

Tomasz Gośliński^{1*}, Krystyna Konopka², Jarosław Piskorz¹
Michał Kryjewski¹, Marcin Wierchowski¹, Stanisław Sobiak¹

¹Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, e-mail: tomasz.goslinski@amp.edu.pl
²Department of Microbiology, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry
San Francisco, USA, e-mail: kkonopka@pacific.edu

Wpłynęło w lutym 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej. 3. Źródła światła. 4. Fotosensybilizatory. 5. Terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom (PACT). 5.1. Badania PACT *in vitro*. 5.2. Efekty PACT badane na biofilmach. 5.3. Badania PACT *in vivo*. 5.4. Fotodynamiczna inaktywacja patogenów. 6. Perspektywy i kierunki badań

Prospects for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy – PACT

Abstract: Photodynamic therapy (PDT), also known as photoradiation therapy, phototherapy, or photochemotherapy, is a medical treatment that utilizes light to activate a photosensitizing agent (photosensitizer) in the presence of oxygen. The exposure of the photosensitizer to light of a specific wavelength results in the formation of oxygen species, such as singlet oxygen and free radicals, causing localized photodamage and cell death. Applications of PDT in the treatment of cancer and in the photodynamic diagnosis (PDD) of tumors and skin diseases are growing rapidly. There is also increased attention in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) that may represent an alternative treatment for drug resistant organisms. PACT has been effective in the treatment of bacterial, fungal, parasitic, and viral infections. The localized infections of the skin and the oral cavity are especially suitable for PACT since they are relatively accessible to illumination. The development of resistance to PACT appears to be unlikely, because in microbial cells singlet oxygen and free radicals interact with several cell structures and different metabolic pathways. PACT is equally effective against antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible bacteria, and repeated photosensitization has not induced the selection of resistant strains. Bacteria that grow in biofilms, implicated in diseases like cystic fibrosis (*Pseudomonas aeruginosa*) or periodontitis (*Porphyromonas gingivalis*), are also susceptible to PDT. Studies are now leading towards selective photosensitizers, since killing the entire flora leaves patients open to opportunistic infections. Several publications have summarized the photobiology of PACT *in vitro*, and its potential for the treatment of localized infections, but only a few studies have evaluated the use of PACT in animal models or in clinical trials. Pre-clinical work has shown that photosensitizers are more toxic against microbial species than against mammalian cells, that the illumination-based toxicity occurs much earlier in prokaryotic (bacteria) than in eukaryotic (fungi) cells, and that Gram-positive bacteria are more sensitive to PACT than Gram-negative species. PACT will not replace antimicrobial chemotherapy, but the photodynamic approach may improve the treatment of localized infections, speeding up and lowering the cost of the treatment. Development of new photosensitizers and more efficient light delivery systems, and further animal studies are required to establish the optimum treatment parameters for PACT before proceeding to clinical trials and eventual clinical use.

1. Introduction. 2. Mechanisms of photodynamic reaction and photodynamic therapy. 3. Light sources. 4. Photosensitizers. 5. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). 5.1. *In vitro* studies of PACT. 5.2. Effects of PACT on biofilms. 5.3. *In vivo* studies of PACT. 5.4. Photodynamic inactivation of pathogens. 6. Perspectives and future directions

Słowa kluczowe: biofilmy, fotosensybilizatory, terapia fotodynamiczna, terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom

Key words: biofilms, photodynamic therapy, photodynamic antimicrobial chemotherapy, photosensitizers

1. Wprowadzenie

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) może mieć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych [3, 4], infekcji bakteryjnych, pasożytniczych, grzybiczych i wirusowych [13, 32], łuszczycy [50], rogowacenia słonecznego [22], reumatoidalnego zapalenia stawów [30], związanej z wiekiem

degeneracji plamki żółtej [31] oraz w fotodiagnostyce [37]. Terapią fotodynamiczną zajmuje się zespół złożony z biochemika, chemika, biologa, lekarza, farmaceuty, fizyka i pielęgniarki [4].

Znaczenie PDT w leczeniu chorób nowotworowych wzrasta od ponad 30 lat dzięki pionierskim badaniom przeprowadzonym przez zespół Thomasa I. Dougherty'ego [16]. Terapia fotodynamiczna

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych (Wydział Farmaceutyczny), ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, tel.: (0 61) 854-66-37, Fax: (0 61) 854-66-39, e-mail: tomasz.goslinski@amp.edu.pl

charakteryzuje się szeregiem korzystnych cech w porównaniu z konwencjonalnym leczeniem nowotworów (chirurgia, radioterapia i chemioterapia). PDT jest terapią nieinwazyjną, nie wymaga skomplikowanej aparatury, jest wygodna dla pacjentów i może być stosowana w warunkach ambulatoryjnych. Terapia fotodynamiczna nie nadaje się do leczenia pacjentów z zaawansowanymi zmianami nowotworowymi, którym towarzyszą przerzuty. Sprawdza się ona natomiast w leczeniu wczesnych i miejscowych zmian nowotworowych. Brak ograniczeń związanych z dawką całkowitą pozwala na wielokrotne powtarzanie terapii. Działania niepożądane są głównie związane z uczuleniem na światło. PDT daje doskonałe efekty kosmetyczne i nie pozostawia blizn [9]. Bardzo zachęcające są wyniki badań klinicznych PDT na czterystu pacjentach z chorobami nowotworowymi uzyskane w Brazylii w latach 1997–2004 [4]. Fotouczulacze stosowane w leczeniu chorób nowotworowych i badaniach klinicznych to Photofrin[®], Foscan[®] i ALA, a w leczeniu związanej z wiekiem degeneracji plamki żółtej to Visudyne[™]. Stosowanie PDT jest regulowane przez instytucje rządowe kontrolujące wprowadzanie nowych leków i metod terapeutycznych. W Europie są dostępne wszystkie wymienione powyżej fotouczulacze, natomiast w Stanach Zjednoczonych Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) zaakceptowała tylko Photofrin[®], ALA i Visudyne[™].

Terapia fotodynamiczna skierowana przeciwko drobnoustrojom (*photodynamic antimicrobial chemotherapy*, PACT) może stać się alternatywą dla konwencjonalnej terapii zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych i wirusowych [46].

