

Experimental Research on Subcellular Distribution of PpIX Photobleaching in HL60 Based on ALA-PDT*

Kangqiang Huang^{1,2}, Shunfeng Lv², Jianwen Xiong^{2#}

¹Shantou Branch, Guangdong Co., China Mobile Group, Shantou

²School of Physics and Telecommunication Engineering, South China Normal University, Guangzhou

Email: xiaoqiang1022@163.com, #jwxiong@scnu.edu.cn

Received: Aug. 29th, 2012; revised: Sep. 18th, 2012; accepted: Sep. 30th, 2012

Abstract: With the development of the fundamental research of photodynamic therapy (PDT) and its clinical application, the photobleaching properties of photosensitizers have become a hotspot of research. The experimental research of ALA mediated PDT was carried out in the own designed reaction chamber when the final concentration of ALA is 10 mM/ml, the wavelength and the output power of the light source are 410 nm and 5 mW/cm² separately. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to evaluate the cell viability while the photobleaching of PpIX in the subcellular structure of HL60 was detected by fluorescence spectroscopy. The results showed that after 60 min irradiation the fluorescence intensity of mitochondria, lysosomes and endoplasmic reticulum had decreased by 95%, 91.5% and 51.2% respectively compared to that before irradiation. The rate of photobleaching in mitochondria which can characterize the activity of HL60 was significantly higher than others, this suggest that mitochondria might be one of main therapeutic targets of photodynamic therapy.

Keywords: 5-Aminolaevulinic Acid (ALA); Photodynamic Therapy (PDT); PpIX (Protoporphyrin IX); Photobleaching

基于 ALA-PDT 中 PpIX 亚细胞分布位点光漂白实验研究*

黄康强^{1,2}, 吕顺峰², 熊建文^{2#}

¹中国移动通信集团广东有限公司汕头分公司, 汕头

²华南师范大学物理与电信工程学院, 广州

Email: xiaoqiang1022@163.com, #jwxiong@scnu.edu.cn

收稿日期: 2012 年 8 月 29 日; 修回日期: 2012 年 9 月 18 日; 录用日期: 2012 年 9 月 30 日

摘 要: 随着光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)基础研究的不断深入和临床应用的广泛开展, 光敏剂的光漂白现象日渐成为 PDT 研究的热点问题。实验在 ALA 的终浓度为 10 mM/ml, 辐射光波长为 410 nm, 辐照光功率为 5 mW/cm² 等条件下采用荧光探针标记技术在自行设计的光动力学疗法反应室进行了 PDT 实验研究。Cell Counting Kit-8 (CCK-8)法用来检测细胞的活性, 通过获得的荧光光谱研究了亚细胞的光漂白情况。结果表明: 以每种细胞器光照前的平均荧光强度为基准, 则光照 60 min 后线粒体、溶酶体、内质网的荧光强度下分别降低了 95%、91.5%和 51.2%。线粒体区域光漂白速率较快, 其荧光强度的变化基本表征了 HL60 细胞活性的变化, 推断线粒体是光动力效应的主要作用靶点之一。

关键词: 氨乙酰丙酸(ALA); 光动力学疗法(PDT); PpIX (Protoporphyrin IX); 光漂白

*基金项目: 国家自然科学基金项目(61072029); 广东省自然科学基金项目(10151063101000025); 广州市科技计划项目(2010Y1-C111)。

#通讯作者。

1. 引言

近年来,随着光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)基础研究的不断深入和临床应用的广泛开展,光漂白(Photobleaching)机理及其对光敏剂剂量、光辐照剂量的影响显得愈来愈重要,光敏剂光漂白与光产物生成的荧光光谱监测已成为近年来 PDT 剂量学研究的热点问题^[1-3]。研究发现光漂白可以用来监测光动力反应过程:光敏剂漂白特性的剂量学公式能够很好的预测细胞体系中的单线态氧的剂量^[4,5];光敏剂光漂白可用来综合衡量单态氧对靶组织的光动力作用剂量^[6,7]。PDT 对靶组织的杀伤效应与光敏剂的光漂白不可分割地联系在一起,对光敏剂的光漂白的荧光监测有望成为一种“隐性”的实时剂量学方法^[8,9]。因此研究光漂白现象对 PDT 的机理研究及未来的临床应用都具有重要意义。

