

A549 폐암세포주에서 ALA와 632nm Diode Laser를 이용한 광역학치료 유도성 세포사

단국대학교 의과대학 내과학교실

김윤섭, 박재석, 지영구, 이계영

=Abstract=

Photodynamic Therapy induced Cell Death using ALA and 632nm Diode Laser in A549 Lung Cancer Cells

Youn Seup Kim, M.D., Jae Seuk Park, M.D.,
Young Koo Jee, M.D., Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Background : Photodynamic therapy (PDT) is a new therapeutic method aimed at the selective destruction of cancer cells. The outcome is death of cancer cells through apoptosis or necrosis. The aim of this study was to investigate the characterization of PDT induced cell death in A549 lung cancer cells.

Materials and methods : A549 cells were used as the lung cancer cell. 5 aminolevulinic acid (ALA) was used as the photosensitizer and a 632nm diode laser (Biolitec, Germany) as the light source. Cells were incubated with various concentrations of ALA. The 632nm diode laser was then administered for various laser irradiation times. The treated cells were incubated with 24, 48 and 72 hours. The cell viabilities were measured using the crystal violet assay and light microscopy. To observe the cell death mechanism after PDT, cells were observed under fluorescence microscopy after double staining with Hoechst 33342 and propidium iodide after PDT.

Results : In the crystal violet assay at 24 hours after PDT with a 3.2 J/cm^2 laser irradiation power, the cell viabilities were 89.56 ± 4.11 , 87.67 ± 5.48 , and 69.37 ± 8.84 with ALA concentrations of 10, 100, and 1 mg/ml, respectively. In crystal violet assay at 24 hours after PDT with 1mg/ml of ALA, the cell viabilities were 74 ± 19.85 , 55 ± 6.1 , and $49.06 \pm 16.64\%$ with 1.6, 3.2 and 6.4 J/cm^2 laser irradiation

[†] 이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

Address for correspondence :

Youn Seup Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dankook University

San29, Anseo dong, Cheonan, Choong Nam, 330-714, Korea

Phone : 041-550-3911 Fax : 041-556-3256 E-mail : drys99@dankook.ac.kr

powers, respectively. However, increasing the interval time after PDT did not change the cell viabilities. In the apoptosis assay, photodynamic therapy was inducing the apoptotic cell death.

Conclusions : This study shows the apoptotic anticancer effect of photodynamic therapy in A549 lung cancer cells. However, further evaluations with other cancer cells and photosensitizers are necessary. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:178-186)

Key words : Photodynamic therapy, 5 aminolevulinic acid, Cell death, Apoptosis.

서 론

광역학치료(Photodynamic therapy, PDT)는 체내의 풍부한 산소, 외부에서 공급되는 레이저(laser) 그리고 레이저 빛에 예민한 반응을 보이는 광감작제(photosensitizer)를 이용한 새로운 암 치료 방법이다¹. 광역학치료의 역사는 1910년에 Hausman이 hematoporphyrin(Hp)을 마우스에 주입 후 빛에 노출시켰을 때 광과민 반응을 보인다는 것을 보고한 이후로 1960년대에 hematoporphyrin derivative (HpD)의 개발로 활성화 되었으며 1980년대 초부터 본격적인 연구와 함께 임상에서 사용되었고 1990년대에 이르러 새로운 암 치료방법으로 세계 여러 나라에서 인정 받게 되었으며 최근에 들어서는 항암 효율성에 있어 점차적으로 인정을 받게 이르렀다².

폐암 영역에서는 1982년에 Hayata 등에 의해 처음으로 광역학치료가 시행되었다. 그 후로 많은 증례에서 폐암 환자, 특히 주기관지 폐쇄를 가지는 환자에서 광역학치료가 시행되었으며 대부분 방사선치료나 레이저치료보다 뛰어난 치료의 지속시간과 성적을 보여주고 있다. 최근에는 수술 전에 광역학치료를 시행함으로써 수술의 범위를 줄이는 효과와 함께 치료성적의 향상을 보이고 있으며 특히 폐암의 주요 원인이 장기간의 흡연이기에 폐기능 저하 환자의 치료에 있어 더욱더 가치가 부여되고 있다⁴⁻⁶. 광역학치료에 대한 반응은 사용된 광감작제, 레이저에 의한 빛의 조사조건, 조직의 산

소포화 상태, 그리고 세포의 종류에 따라서 좌우되는 것으로 알려져 있다⁷.