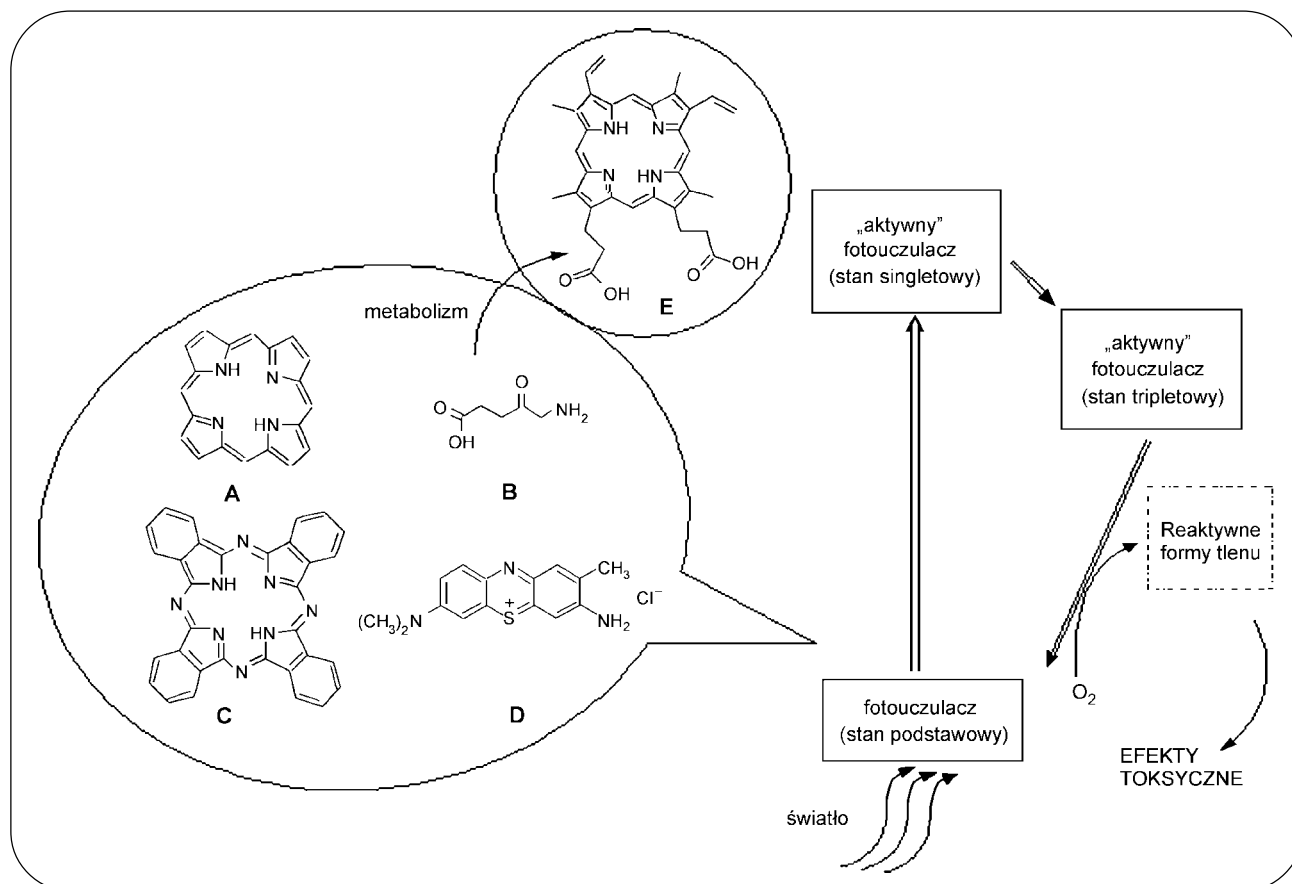
Zastosowana w PACT kombinacja fotouczulacza (fotosensybilizatora) i światła widzialnego prowadzi do selektywnej destrukcji komórek drobnoustrojów. Bakteriobójcze połączenie barwnika i światła znane jest od ponad stu lat, ale rozwój PACT został zahamowany w połowie ubiegłego wieku przez wprowadzenie antybiotyków. Pojawienie się metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* (VREF) skierowało uwagę na PACT. Obecnie uważa się, że terapia ta mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu zlokalizowanych infekcji skóry i jamy ustnej. Standardowe leczenie przeciwgrzybicze jest długotrwałe i mało efektywne, a w przypadku leczenia systemowego – wysoce toksyczne. W ostatnich latach problemem staje się rozwój oporności względem przeciwgrzybiczych związków z grupy triazoli. Konieczne jest więc wprowadzenie nowych terapii przeciwgrzybiczych, zwłaszcza u pacjentów z neutropenią, zapaleniem trzustki oraz u osób zakażonych wirusem HIV [13].

Kluczowym etapem reakcji fotodynamicznej jest wytworzenie reaktywnych form tlenu, w tym tlenu singletowego. Enzymy antyoksydacyjne (dysmutaza nadadtlenkowa i katalaza) zabezpieczają komórki przeciwko pewnym formom rodnikowym tlenu, ale nie przeciwko tlenowi singletowemu. Wydaje się mało prawdopodobne, aby bakterie i grzyby rozwinęły oporność w stosunku do cytotoksycznego działania tlenu singletowego, ponieważ w komórkach mikroorganizmów wywiera on wpływ na różne szlaki metaboliczne i organelle. PACT może być więc skuteczna zarówno wobec bakterii wrażliwych, jak i opornych na antybiotyki. Wielokrotne stosowanie terapii nie doprowadziło do wyselekcjonowania opornych szczepów bakteryjnych. Nie zaobserwowano także efektów genotoksycznych i mutagennych w komórkach grzybów i w komórkach ludzkich. PACT wykazuje potencjał przeciwwirusowy względem wirusa HIV, wirusów zapalenia wątroby oraz arbowirusów (wywołujących żółtą gorączkę, gorączkę tropikalną i gorączkę Zachodniego Nilu). Rozpatruje się zastosowanie PACT w zakażeniach wirusem Ebola i w zespole ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS) [13, 46].

Pomimo licznych sukcesów odniesionych w badaniach na kulturach komórkowych, niewielka ilość prac opisuje zastosowanie PACT w warunkach *in vivo* zarówno u zwierząt, jaki i u ludzi.