光敏剂的光漂白(Photobleaching)是光动力反应中的一个伴随过程,是指在光的照射下,光敏剂所激发出来的荧光强度随着时间推移逐步减弱乃至消失,光照过程中光敏剂的发色基团被破坏分解,生成不能吸收可见光的物质,失去光敏活性。这种光照造成光敏剂吸收光的能力和荧光效率减弱的现象称为光漂白^[10,11]。

本文采用荧光探针标记技术,对光照前后各种主要亚细胞结构内光敏剂荧光强度变化进行定量分析,对 HL60 细胞亚细胞分布位点在光动力作用下发生光敏化和光漂白的特点进行了初步探讨。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 主要试剂

ALA(美国 Sigma 公司),线粒体荧光探针——罗丹明 123(RHODANMINE123,美国 Sigma 公司),溶酶体红色荧光探针——Lyso-Tracker Red(碧云天生物科技),内质网荧光探针——DIOC6(碧云天生物科技),CCK-8 试剂(日本同仁化学)。

2.1.2. 实验仪器

PDT 反应室(自行设计,以大功率 LED 作为光源),F-4500 荧光分光光度计(日本日立),XDS-1A 倒置显微镜(广州光学仪器),DG5031 型酶联免疫检测仪(南

京华东电子),LPE-1A 激光功率能量计(北京物科光电),SW-CJ 型洁净工作台(苏州安泰空气技术),HH.CP-TW80 升二氧化碳培养箱(上海一恒科技),96 孔培养板,细胞计数板及其他常规器皿。

2.1.3. 细胞株

HL60 细胞(中山大学实验动物中心细胞库提供)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 细胞培养

HL60 细胞加 RPMI-1640 培养基(胎牛血清 FCS 含量 12%)置于环境温度为 37℃,空气湿度为 95%,CO₂ 体积分数为 5%的培养箱中培养。取对数生长长期的细胞进行实验(即生命力最旺盛的时期)。

2.2.2. 细胞活性检测

采用与传统的细胞活性检测方法 MTT 法相比,操作方便、简洁、灵敏度高、重复性好的 CCK-8(Cell Counting Kit-8)法^[12],以 450 nm 为测量波长,630 nm 为参比波长对细胞进行活性检测。采用双波长法可以除去因培养板孔底划痕或样品混浊所带来的吸收,降低实验误差。

2.2.3. 光谱分析

在基于 ALA(5-aminolaevulinic acid/氨乙酰丙酸)介导的光动力疗法中,被光诱导激发的“光敏剂”是卟啉第九代衍生物 PpIX (protoporphyrin IX),PpIX 由 ALA 内源生长合成,ALA 是其合成前体物。研究表明,PpIX 对光辐照最敏感的波段在 410 nm 附近^[13,14]。PpIX 的吸收光谱如图 1 所示,由图可见,PpIX 在 410 nm 附近有个强吸收峰。为了使 PDT 获得较好的光动力效应,光源光波长应选择在 410 nm 附近。实验采用单色性好、光斑面积大、光功率均匀稳定、热效应变化不显著、中心波长在 410 nm 附近的大功率 LED 作为实验光源。从图 2 可以看到,蓝光 LED 的最大发射峰是 410 nm,带宽为 70 nm,能很好地满足实验中 PDT 光源的需要。