이에 본 연구에서는 A549 폐암세포주를 이용한 광역학치료에서 광감작제의 농도, 레이저의 조사량, 그리고 시간의 경과에 따른 세포독성의 변화와 세포사의 특징으로 아포프토시스 유무를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

폐암세포주로 A549 세포주를 RPMI 1640(Gibco-BRL) 배지에 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 그리고 1% penicillin/streptomycin 등을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 광감작제 및 레이저

광감작제로는 ALA(5-aminolevulinic acid) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, ALA의 농도는 10 µg/ml, 100 µg/ml, 그리고 1 mg/ml를 사용하였다. 레이저는 632 nm Diode 레이저(Biolitec, Germany)를 이용하였다. 레이저 조사량은 400 mW의 세기로 15분(1.6 J/cm²), 30분(3.2 J/cm²), 그리고 60분(6.4 J/cm²) 으로 하였으며 광감작제를 투여 후 4시간에 레이저를 조사하였다.

3. Crystal violet assay

광역학치료에 따른 세포독성을 알아보기 위하여 crystal violet assay를 이용하였다. 방법으로는 A549 폐암세포를 실험계획에 따라 24-well 세포배양 접시에 넣어서 배양한 후 정해진 시점에 배양액을 제거하고 crystal violet staining 용액을 500 μ l씩 넣은 후 실온에서 15분 정도 방치하였다. 그리고 crystal violet staining 용액을 제거하고 3차 증류수로 3-4회 정도 세척을 한 후 물기를 완전히 제거하도록 실온에 30분간 방치하였다. 다음으로 1% SDS 용액을 500 μ l씩 넣어 세포를 용해시켜 96-well 세포배양 접시에 각 well당 100 μ l씩 분주하여 ELISA plate reader 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Apoptosis assay

광역학치료 후에 세포사의 형태로 아포프토시스 유무를 관찰하기 위해 형광색소인 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)를 동시에 처리해서 세포를 염색한 후 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 간단히 요약하면 A549 폐암세포주를 6-well 세포배양 접시에 넣어서 키운 후 광감작제의 사용과 레이저를 실험계획에 따라 조사한 후 세포를 수확해서 PBS로 세척하고 원심분리를 해서 상층액은 버리고 pellet은 PBS로 resuspension 시킨 후 형광색

소인 bisbenzimidazole Hoechst 33342 (50 μ g/ml)를 취해 15분 동안 상온(어두운 곳)에서 배양시키고 다시 원심분리를 해서 상층액은 버리고 다시 pellet을 PBS로 resuspension시킨 후 propidium iodide (PI ; 1mg/ml)를 넣어서 암실에서 형광 현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. A549 폐암세포주에서의 광역학치료-유도성 세포독성

A549 폐암세포주에서 광역학치료에 대한 세포독성을 알아보기 위해 배양된 세포주를 24-well plate에 분주한 후 ALA를 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 그리고 1 mg/ml의 농도로 투여하고 4시간 후 레이저를 400 mW의 세기로 30분(3.2 J/cm²)동안 조사하였다. 24시간 후에 crystal violet assay로 세포생존율을 조사한 결과, ALA의 농도에 따른 세포생존율은 10 μ g/ml에서는 89.56 \pm 4.11%, 100 μ g/ml에서는 87.67 \pm 5.48%, 그리고 1 mg/ml의 농도에서는 69.37 \pm 8.84%의 결과를 보여 ALA의 농도 증가에 따른 세포생존율의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 광학현미경상으로 관찰한 결과에서도 ALA의 농도증가에 따른 세포생존율의 감소를 역시 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. A549 폐암세포주에서 레이저 조사량에 따른 세포독성

레이저 조사량의 변화에 따른 A549 폐암세포주에서의 광역학치료에 의한 세포독성의 영향을 알아보았다. ALA의 농도는 1 mg/ml를 이용하였고 레이저의 조사량은 400 mW의 세기로 15분(1.6 J/cm²), 30분(3.2 J/cm²), 그리고 60분(6.4 J/cm²)으로 하였으며 광감작제를 투여 후 4시간에 레이저를 조사하였다.