2. Mechanizmy reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej

Mechanizm terapii fotodynamicznej opiera się na wzajemnym dopasowaniu trzech elementów: światła, fotouczulacza i tlenu (Rys. 1). Fotouczulacz (lub jego prekursor, który musi ulec metabolicznej aktywacji) naświetlony światłem o określonej długości fali przechodzi z niskoenergetycznego stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Cząsteczka fotouczulacza może powrócić do stanu podstawowego, czemu towarzyszy fluorescencja lub przejść do niższego energetycznie stanu tripletowego. Znane są dwa mechanizmy reagowania fotouczulacza w tripletowym stanie wzbudzonym z cząsteczkami w komórce. Reakcje I typu dotyczą przeniesienia elektronu lub atomu wodoru bezpośrednio z fotouczulacza na cząsteczkę substratu z utworzeniem wolnych rodników, które natychmiast reagują z tlenem. W efekcie wytwarzane są wysoce reaktywne formy tlenu, jak anionorodniki nadadtlenkowe, rodniki hydroksylowe, nadtlenek wodoru. Reakcje II typu polegają na oddziaływaniu fotouczulacza z tlenem tripletowym. Prowadzą do wytworzenia elektronowo wzbudzonej i wysoce reaktywnej formy tlenu zwanej tlenem singletowym. Oba wymienione mechanizmy wskazują, że na przebieg reakcji fotodynamicznej ma



Rys. 1. Schemat reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej wraz z wybranymi strukturami: porfiryny (A), protoporfiryny IX (E) (metabolit kwasu 5-aminolewulinowego (B)), ftalocyjaniny (C) i błękitu toluidynowego (D).

wpływ zarówno stężenie tlenu, jak i fotouczulacza. Tlen singletowy będący głównym czynnikiem bakteriobójczym reakcji fotodynamicznej ma krótki okres życia i dyfunduje na odległość 100 nm. U bakterii zmiany letalne obserwuje się na poziomie kwasów nukleinowych i/lub błony cytoplazmatycznej [32]. W przypadku grzybów fotouczulacz przechodzi do przestrzeni periplazmatycznej przez zewnętrzną ścianę komórkową złożoną z glukanu, mannanu, chityny i lipoprotein. Następnie przenika on do cytoplazmy, gdzie wywołuje lawinę efektów biochemicznych i funkcjonalnych. Obserwuje się dezaktywację enzymów, białek i peroksydację lipidów, co prowadzi do lizy błon komórkowych, lizosomów i mitochondriów [13].

3. Źródła światła

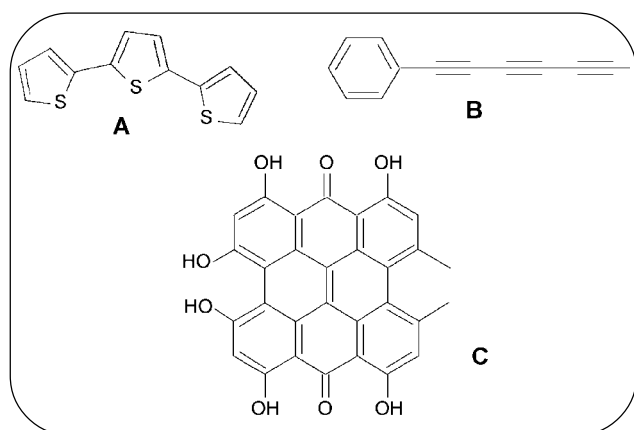
W terapii fotodynamicznej używa się niskoenergetycznego źródła światła widzialnego, które aktywuje fotosensybilizator. Zastosowanie znalazły lasery oraz tanie i łatwiejsze do użycia lampy. Miejsce złożonych i drogich źródeł światła, głównie laserów: argonowego, barwnikowych, laserów impulsowych na parach złota i miedzi, zajmują obecnie łatwiejsze w obsłudze,

przenośne i tanie lasery półprzewodnikowe, systemy diodowe (*light-emitting diode*, LED) oraz lasery femtosekundowe. W leczeniu większych powierzchni stosuje się niekoherentne źródła światła, jak np. lampy wolframowe, halogenowe i ksenonowe [7, 26, 28, 34].

Fenotiazyny ulegają aktywacji przy 600–660 nm, a ftalocyjaniny 630–690 nm. W lampach stosowanych *in vivo* minimalizuje się wpływ promieniowania ultrafioletowego z uwagi na ryzyko mutagenyzy oraz promieniowania podczerwonego, żeby zapobiec przegrzaniu tkanki. Typowe natężenie promieniowania stosowane dla przeciwgrzybiczego PACT mieści się w zakresie 10–100 mW cm⁻², z dawką energii pomiędzy 10–200 J cm⁻². Światło nie jest zdolne do głębokiej penetracji tkanki, stąd kliniczne zastosowanie PACT jest obecnie ograniczone do obszarów, które można naświetlać powierzchniowo [13, 46].

4. Fotosensybilizatory

Fotosensybilizatory są najczęściej związkami płaskimi o skoniugowanym systemie elektronów π . Występują licznie w świecie roślin. Przykładami mogą być produkty degradacji chlorofilu, hipercyna, fagopiryna,



Rys. 2. Fotouczulacze wyizolowane z roślin o potencjalnym zastosowaniu w PACT: tertienyl (A), fenyloheptatrien (B), hiperycyna (C).

psoralen, angelicyna, aflatoksyny, alkaloidy, pochodne tiofenu i poliacetyleny (Rys. 2). Duże ilości roślinnych fotouczulaczy znaleziono w liściach pokrzywy żegawki (*Urtica urens*) z rodziny pokrzywowatych (*Urticaceae*). Tertienyl występujący w różnych gatunkach aksamitek (*Tagetes* sp.) z rodziny astrowatych (*Asteraceae*) wykazuje aktywność fotodynamiczną w stosunku do nicieni oraz *Candida albicans*. Przedstawiciel poliacetylenów, fenyloheptatrien występujący w rodzinach astrowatych (*Asteraceae*) i selerowatych (*Apiaceae*) posiada właściwości fototoksyczne i antybiotyczne w stosunku do bakterii, grzybów, ludzkich fibroblastów, larw owadów. Przeciwwirusowe działanie hiperycyny z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) z rodziny dziurawcowatych (*Guttiferae*) mogłoby znaleźć zastosowanie do sterylizacji krwi [18].

Potencjalny fotouczulacz nie może być toksyczny, ani aktywowany metabolicznie do związków toksycznych. Fotosensybilizator musi być rozpuszczalny w wodzie. Gwarancją wysokiej toksyczności fotosensybilizatora wobec komórek nowotworowych i mikroorganizmów jest wytwarzanie tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu w reakcji ze światłem [1].

Do fotouczulaczy stosowanych w PACT należą barwniki fenotiazynowe: błękit metylenowy i błękit toluidyny, ftalocyjaniny: sulfonowana ftalocyjanina glinowa i kationowa ftalocyjanina cynkowa, chloryny i ich koniugaty: chloryna e6, polilizynowy koniugat chloryny e6, porfiryny i ich prekursorzy: Photofrin® i kwas 5-aminolewulinowy (ALA), ksanteny: erytrozyna i monotereny: azulen [45] (Rys. 1).

