

대장암세포주에 대한 광역학치료의 효과

대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹PDT연구회, ²울산대학교 의과대학 외과학교실

이한일 · 최동락 · 주대현 · 박기혁 · 박성환 · 유용운 · 박기호 · 신임희¹ · 신동건¹ · 김종기¹ · 조창호¹
김진천²

The Effect of Photodynamic Therapy on Colon Cancer Cell Line

Han Il Lee, M.D., Dong Rak Choi, M.D., Dae Hyun Joo, M.D., Ki Hyuk Park, M.D., Sung Hwan Park, M.D., Yong Oon Yu, M.D., Ki Ho Park, M.D., Im Hee Shin, M.D.¹, Dong Gun Shin, M.D.¹, Jong Ki Kim, M.D.¹, Chang Ho Cho, M.D.¹, Jin Cheon Kim, M.D.²

Departments of Surgery and ¹PDT Study Group, Catholic University of Daegu, Daegu, ²Department of Surgery, University of Ulsan and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new technology for an alternative modality in the treatment of colorectal cancers. This study was conducted to identify the appropriate dosage and energy level for the photosensitizer as well as effect of PDT on colon cancer cells.

Methods: Colon cancer cell line, COLO 205 (American Type Culture Collection, ATCC) was obtained from Korea Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea). Cells were cultured on RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum, penicillin, and gentamicin. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ air environment. Photosense (sulphonated aluminum phthalocyanine, AlPcS₄, NIOPIK, State Research Center, Moscow, Russia) was used for the photosensitizer and Fireplace video-3 (Biospec, General Physics Institute, Moscow, Russia, 500 mW/cm², 670 nm) was used for the light source. 1×10⁴ cells were incubated in 96 well plates with different concentrations of aluminum phthalocyanine: 0.1, 0.3, 0.5 and 1μM for 24 hours then photoirradiation was performed at either 24 or 48 J/cm². The time variations of the viabilities of cells of the four study groups and were measured by using MTT assay according to time were compared to those of the three control groups: control (no treatment), control (AlPcS₄, no light), control (light, no AlPcS₄), and the study groups (PDT) at one hour, 24 hours, 48 hours and 72 hours after PDT.

Results: At, one hour after PDT, the viability of the cells was not changed in the control groups. Viabilities of 117, 40, 35, and 23% in the 24 J group and 76, 31, 52, and

48% in 48 J group were observed, respectively in order of increasing concentration with the value of 87~103% for the control group. 24 hours later, viability of control groups were not changed, By 24 hour after PDT, the viabilities of the control groups had not changed, but those of the 24 J/cm² and 48 J/cm² PDT study groups had decreased significantly to 62, 17, 16, and 18% and 24, 15, 13, and 13%, respectively (P=0.00). By 48 hours viability of the 24 J/cm² and 48 J/cm² PDT study groups were also significantly decreased being 103, 26, 13, and 13% and 50, 8, 8, and 9%, respectively (P=0.00). By 72 hours, viabilities were 84, 21, 21, and 30 % and 33, 20, 33, and 15%, respectively (P=0.00).

Conclusions: The PDT groups showed a marked cytotoxic effect compared to the control groups, and the effect appeared just after PDT and peaked in 48 hours. The minimum required concentration of the photosensitizer for effective cytotoxicity was at 0.3μM either 24 or 48 J/cm².
J Korean Soc Coloproctol 2003;19:205-210

Key Words: Photodynamic therapy, Colorectal cancer, Cell line

광역학치료, 대장암, 세포주

서 론

광역학치료(photodynamic therapy, PDT)는 1900년 Raab에 의해 처음으로 아크리딘 염색약(acridine dye)에 노출시킨 짚신벌레(paramecia)에서 광독성이 확인된 이래 꾸준히 발전해 왔으며¹ 1960년 Lipson 등²이 광감착제(photosensitizer)로 헤마토포르피린(hematoporphyrin)을 사용하여 수술 중 종양부위에서 형광을 확인함으로써 임상적으로 종양의 진단에 대한 가능성을 제시하였고 이후 1976년 Kelly와 Snell 등³이 방광암 환자의 치료에 PDT를 이용하여 암치료를 적용한 이래 1993년 이후 캐나다, 네덜란드, 일본, 미국 등에서 진행성 폐, 소화기, 비뇨기계 암환자에 대한 치료로 승인을 얻어 시행되고 있다.⁴

광역학치료는 미리 투여되어 세포에 분포된 광감착제가 세포에서의 광흡수를 촉진시켜 광화학반응을 일

책임저자: 이한일, 대구광역시 남구 대명 4동 3056-6
대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실
(우편번호: 705-718)
Tel: 053-650-4061, Fax: 053-624-7185
E-mail: hilee@cu.ac.kr

으키고 이 때 발생하는 singlet oxygen에 의하여 암세포가 파괴되는 원리⁵ 이용한 암치료법이라고 할 수 있으며 내시경 혹은 수술 중 보조요법의 방법으로 대장암을 비롯한 소화기암^{6,7} 외에도 방광암,⁸ 폐암,⁹ 자궁경부암,¹⁰ 두경부암¹¹ 등 각종 암치료와 내시경적 절제가 어려운 대장선종,¹² Barret's esophageal dysplasia,¹³ Bowen's disease¹⁴ 등에 대한 치료로 시행되고 있으나 광감착제의 종류, 종양에 따른 적절한 광감착제의 양과 효과적인 에너지양에 대한 보고는 많지 않다. 저자들은 대장암세포주에 대한 PDT의 효과와 적정 광감착제 및 에너지의 양에 대하여 알기 위해 본 연구를 시행하였다.

