물질, 바이러스감염, 영양결핍, 산소결핍, 암유발유전자 발현 등의 스트레스에 의해 발생하는 내재적 세포자멸사(intrinsic apoptosis)와 death 수용체(TNF 수용체, FAS, TRAIL 수용체)를 자극하는 tumor necrosis factor(TNF α), FAS, TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) 등의 사이토카인이 유도하는 외재적 세포자멸사(extrinsic apoptosis)로 구분할 수 있으며, 두 가지가 모두 궁극적으로는 caspase라는 세포 내 단백질 분해효소의 활성화를 통해 세포사멸을 유도한다[26].

카스파제(caspase)는 시스테인 프로테아제(cystein proteinase)의 한 종류로서 세포 자멸사에 관여하는 카스파제는 caspases-3, -6, -7, -8, -9 및 -10 등이 알려져 있는데, caspases-8, -9 및 -10의 활성화가 일어나면 이들은 궁극적으로 caspases-3, -6 및 -7을 활성화시켜서 세포 자멸사가 일어난다[61].

Caspase-3은 세포 자멸사를 종결하는 효소로서 염색체 응축(chromatin condensation)이나 DNA 분절(DNA fragmentation) 및 막 bleb을 유도할 수 있는데, 본 실험에서 종양조직 Caspase-3 활성도를 측정한 결과 광역동치료 24시간 후 광역동치료 80J/cm² 군 종양 조직에서 카스파제 활성도는 대조군에 비하여 141%가 증가되었고, 광역동치료 100J/cm² 군 종양 조직 Caspase-3 활성도는 광역동치료 80J/cm² 군보다 41%가 증가되어, 광역동치료 시행으로

종양 조직 Caspase-3 활성도가 증가되어 종양 조직 세포의 세포 자멸사가 증가 될 것으로 추측된다. 종양조직 카스파제 3 활성도가 광역동치료 80J/cm² 군보다 광역동치료 100J/cm² 군에서 더 증가되어 종양 조직에 조사하는 광선의 양 증가에 따라서 Caspase-3 활성도가 증가되어 광선 조사량을 증가시키면 세포 자멸사가 증가 되어 항암 치료 효과도 증가될 것으로 추측된다.

이상의 실험결과, 사람 자궁경부암 세포주를 이용한 동물실험 모델인 CaSki cancer bearing mouse model에서 광민감제 포토론을 이용한 광역동치료를 실시한 뒤 종양의 용적이 감소되었고, 종양조직 세포의 H&E 염색 광학 현미경 소견에서 세포핵의 형태가 불규칙했으며, TUNEL 염색 소견에서 TUNEL positive cell이 증가하였고, 종양조직에서의 DNA의 산화적 손상 산물인 8-OHdG량이 증가하였고, 지질과산화 산물인 TBARS량이 증가되었으며, 종양조직 Caspase 3 활성이 증가되었다. TUNEL positive cell과 8-OHdG은 DNA의 산화적 손상에 의해서 증가될 수 있고, TBARS 량은 막지질의 산화적 손상에 의해서 증가 될 수 있기 때문에 광역동치료 종양조직에서 TUNEL positive cell, 8-OHdG 및 TBARS 량의 증가는 활성화된 포토론이 광화학반응에 의해서 반응성 산소량을 증가시켜서 나타난 결과로 추측된다. 또한 Caspase-3 활성이 증가되면 염색체 응축(chromatin condensation)이나 DNA 분절(DNA fragmentation) 및 막 bleb을 유도하여 세포핵의 형태 변화가 일어나고 세포 자연사가 유도될 것으로 추측된다. 따라서 본 실험에서 CaSki cancer bearing mouse model에서 광민감제 포토론을 이용한 광역동치료를 실시한 결과 종양의 용적이 감소된 것은 광화학 반응으로 생성된 반응성 산소량과 DNA와 세포막에 산화적 손상을 유도하면 미토콘드리아 막의 기능 저하로 Cytochrome C 가 유리되어 이에 의한 내재적 세포자멸사 경로가 활성화되어 Caspase-3가 활성화되어 이에 의해서 염색체 응축(chromatin condensation)이나 DNA 분절(DNA fragmentation) 및 막 bleb이 일어나서 세포 사멸이 유도되는 것으로 생각된다. 포토론과 CaSki cancer bearing mouse model을 이용한 광역동치료법은 임상적 암 치료에 적용하기 위한 전임상 단계의 실험 모델로서 암 치료 연구분야에서 매우 유용하게 이용될 수 있기 때문에 임상적 암 치료법에 적용하기 위해서는 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