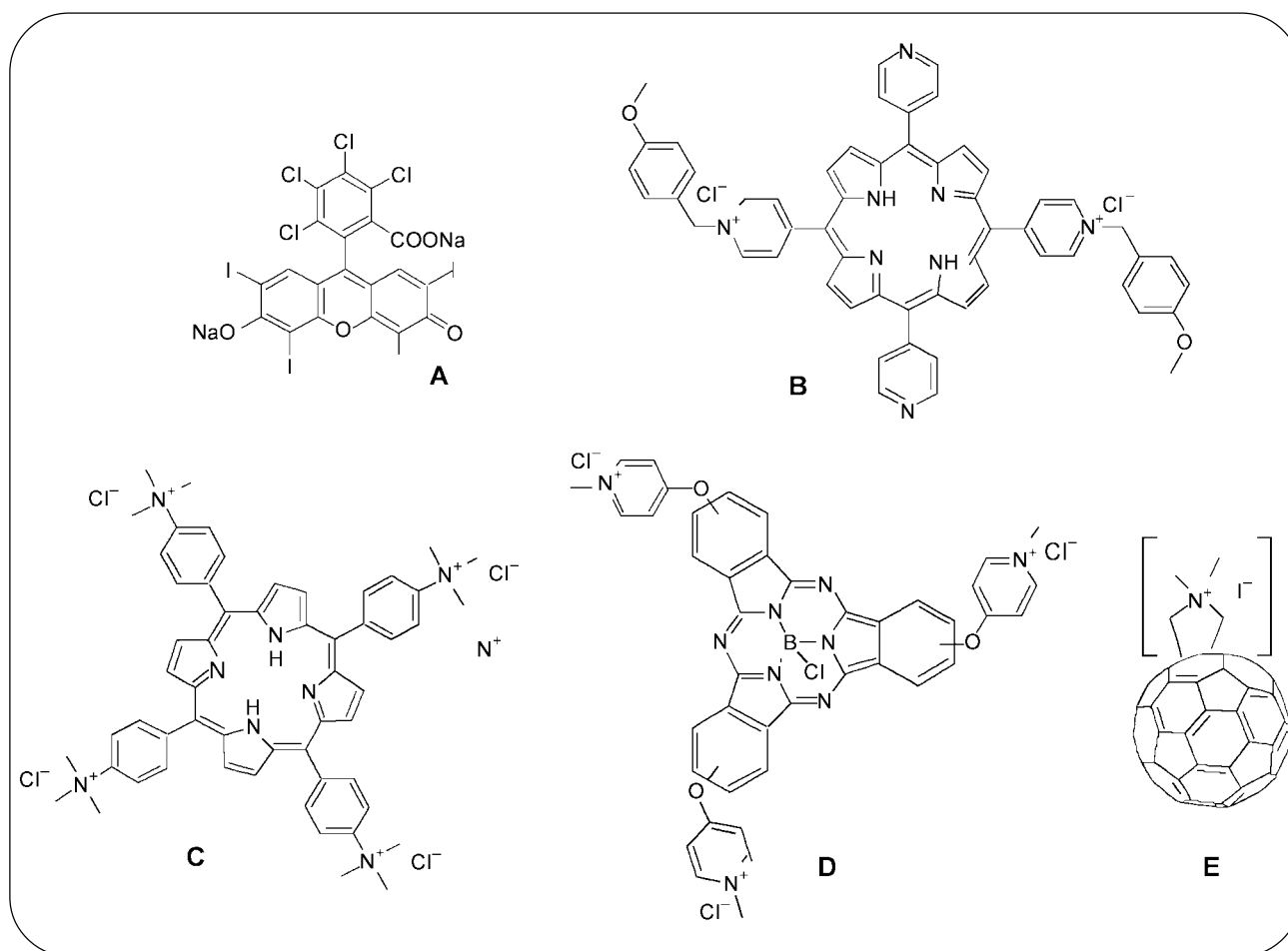
Od ładunku fotouczulacza zależy jego aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza. Związki o ładunku dodatnim są bardziej aktywne niż związki o ładunku ujemnym lub obojętne. W porównaniu do swoich anionowych odpowiedników, kationowe fotosensybilizatory charakteryzują się szerokim spektrum działania względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-

ujemnych. Fotosensybilizatory kationowe np. fenotiazyny są aktywne w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* i *Corynebacterium minutissimum* [10]. Doświadczenia z ftalocyjaninami cynkowymi wykazały, że związki kationowe są również efektywnymi fotosensybilizatorami względem bakterii Gram-ujemnych. W badaniach przetestowano ftalocyjaniny z ugrupowaniem kationowym (grupy pirydyniowe), neutralnym (grupy sulfonamidowe) i anionowym (grupy sulfonowe). Pomimo, że wszystkie związki wytwarzały reaktywne formy tlenu z podobną wydajnością, to tylko sole pirydyniowe były aktywne w odniesieniu do *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* [46]. Względnie porowata ściana komórkowa złożona z peptydoglikanu i kwasów lipotejchowych znajdująca się na zewnątrz błony cytoplazmatycznej bakterii Gram-dodatnich jest wystarczająco przepuszczalna dla fotosensybilizatorów i pozwala im na dyfundowanie do miejsc wrażliwych. Natomiast dodatkowa zewnętrzna błona komórkowa bakterii Gram-ujemnych, znajdująca się ponad ścianą peptydoglikanową i wewnętrzną błoną komórkową, działa jak fizyczna i funkcjonalna bariera pomiędzy komórką i środowiskiem. Fotosensybilizatory posiadające ładunek obojętny lub anionowy jedynie w pewnym stopniu łączą się z zewnętrzną błoną bakterii Gram-ujemnych, nie wywołując jednak ich dezaktywacji po naświetleniu. Powinowactwo anionowych fotouczulaczy do bakterii Gram-ujemnych może być zwiększone przez połączenie fotouczulacza z cząsteczką kationową (np. poli-L-lizynowa-chloryna e6), użycie związków powierzchniowo czynnych (np. Tris-EDTA) oraz koniugowanie fotouczulacza z przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się ze specyficznymi antygenami na powierzchni komórek [13, 21, 25, 35, 45].

Badania przeciwgrzybiczej PACT przeprowadzono dla pochodnych fenotiazynowych, porfiryńowych, ALA oraz dla ftalocyjanin [10, 11, 13, 44, 46].

Zaobserwowano, że pochodne fenotiazynowe, lokalizują się w błonie komórkowej drożdży i prowadzą do jej uszkodzeń po naświetleniu. Zwiększona przepuszczalność błony jest przyczyną śmierci komórki. Komórki grzybów są trudniej eliminowane przez PACT niż bakterie. Jest to spowodowane obecnością błony jądrowej, wielkością komórek i zredukowaną ilością potencjalnych celów dla tlenu singletowego przypadających na jednostkę objętości komórki. Należy podkreślić, że fenotiazyny są chemioterapeutykami, które działają bakteriobójczo także bez dostępu światła.