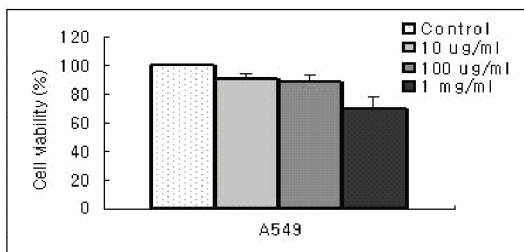


Fig. 1. ALA dose-dependent PDT-induced cell death in A549 cells by crystal violet assay.

— Photodynamic therapy induced cell death using ALA and 632nm diode laser in A549 lung cancer cells —

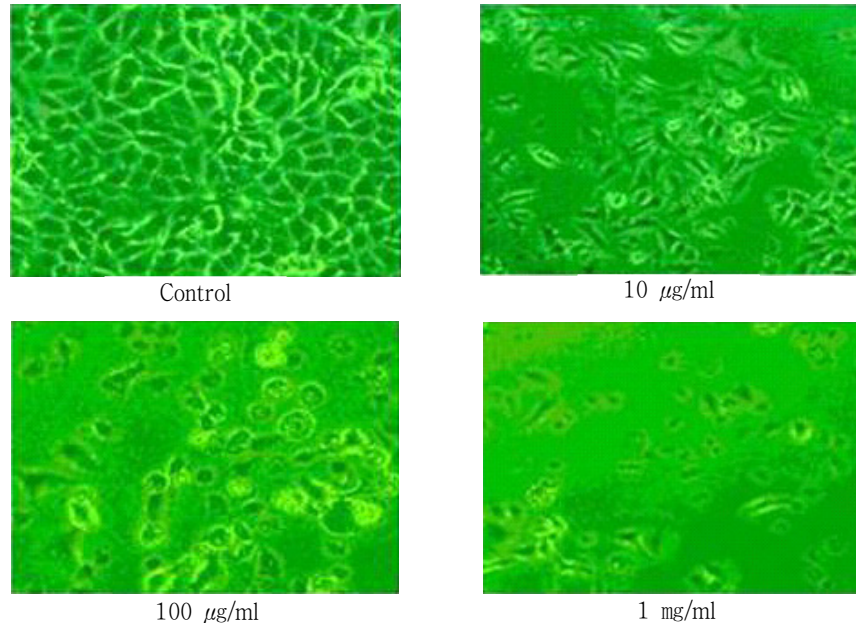


Fig. 2. ALA dose-dependent PDT-induced cell death in A549 cells by light microscopy.($\times 100$)

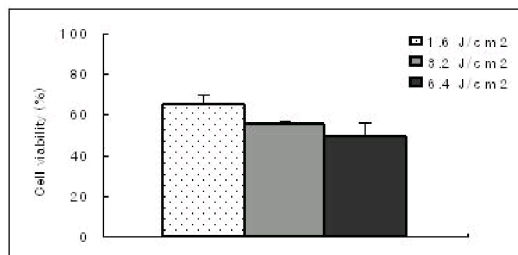


Fig. 3. Laser irradiation dose-dependent PDT-induced cell death in A549 cells by crystal violet assay.

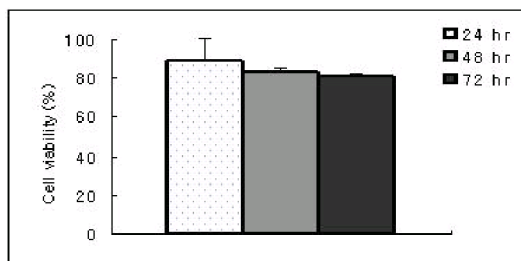


Fig. 4. Time-independent PDT-induced cell death in A549 cells by crystal violet assay.

24시간 후에 crystal violet assay로 세포생존율을 조사한 결과, 레이저의 조사량을 $1.6 J/cm^2$ 으로 했을 때 생존율은 $64.74 \pm 9.85\%$, $3.2 J/cm^2$ 에서는 $55.61 \pm 6.1\%$, 그리고 $6.4 J/cm^2$ 에서는 $49.06 \pm 6.64\%$ 의 결과를 보여 레이저의 조사량 증가에 비례해서 세포생존율이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3. A549 폐암세포주에서 광역학치료 후 시간의 경과에 따른 세포독성