5. 결 론

광역동요법은 광민감제를 투여한 후 광선을 조사하는 비침습적 치료방법으로 암의 종류나 병기에 관계없이 적용 가능하기 때문에 다양한 광민감제를 이용한 광역동치료법이 여러 가지 암 치료에 시도되고 있다. 자궁 경부암에 대한 광역동치료 실험은 대부분 자궁경부암 세포주를 이용한 시험관 내 실험이 주로 수행되었다.

본 연구는 사람 자궁 경부암세포주(CaSki cell) 생쥐 암모델(tumor bearing mouse model)을 만들어서 광민감제로 포토론을 사용하여 광역동치료를 실시하여 자궁 경부암에 대한 광역동치료의 효과를 관찰하고자 하였다.

사람 자궁암 세포주(CaSki cells)를 배양하여 생쥐(SCID/ICR mouse)에 주사하여 암종이 생성된 생쥐를 생쥐 암 모델(CaSki cancer bearing mouse model)로 이용하였다.

CaSki cancer bearing mouse에 포토론(5mg /kg BW)을 복강내 주사하고 2시간 후에 레이저 광선(파장 660nm)을 80J/cm² 와 100J/cm² 을 각각 조사하여 광역동치료를 실시하였다.

레이저 조사 후 24간에 실험동물을 희생시켜서 암 조직을 절제하여 일부는 H&E 염색 및 TUNEL assay 등 조직검사를 위한 재료로 사용하고 나머지는 8-OHdG, TBARS 및 Caspase-3 등 생화학적 검사를 위한 시료로 사용하였다.

CaSki cancer bearing mouse model에서 광민감제 포토론을 이용한 광역동치료를 실시한 결과 광역동치료 80J/cm² 군의 종양 용적은 레이저 조사전에 비교하여 레이저 조사 21일 경과시에 종양의 용적은 213%가 증가 되었다.

광역동치료 100J/cm² 군의 종양 용적은 레이저 조사전에 비교하여 레이저 조사 21일 경과 시에 종양의 용적은 48%가 감소 되었다.

광역동치료 24시간 후 종양조직 H&E 염색 광학현미경 소견에서 광역동치료 80J/cm² 군의 종양 조직에서는 세포핵의 형태가 불규칙적(irregular nucleus)이고, 핵의 경계가 명확하지 않은 세포가 나타났으며, 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직에서는 세포핵의 형태가 80J/cm² 군보다 더 불규칙적이고, 핵의 경계가 명확하지 않은 세포가 많았다.

광역동치료 24시간 후 종양조직 TUNEL 염색 형광현미경 소견에서 광역동치

료 80J/cm² 군의 종양 조직에서 DAPI 염색된 핵의 수에 대한 TUNEL 염색된 핵의 수 비율이 47.2 %를 나타냈다.

광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직에서 DAPI 염색된 핵의 수에 대한 TUNEL 염색된 핵의 수 비율이 75.9% 를 나타내서 TUNEL positive cells 비율은 80J/cm² 군보다 28%가 더 높았다.

광역동치료 24시간 후 종양조직 8-OHdG 함량은 광역동치료 80J/cm² 군에서 120.9±15.8 μg/g tissue 로 나타나서 대조군보다 287% 가 증가 되었다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 8-OHdG 함량은 280.9±25.1 μg/g tissue 로 광역동치료 80J/cm² 군보다 133%가 증가되었다.

광역동치료 24시간 후 종양조직 TBARS 함량은 광역동치료 80J/cm² 군은 342.5±37.1 μM/g tissue로 대조군보다 192% 가 증가되었다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 TBARS 함량은 561.8±47.5 μM/g tissue로 광역동치료 80J/cm² 군보다 64%가 증가되었다.