Porfiryny nie są wchłaniane przez komórki grzybów i ich działanie fototoksyczne zależy od aktywacji w stanie wolnym, niezwiązanym z błoną. Po naświetleniu porfiryń wytwarzane są reaktywne formy tlenu, które powodują nieodwracalne zmiany w błonie cytoplazma-



Rys. 3. Struktury przykładowych fotosensybilizatorów stosowanych w PACT *in vitro*: róż bengalski (A), porfiryra dikationowa (B), porfiryra tetrakationowa (C), subftalocyjanina trikationowa (D), fuleren zawierający grupy pirolidynowe (E)

tycznej pozwalające na penetrację fotouczulacza do wnętrza komórki. Po powtórny naświetleniu dochodzi do zmian toksycznych w obrębie cytoplazmy i organelli. Hydrofilowość porfiryry, np. deuteroporfiryry, jest szczególnie ważna dla przeciwwgrzybiczego PACT.

ALA jest prekursorem w biosyntezie hemu. Jego podanie prowadzi do kumulacji potencjalnego fotosensybilizatora protoporfiryry IX (PpIX). Niemniej jednak pomiędzy komórkami grzybów i ssaków występują różnice, związane głównie z obecnością cytoplazmatycznej oksydazy koproporfiryrynogenu. Aktywność syntazy ALA i dehydratazy ALA jest kontrolowana przez wewnątrzkomórkowy poziom hemu. Z tego też względu zawartość PpIX może ulec podwyższeniu przy równoczesnym podaniu związków kompleksujących żelazo, np. EDTA. PpIX indukuje reakcje cytotoksyczne niszczące zarówno błony komórkowe, jak i mitochondrialne. Przedłużone naświetlanie prowadzi do zmian w innych strukturach komórkowych oraz inhibicji syntezy DNA i RNA. PpIX nie powoduje jednak efektów genotoksycznych i mutagennych.

Ftalocyjaniny nawet jako pochodne sulfonowe są stosunkowo hydrofobowe. Monosulfonowa ftalocyja-

nina cynkowa oraz tetrakationowa ftalocyjanina cynkowa posiadająca podstawniki 4-aminoalkilowe okazały się bardzo dobrymi fotosensybilizatorami wobec *Candida albicans* [13, 46].

5. Terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom (PACT)

Efekt PACT *in vitro* badano głównie na mikroorganizmach rosnących w hodowlach zawiesinowych oraz w biofilmach. Można znaleźć zaledwie kilka prac, które opisują zastosowanie PACT u zwierząt i badania kliniczne u ludzi (zmiany wirusowe, trądzikowe, infekcje żołądkowe *Helicobacter pylori* i ropnie mózgu) [21, 32].

5.1. Badania PACT *in vitro*

W badaniach przeciwbakteryjnego i przeciwwgrzybiczego PACT *in vitro* stosowano następujące fotosensybilizatory: róż bengalski, błękit metylenowy, porfiryry kationowe oraz fulereny (Rys. 3).

Róż bengalski dodany do medium zawierającego *Streptococcus mutans*, już w stężeniu od 0,5 μM wykazywał efekt bakteriobójczy po naświetleniu światłem z podręcznego dentystycznego fotopolimeryzatora (ang. *handheld photopolymerizer*, *dental photopolymerizer*) emitującego dawkę światła 350–500 mJ cm^{-2} w zakresie 400–500 nm. Badania kontrolne przeprowadzone równolegle na fibroblastach nie wykazały zmian cytotoksycznych [33]. Błękit metylenowy okazał się grzybobójczy względem szczepów *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) po naświetleniu laserem diodowym z dawką energii 28 J cm^{-2} przy 685 nm [11].

Bristow i wsp. użyli porfiryny tetrakationowej, która charakteryzowała się bardzo dobrymi parametrami fotoinaktywacji postaci promastigota pasożyta *Leishmania major*. W warunkach *in vitro* dla zakresu stężeń od 2 do 7 μM osiągnięto 60% inaktywację *L. major* i 90–100% inaktywację makrofagów. Użyte dane wskazały na możliwość wyeliminowania pasożyta w czasie kilku sesji [8]. Badania porfirynekationowych wykazały, że dodatni ładunek jest kluczowy dla osiągnięcia aktywności względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Porfiryna dikationowa posiadała najlepszą aktywność w stosunku do *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Modyfikację lipofilności osiągnięto wprowadzając dodatkowe grupy aromatyczne do ugrupowań pirydyniowych lub zmieniając liczbę ładunków dodatnich [5]. Dla trikationowej subftalocyjaniny boronowej uzyskano wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe ($\sim 2 \text{ nmol}/10^6 \text{ komórek}$) w zawieszynie *E. coli*. Skuteczność PACT po 30 min naświetlania kultur wynosiła 99,7% [41].

Chloryna e6 połączona z polilizynowym pentamerem charakteryzowała się bardzo dobrą aktywnością względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Actinomyces viscosus* i *Streptococcus* spp. (*S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. mutans*). Należy podkreślić, że „nieskoniugowana” chloryna e6 była nie tylko mniej aktywna, ale również bardziej cytotoksyczna wobec komórek ssaków [35].

Fulerey C_{60} zawierające grupy piroolidynowe są dobrymi i selektywnymi fotosensybilizatorami dla *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus* [43].

5.2. Efekty PACT badane na biofilmach

Przylegające do siebie drobnoustroje należące do jednego lub kilku gatunków, zespolone produkowaną przez nie macierz pozakomórkową, tworzą heterogenną i zorganizowaną strukturę zwaną biofilmem.

Biofilmy tworzone są zarówno przez bakterie, jak i grzyby. Żyjące w nich mikroorganizmy wykazują podwyższoną oporność na antybiotyki oraz działanie układu immunologicznego. Wielu autorów zajmuje się problematyką niszczenia bakteryjnych i grzybiczych biofilmów oraz zagadnieniami ich oporności na tradycyjną farmakoterapię [14, 39]. Wood i wsp. posługując się mikroskopem elektronowym stwierdzili uszkodzenia biofilmu (wytworzonego *in vivo* w postaci płytki na emalii zębowej) po zastosowaniu *in vitro* ftalocyjaniny cynkowej i światła [52]. Lee i wsp. wykazali, że biofilm *P. aeruginosa* jest bardziej odporny na PACT niż hodowla zawieszinowa. W obu przypadkach po podaniu ALA zastosowano tę samą dawkę światła, wynoszącą 240 J cm^{-2} . Dla biofilmu konieczne było dwukrotne powtórzenie procedury przy wyższym stężeniu substancji aktywnej (20 mM cm^{-2}), podczas gdy w hodowli zawieszinowej wystarczyła dawka jednorazowa (10 mM cm^{-2}) [27].