광역학치료 후 시간의 경과에 따른 A549 폐암세포주에서의 세포독성의 변화를 살펴보았다. ALA의 농도는 $100 \mu g/ml$, 레이저의 조사량은 400 mW의 세기로 30분($3.2 J/cm^2$)으로 하였다. 시간의 경과에 따른 세포생존율의 변화는 레이저 조사 후 24시간, 48시간, 그리고 72시간 후에 관찰하였다. Crystal violet assay로 관찰한 결과 24시간 후에는 $88.7 \pm 12.2\%$, 48시간 후에는 $83 \pm 2.0\%$, 그리고 72시간 후에는 $80.98 \pm 1.7\%$ 로 큰 차이를 보이지는 않았다. 따

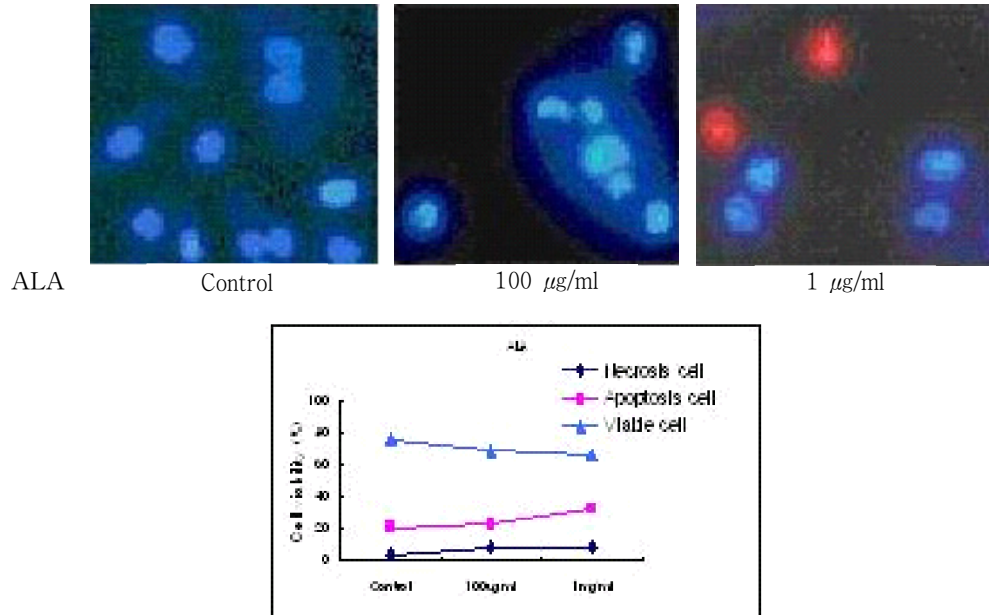


Fig. 5. PDT-induced apoptosis in A549 cells by fluorescent microscopy after double staining with Hoechst 33342 and propidium iodide.

라서 A549 폐암세포주에서는 광역학치료 후 시간의 경과에 따른 세포생존율의 변화는 일어나지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

4. A549 폐암세포주에서 광역학치료-유도성 세포사의 특징

A549 폐암세포주에서 광역학치료에 의한 세포사의 형태학적 특징이 세포괴사인지 혹은 아포프토시스인지에 대해서 알아보고자 하였다. ALA의 농도는 100 µg/ml, 1 mg/ml의 농도를 사용하였고 레이저의 조사량은 400 mW의 세기로 30분(3.2 J/cm²)으로 하였다. A549 폐암세포주를 광역학치료 한 후에 형광색소인 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)로 DNA를 이중염색한 후 형광현미경으로 세포들을 관찰하였다. 그 결과 아포프토시스가 세포사의 주요특징으로 관찰되었으며 1 mg/ml의 농도에서는 일부 괴사된 세포가 관찰되었다. 이를 수치

화해서 그래프로 표시한 결과를 보면 ALA의 농도가 증가함에 따라서 세포사의 증가가 일어나고 이에 비례해서 아포프토시스가 세포사의 형태로 증가함을 보여주고 있으나 괴사된 세포의 정도는 ALA의 농도 증가에 따라서 변화가 미미하여 A549 폐암세포주에서 광역학치료에 의한 세포사의 특징은 아포프토시스임을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

광역학치료의 원리는 체내의 산소와 빛에 예민한 반응을 보이는 물질인 광감작제가 레이저의 빛에 의하여 화학적인 반응을 일으켜 생성되는 단일항 산소(singlet oxygen)와 자유라디칼(free radical)이 세포를 파괴하는 것을 이용하는 치료 방법이다⁸. 광감작제는 광역학치료의 핵심물질로 세포내에 주입되어 빛을 받으면 여기상태(excited state)가 되

고 이 에너지를 산소분자에 전달하며 활성산소를 발생하여 세포를 사멸시키게 된다. 광역학치료에서의 빛은 porphyrin을 활성화시키는 요소로 레이저를 통해서 빛을 발생시키게 된다⁹.