2.2.4. 实验设计

1) ALA-PDT 的 HL60 细胞实验

首先进行 410 nm 光对 HL60 灭活的影响,为之后的亚细胞光漂白实验提供宏观上的数据参考。采用

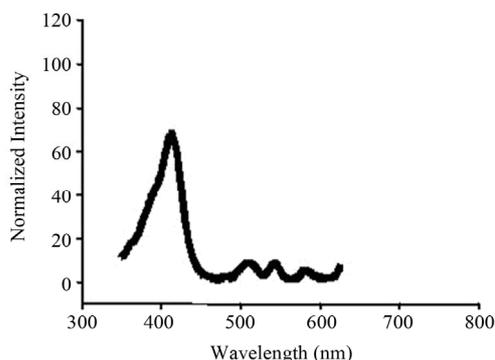


Figure 1. The absorption spectrum of PpIX
图 1. PpIX 的吸收光谱图

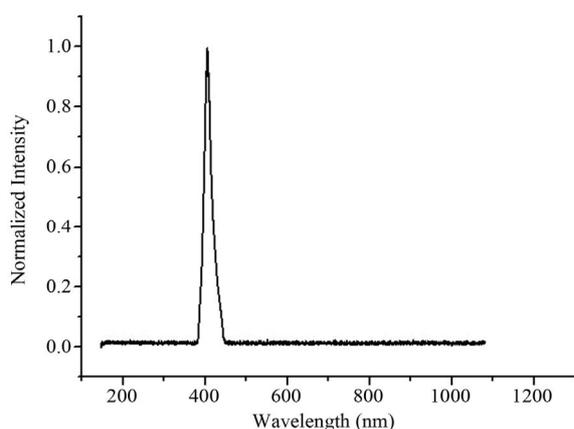


Figure 2. The emission spectra of the blue LEDs
图 2. 蓝光 LED 的发射光谱

CCK-8 法对 ALA 的细胞的毒性效应进行检测。考虑到后续的光漂白亚细胞荧光检测的实验一般选择的细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。因此从计数的准确性及方便实验对照的角度考虑, ALA 的暗室浓度方案选择为: 对密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液加入浓度为 10 mmol/L 的 ALA, 暗室孵育 4 小时(ALA 的最大细胞浓度为 $1 \times 10^{-8} \text{ mmol}/\text{cell}$)^[13]。光剂量的选取: 本实验的辐照光功率为 $5 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 光剂量采用的参数为 $18 \text{ J}/\text{cm}^2$ ^[14]。

2) 基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞亚细胞光漂白实验

配制荧光探针母液, 其中罗丹明 123 为 1 mM, 使用时终浓度为 $1 \mu\text{M}$; Lyso-Tracker Red 为 75 nm; DIOC6 为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

采用 96 孔培养板, 用其中的 15 个孔用作试验孔, 每孔注入 1 ml 密度为 1×10^6 个/ml 的 HL60 细胞, 接着按照 1:1 的比例加入浓度为 10 mM 的 ALA, 孵育 4

小时。然后 410 nm 光进行照射, 由于光照处理 60 分钟后细胞的存活率仅为 7%, 所以设定在 0 min、15 min, 30 min, 45 min, 60 min 分别取出 3 个孔样品, 去除细胞培养液, 每个孔中分别加入配制好的并 37°C 预温育的线粒体、溶酶体、内质网荧光探针母液进行孵化——15 分钟(线粒体, 内质网); 90 分钟(溶酶体)。去除染色工作液, 以 PBS 缓冲液冲洗三遍, 加入新鲜的细胞培养液, 随后用荧光分光光度计检测。

2.2.5. 统计学处理

$n = 5$, 数值采用均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示。SPSS11.5 统计软件进行数值分析。 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, 即为有统计学意义。

3. 实验结果与分析

3.1. ALA-PDT 的 HL60 细胞实验

用 410 nm 光进行了辐照。同一条件下, 实验独立重复进行五次, 每次用 CCK-8 法对同一条件的孔测得五个样品值(OD 值)。用光照后测得的细胞 OD 值(用 OD_R 表示)除以不光照的细胞 OD 值(用 OD_W 表示), 得不同条件下 HL60 细胞的相对存活率(用 S 表示), 即:

$$S = \frac{OD_R}{OD_W} \quad (1)$$

数据如表 1 所示。

表 1 中, NA-NI(without ALA and without Irradiation, 不光照也不加入 ALA); A-NI(ALA without Irradiation, 不光照但加入一定浓度的 ALA); NA-I(Irradiation without ALA, 没有加入 ALA 但接受光的辐照); AI(ALA with Irradiation, 既加入了 ALA 又接受光的辐照); BB(只加入培养液的对照组); AA(特定浓度 ALA 的对照组)。

410 nm 波长的 LED 光对 HL60 细胞存活率的影响如图 3 所示。

对 410 nm 光辐照来说, 将 A-NI 组(加入 ALA 但不光照)、NA-I 组(不加入 ALA 但光照)分别与 NA-NI 组(不加入 ALA, 也不光照)的比较中发现, 单纯的光照或单纯 ALA 的加入对 HL60 细胞和活性都未产生显著影响; 但将 AI 组与 A-NI 组及 NA-I 组比较发现, 既加入 ALA 又给予光照后, HL60 细胞的存活率明显降低。说明 HL60 细胞存活率的减少并非由于 ALA