Biofilm *E. faecalis* rosnący w uzyskanych po ekstrakcji korzeniach zębowych poddano PACT stosując błękit metylenowy w kombinacji z naświetlaniem przy 665 nm. Dawka światła 222 J cm^{-2} wyeliminowała 97% patogenu. Należy podkreślić, że już dawka światła 30 J cm^{-2} eliminowała całkowicie *Peptostreptococcus micros*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum subsp. nucleatum* oraz 53% *E. faecalis*. Celowym wydaje się więc zastosowanie PACT do niszczenia bakterii w kanałach korzeni zębowych podczas standardowego leczenia endodontycznego [40]. Równie obiecujące wyniki uzyskano dla biofilmu *Streptococcus intermedius* przy użyciu błękitu toluidyny [36, 51].

Zakażenia grzybicze zdarzają się coraz częściej, stanowiąc istotny problem współczesnej medycyny. Dotyczy to zarówno zakażeń powierzchniowych (błony śluzowe i skóra), jak również grzybic głębokich (grzybice narządowe i fungemie) [14]. Grupą chorych szczególnie narażonych na zakażenia grzybicze są pacjenci ze schorzeniami nowotworowymi oraz z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Rozwojowi objawowej grzybicy sprzyjają również schorzenia endokrynologiczne, szczególnie cukrzyca, przewlekła steroidoterapia i antybiotykoterapia oraz stosowanie leków immunosupresyjnych. Tworzenie biofilmu przez rodzaj *Candida* odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Poważnym problemem są zakażenia grzybicze u pacjentów, u których w celach diagnostycznych lub terapeutycznych stosuje się urządzenia wykonane z biomateriałów (cewniki, dreny, zespolenia naczyniowe, protezy stawowe i zębowe, soczewki oczne i inne). Udowodniono, że biofilm *Candida* może powstawać na powierzchni tworzyw sztucznych, takich jak polimetakrylan metylu, elastomer silikonowy, polichlorek winylu – materiałów używanych do produkcji cewników, drenów oraz protez [17].

Fotosensybilizatory osadzają się na emalii zębowej wywołując jej przebarwienia i w związku z tym nie mogą być stosowane jako płyny do płukania w grzybicach jamy ustnej. Idealnym rozwiązaniem wydaje się „przytrzymanie” fotosensybilizatora w miejscu powierzchniowej PACT. Zapobiega to szybkiemu usunięciu (wymyciu) fotouczulacza z obszaru poddawane go naświetlaniu, a także ogranicza niepożądane działania. W tym celu opracowano plastry z błękitem toluidyny (*mucoadhesive patch*). Plastry te są przygotowywane na bazie hydrożeli po zmieszaniu PMVE/MA [poli(metylowinyloeter)/bezwodnik maleinowy] z DOWANOL™.em (eter propylenoglikolometylowy). Stężenia błękitu toluidyny uwalnianego z plastra osiągnęły wartości 2,0–5,0 mg ml⁻¹, co pozwoliło po naświetleniu lampą Patersona przy 635 nm na wyeliminowanie ponad 90% populacji komórek grzybów [12].

Wood i wsp. badali eliminację biofilmu *S. mutans* stosując błękiet metylenowy, erytrozynę i Photofrin® oraz światło z zakresu 500–650 nm o intensywności 22,5–22,7 mW cm⁻². Erytrozyna wykazała najwyższą aktywność fotodynamiczną [53].

5.3. Badania PACT *in vivo*

Zaledwie kilka prac opisuje efektywność PACT *in vivo*. Na uwagę zasługują badania przeprowadzone na szczurach z użyciem błękitu toluidyny [24] oraz na psach z użyciem chloryny e6 oraz jej rozpuszczalnej pochodnej [38]. Badania dotyczyły zapaleń przyzębia (*periodontitis*) wywołanych przez *P. gingivalis* i *F. nucleatum*. U myszy z immunosupresją miejscowe zastosowanie błękitu metylenowego w dawce 450 i 500 µg ml⁻¹ połączone z naświetleniem laserem diodowym (664 nm) całkowicie usunęło *C. albicans* ze zmian na języku. Wyniki badań na zwierzętach sugerują, że proponowany schemat mógłby znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów z AIDS [44].

Zapalenie okołowszczepowe (*periimplantitis*) jest spowodowane zainfekowaniem powierzchni implantu i tworzeniem biofilmu. Płytką bakteryjną (*bacterial plaque*) tworząca się na implancie powoduje zmiany zapalne w sąsiednich tkankach miękkich. U 15 pacjentów z *periimplantitis*, błękiet toluidyny zastosowany na powierzchni implantów i naświetlanie laserem diodo-

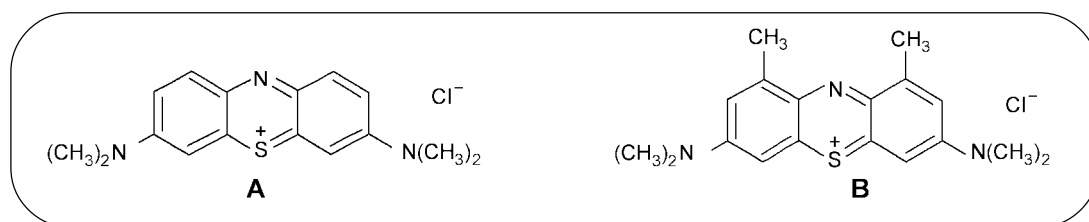
wym (690 nm) zmniejszyło znacznie ilość *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* i *Prevotella intermedia* [15]. Haas i wsp. z powodzeniem użyli błękitu toluidyny i światło laserowe (906 nm) u 17 pacjentów z *periimplantitis* [20].

Efektywność kliniczną ALA-PACT badano u 9 pacjentów z międzypalcową grzybicą stóp (ang. *interdigital foot mycosis*). W terapii zastosowano 20% krem z ALA, a po 4 godz. naświetlanie światłem czerwonym w dawce 75 J cm⁻². Jeżeli kontrola przeprowadzona po 7 dniach wykazała wynik negatywny, to terapię powtórzono jeszcze trzykrotnie w odstępach tygodniowych. Wyniki podsumowano po 4 tygodniach. Kliniczną i biologiczną poprawę stwierdzono u 6, w tym u 4 pacjentów po jednorazowej terapii. Jednakże u 2 pacjentów (jeden z *C. albicans*, drugi z *Trichophyton mentagrophytes*) zaobserwowano uporczywą remisję. Tolerancja terapii była dobra [10].

5.4. Fotodynamiczna inaktywacja patogenów

Pandemia AIDS w latach osiemdziesiątych i zakażenia wirusem HIV spowodowane transfuzją krwi i podawaniem preparatów krwiopochodnych, zwróciły uwagę na problem fotosterylizacji krwi i preparatów krwiopochodnych. Metody inaktywacji patogenów obejmują pasteryzację, naświetlanie UV i nanofiltrację. Z grupy fotosensybilizatorów stosowanych w PACT używa się barwników fenotiazynowych ze względu na ich powinowactwo do kwasów nukleinowych, w tym do DNA wirusowego. Fotodynamiczna inaktywacja przy użyciu błękitu metylenowego i błękitu dwumetylenowego okazała się skuteczna wobec *Yersinia enterocolitica* i *Pseudomonas fluorescens*. Błękit metylenowy był aktywny również względem wirusa HIV, HBV, parwowirusa B19 i Wirusa Zachodniego Nilu (Rys. 4).