광역학치료의 개념은 아크리딘 염색약(acridine dye)에 노출된 짚신벌레(parametia)가 광선에 노출된 후 죽는 것을 1900년에 Raab이 관찰한 이후 발전되어 왔으며 임상적으로는 1980년대부터 본격적으로 연구되었고 1990년대 들어 캐나다, 독일, 일본 등에서 임상시술이 승인되었으며 미국에서도 1996년 1월에 식도암 치료방법의 하나로써 FDA의 공인을 받았고 1997년 9월에는 초기 폐암치료의 치료방법으로 공인을 받게 이르렀다².

광역학치료의 항암 효과는 크게 4가지 기전에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 첫째, 활성산소의 직접 효과로 세포내 구조조직인 미토콘드리아, 세포막 등의 물리화학적 손상을 유도함으로써 종양세포의 괴사를 일으킨다. 둘째, 혈관에 미치는 효과로 혈관에 손상을 일으킴으로써 혈류속도의 감소 및 혈행정지를 유발하여 종양세포의 산소결핍과 종양괴사를 유도한다. 셋째, 면역학적인 효과로 T-세포와 대식세포의 활성화를 유발하여 다양한 염증 매개체의 분비와 종양세포의 직접적인 탐식작용을 일으켜서 종양의 퇴행에 기여한다. 넷째, 아포프토시스의 유도도 종양세포의 사멸을 일으킨다^{10,11}.

폐암 뿐만 아니라 여러 질환의 병태생리와 치료에 아포프토시스가 관여한다는 것이 잘 밝혀짐에 따라 광역학치료 영역에서도 아포프토시스에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다. 앞서 언급하였듯이 빛을 흡수하는 물질과 빛을 방출하는 레이저가 항암효과를 유발한다는 원리를 이용하는 광역학치료는 현재 항암 치료의 분야에서 널리 연구되어지고 있으며 세포 생물학의 여러 분야에서 활용되고 있다. 체외실험 연구에서 광감작제와 빛을 가지고 종양세포에 치료시 아포프토시스가 신속하게 발생하는

것이 보고되었다. 그러나 광감작제나 빛 자체는 세포손상에 영향을 미치지 않는다는 본 연구에서도 결과에는 보여주지 않았으나 광감작제나 레이저 빛 자체를 A549 폐암세포주에 처리한 군과 대조군과의 세포생존율에는 차이가 관찰되지 않았다.

아포프토시스는 체외실험, 체내실험 모두에서 광역학치료 후의 세포사에 혼한 기전으로 알려져 있다. 최근의 연구 보고에 의하면 세포의 광역학치료에 대한 반응은 일부의 손상된 것의 복구를 위한 반응과 대부분의 아포프토시스나 세포괴사에 의한 세포사에 의해 이루어진다고 알려져 있다¹²⁻¹⁵. 체내실험 연구에서 광역학치료 후에 종양조직 내에서 아포프토시스와 괴사가 같이 발생한다고 보고되고 있으나 아포프토시스의 유도가 전반적인 종양의 반응인지, 직접적인 손상의 결과인지, 혈관과 염증반응의 이차적인 결과인지 혹은 이들 효과의 복합적인 것인지에 대해서는 아직까지 분명하지는 않다. 체외실험 연구에서도 대부분의 세포들에서 광역학치료의 반응으로 아포프토시스가 세포사의 주요 형태로 보고되고 있으며 본 연구에서도 A549 폐암세포주에서 광역학치료-유도성 세포사의 형태로 아포프토시스가 주로 관여한다는 것을 확인할 수 있었다¹⁶⁻²⁰.