Table 1. The influence of 410 nm light irradiation on the survivability of HL60 cells in the experiments based on ALA-PDT examined by CCK-8{10 mmol/L ALA(4 h) + (18 J/cm²) + CCK-8(4 h)}
表 1. 410 nm 辐照波段在 ALA-PDT 实验中对 HL60 细胞存活率的影响{10 mmol/L ALA(4 h) + (18 J/cm²) + CCK-8(4 h)}

| | OD Value | | | | | | |
|--------|----------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|
| | A | B | C | D | E | | |
| NA-NI* | 0.764 | 0.800 | 0.774 | 0.751 | 0.856 | 0.789 ± 0.042 | 1 |
| A-NI | 0.825 | 0.817 | 0.800 | 0.793 | 0.900 | 0.827 ± 0.043 | 1.04 |
| NA-I | 0.772 | 0.750 | 0.721 | 0.765 | 0.800 | 0.762 ± 0.029 | 0.96 |
| AI | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.067 | 0.071 | 0.067 ± 0.003 | 0.07 |
| BB | 0.063 | 0.064 | 0.061 | 0.062 | 0.085 | 0.067 ± 0.010 | - |
| AA | 0.069 | 0.065 | 0.076 | 0.085 | 0.056 | 0.070 ± 0.011 | - |

*在相同光照剂量下与空白对照组比较 $P < 0.05$ 。

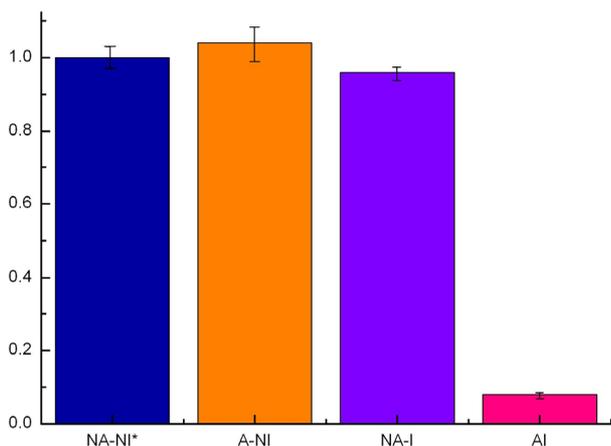


Figure 3. The influence of 410 nm light irradiation on the survivability of HL60 cell in the experiments based on ALA-PDT measured by CCK-8{10 mmol/L ALA(4 h) + (18 J/cm²) + CCK-8(4 h)}
图 3. 410 nm 辐照波段在 ALA-PDT 实验中对 HL60 细胞存活率的影响{10 mmol/L ALA(4 h) + (18 J/cm²)+CCK-8(4 h)}

加入和光辐照的单独作用，而是由于 ALA 与光照相结合(AI)而产生的光动力作用杀伤，HL60 细胞的光动力致死性首先依赖于 HL60 细胞的肿瘤特性。

灭活 HL60 的 PDT 效率用 P_e 表示，可求出 410 nm 光照下的 PDT 效率，如式(2)：

$$P_e = 1 - S = 1 - R_{AI} \quad (2)$$

则波长 410 nm 辐照的 PDT 效率 P_e 为 93%。

对 410 nm 光来说，在既加入 ALA 又接受光的辐照情况下对 HL60 有将近 93%的灭活率，可见 410 nm 是对 ALA-PDT 导致 HL60 细胞死亡的最敏感波长。而 410 nm 也是 PpIX 的吸收峰，这正是它在 ALA-PDT 导致 HL60 细胞死亡时具有较好灭活效果的原因所在。

3.2. 基于 ALA-PDT 的 HL60 细胞亚细胞光漂白实验研究

3.2.1. 不加光敏剂时光照对 HL60 亚细胞器荧光强度的影响

如图 4，在没有 ALA 的参与下，细胞器的荧光强度在 18 J/cm² 的光剂量光照下，荧光强度并没有显著变化，保持数值平坦。同时，由于 PpIX 的吸收峰在 410 nm 附近，荧光峰在 630 nm 附近，而上述的三种荧光探针的激发波长都没有与之重叠，并且彼此还有一段距离，因此，测量的可靠性得到了保证。

3.2.2. 加 ALA 光敏剂时光照对 HL60 亚细胞器荧光强度的影响

410 nm 波长光照时，线粒体荧光强度变化的归一化图线如图 5 所示；溶酶体荧光强度变化的归一化图线如图 6 所示；内质网荧光强度变化的归一化图线如图 7 所示。