Błękit metylenowy jest stosowany do fotodezynfekcji świeżego mrożonego osocza (*fresh frozen plasma*) według procedury opracowanej przez M o h r a w 1991 roku i ulepszonej przez MacoPharma. Osocze (200–315 ml) wprowadzone do pojemnika zawierającego filtr Blueflex i 85 µg błękitu metylenowego jest naświetlane lampą sodową przy 590 nm przez 20 min dawką 180 J cm⁻². Błękit dwumetylenowy – tionina może znaleźć też zastosowanie do fotodynamicznej



Rys. 4. Fotosensybilizatory fenotiazynowe: (A) błękiet metylenowy; (B) błękiet dwumetylenowy

sterylizacji koncentratów płytkowych. Prowadzone są próby użycia fotosensybilizatorów do dezynfekcji koncentratów krwinek czerwonych [19, 47–49].

6. Perspektywy i kierunki badań

PDT jest zaakceptowana przez organizacje rządowe Stanów Zjednoczonych, Unii Europejskiej, Kanady, Rosji i Japonii do leczenia niektórych stanów chorobowych [2, 3, 6, 26]. Badania zajmujące się fotobiologią i zastosowaniem PACT w leczeniu miejscowych infekcji wskazują na jej potencjalną użyteczność w eliminowaniu zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, pierwotniakowych i wirusowych [12, 13, 21, 23, 25, 32, 39, 45, 46, 53]. Wiele wyników uzyskanych *in vitro* wymaga jednak dalszych badań zanim PACT będzie można stosować rutynowo w praktyce klinicznej. Potencjalnie, PACT może być zastosowany w leczeniu ran oparzeniowych, infekcji skóry, paznokci, włosów, jamy ustnej, przełyku i dolnego odcinka dróg rodnych [13, 32]. Terapia fotodynamiczna wydaje się być obiecującą alternatywą w infekcjach wywołanych mikroorganizmami opornymi, zwłaszcza u pacjentów z chorobami nowotworowymi i upośledzoną funkcją systemu immunologicznego oraz w eliminowaniu biofilmów bakteryjnych z powierzchni tworzyw sztucznych (cewniki, dreny, protezy).

Niski koszt PACT daje szansę leczenia zakażeń powierzchniowych w krajach rozwijających się [25, 32, 47]. Rozwój oporności na dostępne antybiotyki postępuje bardzo szybko. Zwiększa się liczba patogenów w chorobach przyzębia opornych na amoksycylinę, penicylinę G, metronidazol, doksycylinę i roksytromycynę. Szczepy odporne powstają m.in. wskutek niewłaściwej antybiotykoterapii. Metycylinooporne szczepy *S. aureus* mogą tworzyć się w ramach oporności krzyżowej do antybakteryjnego składnika, triklosanu, dodawanego do past do zębów [29].

PACT wykazuje szereg korzystnych cech w porównaniu ze standardową antybiotykoterapią. Daje możliwość wielokrotnego działania na komórki mikroorganizmów bez ryzyka wystąpienia oporności. Terapia jest selektywna w stosunku do patogenów w porównaniu z komórkami ssaków oraz mało toksyczna. Nie opisano oporności mikroorganizmów na reaktywne formy tlenu. Zastosowanie PACT do leczenia miejscowych infekcji skraca czas trwania terapii, ogranicza efekty uboczne spowodowane systemowym podawaniem antybiotyków i obniża koszty leczenia [13, 25, 32].

Fotouczulacze fenotiazyniowe, porfiryne i ftalocyjaninowe wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Pomimo tego, że dla niektórych grup fotosensybilizatorów udało się skorelować zależ-

ność działania i struktury, wiele fotouczulaczy aktywnych *in vitro* nie zawsze sprawdza się w warunkach *in vivo*. Opracowanie nowych fotouczulaczy działających specyficznie wobec wybranych mikroorganizmów np. poprzez sprzężanie z przeciwciałami i pozwoli na uniknięcie efektów fototoksycznych wobec komórek pacjenta lub zwierząt doświadczalnych i flory komensalnej. Najbardziej podatną na PACT grupą mikroorganizmów są bakterie. Grzyby wymagają większych dawek światła i fotouczulacza. Przeciwgrzybicza PACT może więc doprowadzić do zniszczenia wszystkich mikroorganizmów w miejscu poddanym leczeniu. Taki efekt wydaje się niepożądany przy eliminacji określonego patogenu. Skuteczne mogą być wtedy koniugaty fotosensybilizatorów z przeciwciałami np. Sn (IV) chloryna e6 połączona z przeciwciałami *anti-P. aeruginosa*, które okazały się efektywne w badaniach *in vitro* względem *P. aeruginosa*, w tym szczepów metycylinoopornych. Prowadzone są też badania zwiększające efektywność wcześniej stosowanych fotouczulaczy. Otrzymano polikationowy koniugat chloryny e6 (poli-L-lizynowa-chloryna e6), który jak wykazano na myszach posiada przeciwbakteryjne działanie w stosunku do Gram-ujemnych pałeczek *P. aeruginosa* [25, 32].

Skuteczność PACT jest w dużym stopniu zależna od doboru dawki promieniowania, która eliminuje mikroorganizm nie uszkadzając komórek pacjenta. W związku z tym konieczna jest dokładna standaryzacja procesu naświetlania i dozymetrii oraz udoskonalenie systemów dostarczających światło. Problem ten mogą rozwiązać badania nad światłowodami ze specjalnymi końcówkami optycznymi. Mogłoby się to przyczynić do znalezienia nowych zastosowań dla PACT, w tym leczenia infekcji umiejscowionych podskórnym np. ropni. Bardzo istotne jest monitorowanie wyników terapii podczas jej trwania, po jej zakończeniu oraz w czasie ewentualnych remisji. Immunologiczne aspekty PACT wymagają dalszych badań [32].

Zastosowanie PACT w leczeniu infekcji miejscowych może stać się istotnym uzupełnieniem tradycyjnych terapii przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych skracając czas ich trwania, minimalizując uboczne skutki systemowego podawania chemioterapeutyków i obniżając koszty leczenia. PACT może być też zastosowana w przypadkach, które wymagają szybkiego obniżenia ilości bakterii, wykazujących odporność na standardowe leczenie np. szczepy ze świeżo nabytą opornością [32].