광역동치료 24시간 후 종양조직 Caspase-3 활성도는 광역동치료 80J/cm² 군은 2.9±0.4로 나타나서 대조군보다 141%가 증가되었다. 광역동치료 100J/cm² 군의 종양 조직 Caspase-3 활성도는 4.1±0.5로 광역동치료 80J/cm² 군보다 41%가 증가되었다.

이상의 실험 결과 CaSki cancer bearing mouse model에서 광민감제 포토론을 이용한 광역동치료를 실시하면 종양의 용적이 감소하여 항암효과가 있는 것으로 나타났는데, 이는 광역동치료로 인한 광화학반응에 의해서 생성된 반응성 산소가 DNA와 세포막에 산화적 손상을 유도하면 미토콘드리아 막의 기능 저하로 Cytochrome C가 유리되어 이에 의한 내재적 세포자멸사 경로가 활성화되어 Caspase-3이 활성화되면서 염색체 응축(chromatin condensation)이나 DNA 분절(DNA fragmentation) 및 막 bleb이 일어나서 암세포 사멸이 유도되어 나타난 결과로 추측된다.

포토론과 CaSki cancer bearing mouse model을 이용한 광역동치료법은 전 임상 단계의 실험 모델로서 임상적 암 치료 방법으로 적용하기 위해서는 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

6. 참고 문헌

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 71(3):209-249.
2. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37,513,025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2019;391(10125):1023-1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
3. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet.* 2003 28;361(9376):2217-25.
4. Rogers L, Siu SS, Luesley D, Bryant A, Dickinson HO. Radiotherapy and chemoradiation after surgery for early cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 16;5(5):CD007583.
5. Vrouenraets MB, Visser GW, Snow GB, van Dongen GA. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research* 2003; 23(1B):505-522.
6. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 1991;61:340-8.
7. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014 32(3):415-25
8. Niculescu, A.-G., and Grumezescu, A. M. (2021). Photodynamic therapy—An UpTo-Date Review. *Appl. Sci.* 11 (8), 3626. doi:10.3390/app11083626
9. Tong L, Chuang CC, Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Lett.* 2015; 367(1):18-25.
10. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys Med Biol.* 2005 50:2597-2616.

11. Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2020 21(11):3743-3766.
12. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci* 2015 16:20523-20559.
13. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011 43(7):755-67.
14. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1098-1107.
15. Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. (1967) Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer* 20(12):2255-2257.
16. Huang, Z. (2005). A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (3), 283-293.
17. Pandey RK, Zheng G. Porphyrins as photosensitizers in photodynamic therapy. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, editors. *The Porphyrin Handbook*. Boston. Academic Press. 2000; 157-230.
18. Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018 26:22:25. doi: 10.1186/s40824-018-0140-z.
19. Lui H. Photodynamic therapy in dermatology with porfimer sodium and benzoporphyrin derivative: an update. *Semin Oncol*. 1994 21(6 Suppl 15):11-14.
20. Senge MO. (2012). mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagn Photodyn Ther*. 9 (2), 170-179.
21. Abrahamse H, Hamblin MR. (2016). New photosensitizers for

- photodynamic therapy. *Biochem J.* 473 (4), 347-364.
22. Abrahamse H, Kruger CA, Kadanyo S, Mishra A. (2017). Nanoparticles for advanced photodynamic therapy of cancer. *Photomed Laser Surg.* 35(11), 581-588.
 23. Loschenov LB. Photo diagnosis and photodynamic therapy/Loschenov LB , KonovKonov VI, Prokhorov AM - *Laser Physics*, vol. 10. No. 6; 2000, 1188-1207.
 24. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* 2013; 46:7-23.
 25. Kessel D, Oleinick NL. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: An Update. *Photochem Photobiol.* 2018 94(2):213-218.
 26. Kessel D, Jr Reiners JJ. (2007) Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem. Photobiol.* 83, 1024-1028.
 27. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 51, 5993-5996.
 28. Xue LY, Chiu SM, Fiebig A, Andrews DW, Oleinick NL (2003) Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 22, 9197-9204.
 29. Luo Y, Chang CK, Kessel D. (1996) Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 63, 528-534.
 30. Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: The story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 1004-1010.
 31. Kessel DH, Price M, Jr Reiners JJ (2012) ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy* 8, 1333-1341.
 32. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic

- cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017 17(2):97-111.
33. Wachowska M, Muchowicz A, Demkow U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Cent Eur J Immunol* 2015 40:481-5.
 34. Alzeibak R, Mishchenko TA, Shilyagina NY, Balalaeva IV, Vedunova MV, Krysko DV. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *J Immunother Cancer*. 2021 9(1):e001926. doi: 10.1136/jitc-2020-001926.
 35. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1976 115:150-151.
 36. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. 1978 38: 2628-2635.
 37. Nestor MS, Gold MH, Kauvar AN, et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *J Drugs Dermatol*. 2006 5:140-154.
 38. Jerjes W, Upile T, Akram S, Hopper C. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 22: 785-791.
 39. Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, et al. (2006). Photodynamic therapy(PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol*. 1(5), 489-493.
 40. Jerjes W, Upile T, Akram S, Hopper C. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 22: 785-791.
 41. Verger A, Brandhonneur N, Molard Y, Cordier S, Kowouvi K, Amela-Cortes M, Dollo G. From molecules to nanovectors: Current state of the art and applications of photosensitizers in

- photodynamic therapy. *Int J Pharm.* 2021 15:604:120763. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120763.
42. Panzarini E, Tenuzzo B, Dini L. Photodynamic therapy-induced apoptosis of HeLa cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 1171:617-626.
 43. Li Z, Teng M, Wang Y, Wang Q, Feng Y, Xiao Z, Li C, Zeng K. The mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in promoting endoplasmic reticulum stress in the treatment of HR-HPV-infected HeLa cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2021 37(4):348-359.
 44. Li K, Dong W, Liu Q, Lv G, Xie M, Sun X, Qiu L, Lin J. A biotin receptor-targeted silicon(IV) phthalocyanine for in vivo tumor imaging and photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2019 190:1-7.
 45. Bae SM, Huh SW, Park EK, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Kim CK, Kim JK, Kim YW, Ahn WS. Photogem induces necrosis in various uterine cervical cancer cell lines by PDT. *Cancer Res Treat.* 2003 35(6):549-556.
 46. Oliveira PM, Lopes TZ, Tedesco AC, Rahal P, Calmon MF. Effect of berberine associated with photodynamic therapy in cell lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 32:102045. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102045.
 47. Patillo RA, Hussa R, Story MT, Ruckert ACF, Shalaby MR, Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: A new epidermoid cervical cancer cell line, *Science* 196, 1456-1457(1977).
 48. Petrov PT, Trukhacheva T, Isakov GA, Turyn MCV, Kravchenko E. Photolon™ an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience. *Acta Biooptic Inform Med.* 2004; 10:6-7.
 49. Mang TS. Lasers and light sources for PDT, Past, present and

- future. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004; 1:43-48
50. Aoki K, Satoi S, Harada S, Uchida S, Iwasa Y, Ikenouchi J. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb. *Mol Biol Cell.* 2020 1;31(8):833-844.
 51. Di Mascio P. Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem. Rev.* 2019;119(3):2043-2086.
 52. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17(10):1195-1214.
 53. Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2003 15;66(8):1527-35.
 54. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 2012;887:41-7.
 55. Mai NNH, Yamaguchi Y, Chojookhuu N, Matsumoto J, Nanashima A, Takagi H, Sato K, Tuan LQ, Hishikawa Y. Photodynamic Therapy Using a Novel Phosphorus Tetraphenylporphyrin Induces an Anticancer Effect via Bax/Bcl-xL-related Mitochondrial Apoptosis in Biliary Cancer Cells. *Acta Histochem Cytochem.* 2020 26;53(4):61-72.
 56. Lin C, Zhang Y, Wang J, Sui A, Xiu L, Zhu X. The study of effect and mechanism of 630-nm laser on human lung adenocarcinoma cell xenograft model in nude mice mediated by hematoporphyrin derivatives. *Lasers Med Sci.* 2020 ;35(5):1085-1094.
 57. Oliveira-Brett A.M., Piedade J.A.P., Silva L.A., Diculescu V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Anal. Biochem.* 2004;332:321-329.
 58. Chiorcea-Paquim AM. 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC-ECD Determination. *Molecules.* 2022;27(5):1620.
 59. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482(3):419-425.

60. Catalá A, Díaz M. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Front Physiol.* 2016;7:423–425.
61. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019;50(6):1352–1364.