광역학치료에 대한 반응은 사용되어진 광감작제, 레이저에 의한 빛의 조사조건, 조직의 산소포화 상태, 세포의 종류에 따라서 좌우된다. 이 중에서 광감작제의 세포내 분포 부위가 특히 중요한데 이는 일차적인 손상의 부위를 결정하기 때문이다. 따라서 세포내에 높은 광감작제의 농도와 높은 산소포화 농도를 가질 때 빛의 조사에 따른 세포손상은 더욱더 크게 받게된다. 그러나 광감작제는 종양의 조직에 매우 높은 농도로 침투하나 이 자체가 활성화되어 세포독성을 야기하지는 않는다⁷. 여러 광감작제들의 세포내 분포 부위는 여러 가지 요소들에 의해 좌우되는데 광감작제의 친지질성과 전하상태와 같은 광감작제의 물리화학적 성질이 매우

중요하다. Photofrin와 Photogem 같은 친지질성 광감작제나 ALA-유도성 protoporphyrin IX(PpIX)는 주로 미토콘드리아, 소포체, 세포질막, 핵막, 그리고 세포핵 주변에 주로 축적되나 리소솜과 세포핵에는 훨씬 적은 양이 분포한다. 반면에 Photosense와 같은 친수성 광감작제는 리소솜에 주로 축적된다. 아포프토시스 과정에 있어서 중요한 위치인 미토콘드리아 부위에 광감작제의 축적은 치료받은 세포들에 있어 비교적 빠른 아포프토시스가 일어난다^{21,22}.

현재까지 개발되어 임상적으로 사용되고 있는 광감작제는 개발순서에 따라 1세대, 2세대, 그리고 3세대 등으로 분류하나 Photogem, Photofrin, 그리고 ALA 등과 같은 1세대 물질은 많은 임상경험 등을 통해 현재 각국의 보건 당국으로부터 허가를 받고 사용되고 있으며 국내에서는 Photofrin과 Photogem이 식약청의 허가를 획득하여 시판중이다. 그 밖의 물질들은 실험실 연구 등으로 이용되어 지고 있다. 본 연구에서 사용된 광감작제인 ALA는 heme의 생합성 경로내의 대사 전구물질로 heme의 전구물질인 Protoporphyrin IX(PpIX)의 생성을 촉진하여 광역학치료에 이용되어지고 있으며, 크림 형태의 ALA의 개발로 피부에 쉽게 투여할 수 있고 빛의 조사가 간편한 관계로 주로 피부 영역에서 사용되었으나 최근에는 호흡기 분야 뿐만 아니라 다른 분야에도 이용되고 있는 추세이다^{23,24}. 앞서 언급하였듯이 광역학치료에 대한 반응은 사용되어진 광감작제와 레이저에 의한 빛의 조사조건 등에 의해서 좌우된다. 본 연구에서도 ALA의 농도가 증가함에 따라 농도-의존적으로 A549 폐암세포의 생존율의 감소가 관찰되었으며, 레이저의 조사량 증가에 따라 조사량-의존적으로 생존율의 감소가 관찰되었다.

본 연구결과는 A549 폐암세포주라는 단일 폐암세포주에서 확인된 것으로 광역학치료의 반응이 세포의 종류에 따라서 좌우됨을 고려해보면 다른

폐암세포주를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각되며, ALA 외에 다른 광감작제에 대한 반응 또한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 더욱이 광역학치료가 유발하는 아포프토시스 과정에 있어 세포전달경로에 미치는 광역학치료의 영향에 대한 연구는 아직 광범위하게 진행되어 있지는 않기에 향후 실험을 확장하여 진행할 예정이다.

요 약

연구배경 :

광역학치료는 체내의 풍부한 산소, 외부에서 공급되는 레이저 그리고 레이저 빛에 예민한 반응을 보이는 광감작제를 이용한 새로운 항암치료 방법으로, 그 원리는 체내의 산소와 빛에 예민한 반응을 보이는 광감작제가 레이저에 의하여 화학적인 반응을 일으켜 생성되는 단일항 산소와 이에 의하여 유발되는 자유라디칼이 암세포를 손상시키는 것이다. 광역학치료에 의한 세포사의 주요 형태로 아포프토시스가 관여한다고 알려져 있다. 이에 저자들은 A549 폐암세포주에서의 광역학치료에서 세포독성이 광감작제의 농도, 레이저 조사량, 그리고 시간의 경과에 따라서 어떠한 양상으로 나타나는지 그리고 세포사의 특징으로 아포프토시스 유무에 대해서 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

폐암세포주로 A549 폐암세포주를 이용하였고, 광감작제로 ALA를, 그리고 레이저는 632nm diode 레이저를 사용하였다. ALA의 용량은 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 1 mg/ml 를 사용하였고 레이저의 조사량은 1.6, 3.2, 6.4 J/cm^2 이었다. 세포독성 검사는 crystal violet assay를 이용하였고 아포프토시스 유무는 Hoechst 33342 와 propidium iodide 이중염색 방법을 이용하여 분석하였다.