Dla Taylora i Sommera PACT w przyszłości może być brana pod uwagę podczas dłuższego pobytu w kosmosie z uwagi na ograniczoną wielkość „apteczki pokładowej” [42]. Z pewnością będziemy świadkami dalszego dynamicznego rozwoju tej metody terapeutycznej.

Piśmiennictwo

- Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C., Sibata C.H.: Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 27–42 (2004)
- Allison R.R., Mota H.C., Sibata C.H.: Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 263–277 (2004)
- Allison R.R., Bagnato V.S., Cuenca R., Downie G.H., Sibata C.H.: The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol.* **2**, 53–71 (2006)
- Bagnato V.S., Kurachi C., Ferreira J., Marcassa L.G., Sibata C.H., Allison R.R.: PDT experience in Brazil: A regional profile. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 107–118 (2005)
- Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V.: Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An *in vitro* study on Gram-negative and Gram positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **85**, 28–38 (2006)
- Biel M.: Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg. Med.* **38**, 349–355 (2006)
- Brancaleon L., Moseley H.: Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* **17**, 173–186 (2002)
- Bristow C.A., Hudson R., Paget T.A., Boyle R.W.: Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **3**, 162–167 (2006)
- Brown S.B., Brown E.A., Walker I.: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497–508 (2004)
- Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R.: A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **78**, 1–6 (2005)
- De Souza S.C., Junqueira J.C., Balducci I., Koga-Ito C.Y., Munin E., Jorge A.O.C.: Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **83**, 34–38 (2006)
- Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M., Woolfson A.D.: Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **86**, 59–69 (2007)
- Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M.: Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* **163**, 1–12 (2008)
- Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* **2**, 405–410 (2003)
- Dörtdudak O., Haas R., Bernhart T., Mailath-Pokorny G.: Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin. Oral Implants Res.* **12**, 104–108 (2001)
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q.: Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889–905 (1998)
- Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infections. *Trends Microbiol.* **11**, 30–36 (2003)
- Ebermann R., Alth G., Kreitner M., Kubin A.: Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **36**, 95–97 (1996)
- Garwood M., Cardigan R.A., Drummond O., Hornsey V.S., Turner C.P., Young D., Williamson L.M., Prowse C.V.: The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion*, **43**, 1238–1247 (2003)
- Haas R., Baron M., Dörtdudak O., Watzek G.: Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **15**, 374–382 (2000)
- Hamblin M.R., Hasan T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 436–450 (2004)
- Itoh Y., Ninomiya Y., Henta T., Tajima S., Ishibashi A.: Topical delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for Japanese actinic keratoses. *J. Dermatol.* **27**, 513–518 (2000)
- Konopka K., Goslinski T.: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res.* **86**, 694–707 (2007)
- Kömerik N., Nakanishi H., MacRobert A.J., Henderson B., Speight P., Wilson M.: *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 932–940 (2003)
- Kömerik N., MacRobert A.J.: Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**, 487–504 (2006)
- Kübler A.C.: Photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.* **20**, 37–45 (2005)
- Lee C.F., Lee C.J., Chen C.T., Huang C.T.: δ -Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **75**, 21–25 (2004)
- Mang T.S.: Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 43–48 (2004)
- Meisel P., Kocher T.: Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **79**, 159–170 (2005)
- Miyazawa S., Nishida K., Komiyama T., Nakae Y., Takeda K., Yorimitsu M., Kitamura A., Kunisada T., Ohtsuka A., Inoue H.: Novel transdermal photodynamic therapy using ATX-S10-Na(II) induces apoptosis of synovial fibroblasts and ameliorates collagen antibody-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* **26**, 717–725 (2006)
- Ogino T., Takeda M., Imaizumi H., Okushiba U.: Photodynamic therapy for age-related macular degeneration in Japanese patients: results after one year. *Jpn. J. Ophthalmol.* **51**, 210–215 (2007)
- O’Riordan K., Akilov O.E., Hasan T.: The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 247–262 (2005)
- Paulino T.P., Ribeiro K.F., Thedei G. Jr., Tedesco A.C., Ciancaglini P.: Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **50**, 353–359 (2005)
- Pieslinger A., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Mair H., Krammer B., Kiesslich T. Characterization of a simple and homogenous irradiation device based on light-emitting diodes: a possible low-cost supplement to conventional light sources for photodynamic treatment. *Med. Laser Appl.* **21**, 277–283 (2006)
- Rovaldi C.R., Pievsky A., Sole N.A., Friden P.M., Rothstein D.M., Spacciapoli P.: Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3364–3367 (2000)

36. Seal G.J., Ng Y.L., Spratt D., Bhatti M., Gulabivala K.: An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int. Endod. J.* **35**, 268–274 (2002)
37. Sharwani A., Jerjes W., Salih V., MacRobert A.J., El-Maaytah M., Khalil H.S.M., Hopper C.: Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **83**, 27–33 (2006)
38. Sigusch B.W., Pfitzner A., Albrecht V., Glockmann E.: Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J. Periodontol.* **76**, 1100–1105 (2005)
39. Smith A.W.: Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1539–1550 (2005)
40. Soukos N.S., Stashenko P.P. i wsp.: Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J. Endod.* **32**, 979–984 (2006)
41. Spesia M.B., Durantini E.N.: Synthesis and antibacterial photosensitizing properties of a novel tricationic subphthalocyanine derivative. *Dyes Pigm.* **77**, 229–237 (2008)
42. Taylor P.W., Sommer A.P. Towards rational treatment of bacterial infections during extended space travel. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 183–187 (2005)
43. Tegos G.P., Demidova T.N., Arcila-Lopez D., Lee H., Wharton T., Gali H., Hamblin M.R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem. Biol.* **12**, 1127–1135 (2005)
44. Teichert M.C., Jones J.W., Usacheva M.N., Biel M.A.: Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**, 155–160 (2002)
45. Wainwright M.: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 13–28 (1998)
46. Wainwright M., Crossley K.B.: Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **53**, 119–126 (2004)
47. Wainwright M.: The development of phenothiazinium photosensitizers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 263–272 (2005)
48. Wainwright M., Mohr H., Walker W.H.: Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **86**, 45–58 (2007)
49. Wainwright M.: Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes Pigm.* **76**, 582–589 (2008)
50. Weinstein G.D., McCullough J.L., Nelson J.S., Berns M.W., McCormick A.: Low dose photofrin II photodynamic therapy of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 573–578 (1991)
51. Williams J.A., Pearson G.J., Colles M.J.: Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J. Dent.* **34**, 363–371 (2006)
52. Wood S., Nattress B., Kirkham J., Shore R., Brookes S., Griffiths J., Robinson C.: An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **50**, 1–7 (1999)
53. Wood S., Metcalf D., Devine D., Robinson C.: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 680–684 (2006)

Przedstawione zagadnienia stanowią treść grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Tomasza Goślińskiego (N405 03132/2052).