图 5 中，线粒体在 410 nm 光照后的总体荧光强度变化呈指数下降。在 15 min 到 45 min，线粒体荧光强度下降最快，表示光敏剂对线粒体的灭活效应集中在这个时段。从 0 min 到 60 min，线粒体的荧光强度下降了 95%。图 6 中，溶酶体的荧光强度在开始辐照后的前 15 分钟内下降缓慢，15 分钟后下降近似于线性，平均下降速度约为每 15 分钟 27%。到 60 min 时，溶酶体的荧光强度骤降到不到原来的 9%。图 7 中，相比于线粒体和溶酶体的荧光强度变化，内质网的荧光强度变化显得更加缓慢。同时我们注意到，光照 45 min 钟后，内质网的荧光强度仅下降了 48.5%。而在

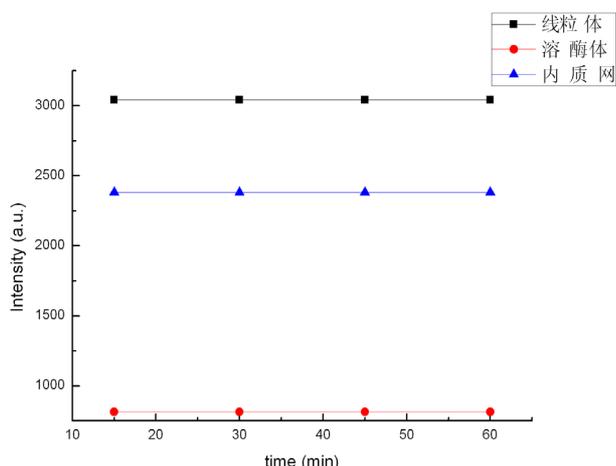


Figure 4. Sub-cell fluorescence intensity of HL60 cells without ALA
图 4. 不加光敏剂时光照对 HL60 亚细胞器荧光强度的影响

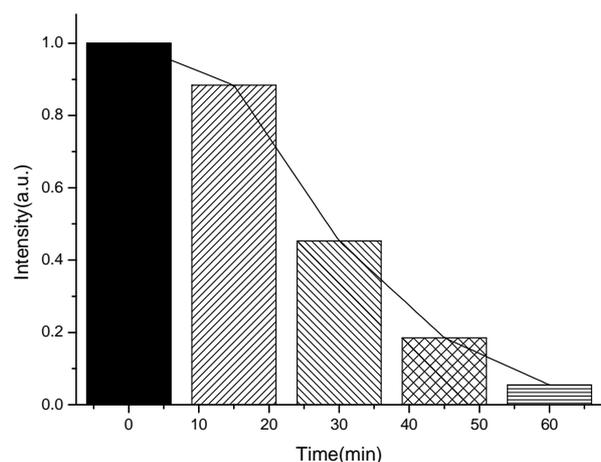


Figure 5. The normalized fluorescence intensity of mitochondria with ALA under 412 nm light irradiation
图 5. 410 nm 光照时线粒体荧光强度变化的归一化

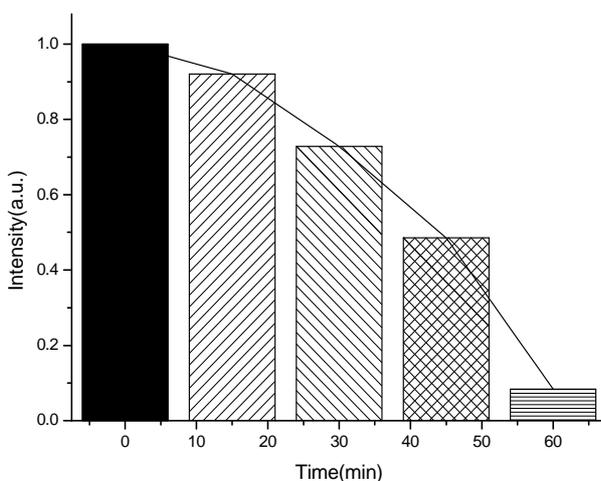


Figure 6. The normalized fluorescence intensity of lysosomes with ALA under 412 nm light irradiation
图 6. 410 nm 光照时溶酶体荧光强度变化的归一化