결 과 :

A549 폐암세포주에서 ALA를 이용한 광역학치료

시 ALA의 농도증가에 따른 세포독성의 증가가 관찰되었고 또한 레이저의 조사량 증가에 따라서도 세포독성의 증가가 관찰되었다. 그리고 세포독성의 형태는 아포프토시스를 확인할 수 있었다. 그러나 광역학치료 후 시간의 경과에 따른 세포독성의 변화는 관찰되지 않았다.

결 론 :

ALA를 이용한 광역학치료는 A549 폐암세포주의 항암효과가 있음을 알 수 있었으며 이는 아포프토시스의 유도에 의해 이루어짐을 확인할 수 있었다. 향후 광역학치료-유도성 아포프토시스의 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Carl D. Update on photodynamic therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11:166-70.
2. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. *Laryngoscope* 1998;108:1259-68.
3. Hayata Y, Kato H, Konaka C, Ono J, Takizawa N. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest* 1982;81:269-77.
4. Lam S, Kostashuk EC, Coy P. A randomized comparative study of the safety and efficacy of photodynamic therapy using Photofrin II combined with palliative radiotherapy versus palliative radiotherapy alone in patients with inoperative obstructive bronchogenic carcinoma. *Photochem Photobiol* 1987;46:893-7.
5. Moghissi K, Dixon K, Parsons RJ. A controlled trial of Nd-YAG laser vs photodynamic therapy for advanced malignant bronchial obstruction. *Lasers Med Sci* 1993;8:269-73.
6. Tom GS, Pieter EP. Photodynamic therapy in lung cancer. A review. *Photochem Photobiol* 1996;36:199-204.
7. Peng Q, Moan J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol* 1996;20:109-29.
8. Hampton JA, Selman SH. Mechanism of cell killing in photodynamic therapy using a novel in vivo /in vitro light culture system. *Photochem Photobiol* 1992;56:235-43.
9. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res* 1998;150:S146-56.
10. Moan J, Berg K. Photochemotherapy of cancer: Experimental research 1992;55:931-48.
11. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992;55:145-57.
12. Zaidi SIA, Oleinick NL, Zaim MT, Mukhtar H. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: Electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem Photobiol* 1993;58:771-6.
13. Agarwal R, Korman NJ, Mohan RR, Feyes DK, Jawed S, Zaim MT, Mukhtar H. Apoptosis is an early event during phthalocyanine photodynamic therapy-induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin. *Photochem Photobiol* 1996;63:547-52.
14. Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in

- vivo. *J Photochem Photobiol B* 1996;35:209-11.
15. Zhou G, Shunji C, Jinsheng D, Junlin L, Jori G, Milanesi C. Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by photodynamic therapy with Zn(II)-phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B* 1996;33:219-33.
16. Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Apoptosis and necrosis Induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer* 1996;74:22-9.
17. Ben-Hur E, Oetjen J, Horowitz B. Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light causes apoptosis in HIV-infected cells. *Photochem Photobiol* 1997;65:456-60.
18. Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol* 1997;66:479-83.
19. Fisher AMR, Danenberg K, Banerjee D, Bertino JR, Danenberg P, Gomer CJ. Increased photosensitivity in HL60 cells expressing wild-type p53. *Photochem Photobiol* 1997;66:265-70.
20. Separovic D, Mann KJ, Oleinick NL. Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death. *Photochem Photobiol* 1998;68:101-9.
21. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996;64:469-85.
22. Kessel D. Symposium-in-Print: Subcellular localization of photosensitizing agents. *Photochem Photobiol* 1997;65:387-8.
23. Baumgartner, R, Huber RM, Schulz HJ, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth. Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B* 1996;36:167-74.
24. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 2000;54:72-80.