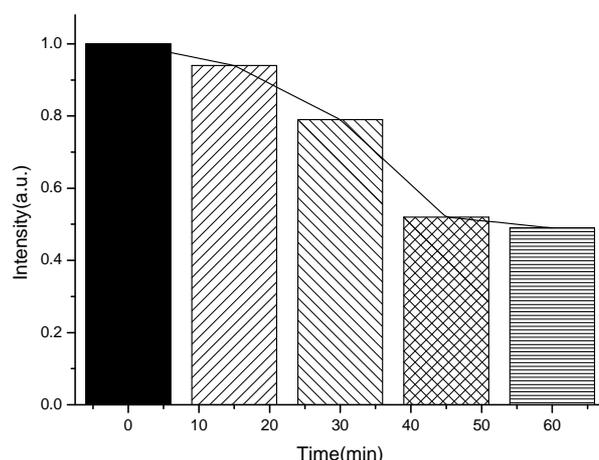


Figure 7. The normalized fluorescence intensity of endoplasmic reticulum in HL60 cells with ALA under 412 nm light irradiation
图 7. 410 nm 光照时内质网荧光强度的归一化

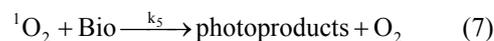
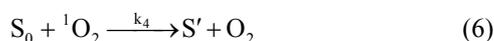
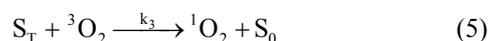
45 min 到 60 min 这段时间, 其荧光强度变化更小, 仅下降了 3%左右。结合前面的 ALA-PDT 实验, 当用 410 nm 光辐照 60 min 后, HL60 细胞灭活率达到 93%, 与线粒体荧光强度下降 95%接近, 线粒体的荧光强度的变化基本上表征了细胞的活性变化。

对于 HL60 细胞来说, PpIX 对内质网的黏附选择性不高, 远低于线粒体和溶酶体, 对于这三种细胞器, 单态氧参与到光动力反应的程度也不尽相同, 具体是线粒体大于溶酶体大于内质网, 由此可见线粒体是光敏化作用的主要反应位点。

在整个辐照时间段内, 其荧光溶酶体和内质网荧光强度下降远小于线粒体荧光强度的下降。暗示是由于线粒体附近的光敏剂 PpIX 产生的单态氧量比溶酶体的大, 使得线粒体的自敏光敏化反应相对来说更加剧烈, 即光漂白现象更加明显。

3.3. ALA 介导 PDT 光漂白反应原理的探讨

相关研究已证实 ALA 在 HL60 细胞悬液中的光漂白以单态氧介导为主^[15,16]。假定氧充足, 单态氧介导的光动力反应过程中的主要反应有:



3) 表示光敏剂吸收光子跃迁为激发单线态光敏剂。

4) 表示寿命非常短的单线态光敏剂转化为寿命相对较长的三线态。

5) 表示三线态光敏剂与基态氧反应生成单线态氧。

6) 表示光敏剂产生的单线态氧与基态光敏剂反应生成没有光敏活性的物质, 即光漂白。

7) 表示单线态氧与生物大分子(蛋白、脂质等)反应损伤组织, 或生成自由基等活性物质。

k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 、 k_5 为各步反应的反应速率常数。从上述反应过程可以看出, 光敏剂的光漂白是光动力反应的一个伴随过程, 而且是一种链式反应。其中反应(6)的具体反应过程包含一系列复杂的光物理和光化学反应, 而到目前为止, 大多数光敏剂的光漂白过程尚不十分清楚, 有待进一步的深入研究。

4. 结论与讨论

光动力效应可能导致亚细胞结构内产生不同数量的单线态氧, 会引起不同程度的光漂白作用。410 nm 光辐照 60 min 后, 线粒体, 溶酶体, 内质网的荧光强度下降对应为: 95%、91.5%、51.2%。对于 HL60 细胞来说, 亚细胞器的光漂白程度为: 线粒体 > 溶酶体 > 内质网。线粒体区域光漂白速率较快, 而且线粒体的荧光强度的变化也基本上表征了细胞的活性变化, 由此推断线粒体是光敏化作用的主要反应位点。

当光敏剂 ALA 受到光照时, 就会从基态跃迁到激发态, 生成的内源光敏剂 PpIX 就会与周围的单态氧发生光敏化作用, 由于单态氧存在的时间极短, 只有 ns 数量级^[17], 这就意味着施加光照因素后各细胞器荧光光强的降低实际上反映的是各细胞器内光敏剂含量的减少; 也能从一个方面体现各个细胞器内光敏化反应和光敏剂自敏光敏化反应的程度, 反过来证实光敏化反应中活性氧物质的产生数量的多少。

光动力疗法中, 光敏剂的光漂白有利有弊^[18]。光漂白造成反应体系中的光敏剂含量的减少, 对于要破坏的靶组织来说, 漂白会降低 PDT 过程中活性物质的产量, 从而减小光动力治疗肿瘤的损伤范围, 起一种负面作用。而对于肿瘤周围的正常组织来说, 光漂白通过降低组织中活性物质的产量, 使其损伤作用小于

组织的光动力损伤闭值, 对正常组织起到保护作用。

5. 致谢

这篇文章得到了国家自然科学基金(61072029)、广东省自然科学基金(10151063101000025)和广州市科技计划项目(2010Y1-C111)大力支持, 在此表示感谢。

参考文献 (References)

- [1] J. S. Dysart, M. S. Patterson, T. J. Farrell, et al. Relationship between mTHPC fluorescence photobleaching and cell viability during *in vitro* photodynamic treatment of DP16 cells. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75(2): 289-295.
- [2] J. Tyrrell, S. M. Campbell and A. Curnow. Monitoring the accumulation and dissipation of the photosensitizer protoporphyrin IX during standard dermatological methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy utilizing noninvasive fluorescence imaging and quantification. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2011, 8(1): 30-38.
- [3] C. P. Chang, D. J. Nagel and M. E. Zaghoul. Irradiance dependence of photobleaching of resorufin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2011, 217(2): 430-432.
- [4] J. S. Dysart, G. Singh and M. S. Patterson. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochemistry and Photobiology*, 2005, 81(1): 196-205.
- [5] J. S. Dysart, M. S. Patterson. Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Physics in Medicine and Biology*, 2005, 50(11): 2597-2616.
- [6] W. S. Strauss, R. Sailer, M. H. Gschwend, et al. Selective examination of plasma membrane associated photosensitizers Using total internal reflection fluorescence spectroscopy: Correlation between photobleaching and photodynamic efficacy of protoporphyrin IX. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, 67(3): 363-369.
- [7] P. M. Msc, A. Juzeniarea and J. Moan. The effect of lidocaine on PpIX photobleaching and outcome of ALA-PDT *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2007, 4(4): 249-253.
- [8] I. A. Boere, D. J. Robinson, H. W. Tilanus, et al. Monitoring *in situ* dosimetry and protoporphyrin IX fluorescence photobleaching in the normal rat esophagus during 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 78(3): 271-277.
- [9] H. Zeng, M. Korbelik, D. I. Mclean, et al. Monitoring photoproduct formation and photobleaching by fluorescence spectroscopy has the potential to improve PDT dosimetry with a verteporfin-like photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75(4): 398-405.
- [10] J. Moan, G. Streckyte, S. Bagdonas, et al. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *International Journal of Cancer*, 1997, 70(1): 90-97.
- [11] J. Tyrrell, S. M. Campbell and A. Curnow. Protoporphyrin IX photobleaching during the light irradiation phase of standard dermatological methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2010, 7(4): 232-238.
- [12] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 526-531.
- [13] 张镇西, 张苏娟, 张宝琴等. 氨基酮戊酸光动力学疗法杀伤白血病细胞的实验研究[J]. *中国激光医学杂志*, 2005, 14(4): 249-252.
- [14] 肖化, 熊建文, 吴继明等. ALA-PDT 对白血病肿瘤细胞作用

- 的参数研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(5): 353-357.
- [15] M. B. Ericson, F. Gudmundson, A. M. Wennberg, et al. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. *Lasers in Medical Science*, 2004, 18(1): 56-62.
- [16] J. Tyrrell, S. M. Campbell and A. Curnow. The effect of air cooling pain relief on protoporphyrin IX photobleaching and clinical efficacy during dermatological photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011, 103(1): 1-7.
- [17] J. Moan and K. Berg. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 1991, 53 (4): 549-553.
- [18] S. Bagdonas, L. W. Ma, P. Juzenas, et al. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: A spectroscopic study. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, 72(2): 186-192.