방 법

한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받은 대장암세포

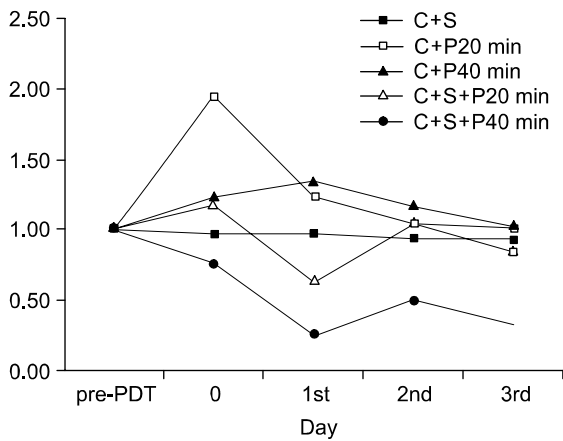


Fig. 1. The changes of viability according to time when concentration of photosensitizer was 0.1µM.

주 Colo 205 (KCLB 10222)를 RPMI 1640 배지에 10% fetal calf serum, penicillin, gentamicin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ humidified incubator에서 배양하였다. 먼저 세포주를 96 well plate에 각 well마다 200µl의 배지와 함께 1×10⁴의 세포를 분주하고 광감착제로는 Photosense[®] (sulphonated aluminum phthalocyanine, NIOPIK, State Research Center, Moscow, Russia)를 이용하여 0.1, 0.3, 0.5, 1µM 농도로 투여하여 24시간 동안 배양한 다음 배지를 교환 후 Fireplace video-3[®] (Biospec, General Physics Institute, Moscow, Russia, 500 mW/cm², 670 nm) 램프를 이용하여 에너지양을 각 24 (PDT-24) 및 48 J/cm² (PDT-48)의 두 가지로 나누어 각 농도의 세포군에 조사를 시행하였다. 대조군으로 세포만 배양한 군(대조군-1), 세포와 광감착제만 넣은 군(대조군-2), 세포와 램프만 조사한 군(대조군-3)을 사용하였으며 PDT 직후와 24시간, 48시간, 그리고 72시간 후에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법을 이용하여 대장암세포의 생활력(viability)을 측정하여 PDT의 효과를 조사하였으며 통계학적으로 SPSS for Windows 10.0 (ver. 7.0, SPSS Inc., Chicago, U.S.A)을 사용하여 반복측정 분산분석을 실시한 다음 유의수준 0.05에서 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

Photosense를 0.1µM을 넣은 군에서는 대조군은 모두 PDT직후 혹은 72시간까지의 생활력은 약 95~195%의 생활력을 보여 차이가 없었으나 PDT-24군은 PDT 후 24시간 이후에 62.5%로 감소하였고 이후 다시

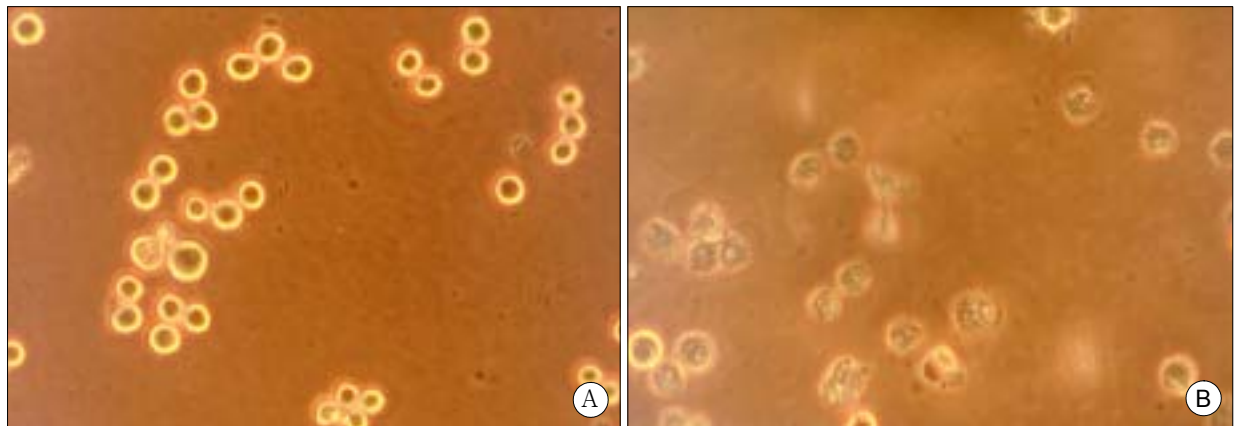


Fig. 2. A. Before PDT: the cells in well plate are numerous and well maintained cell wall structure (Direct, ×400). B. After PDT: the cells show edema and blebs of the cell wall and decreased in number due to cell necrosis (Direct, ×400).

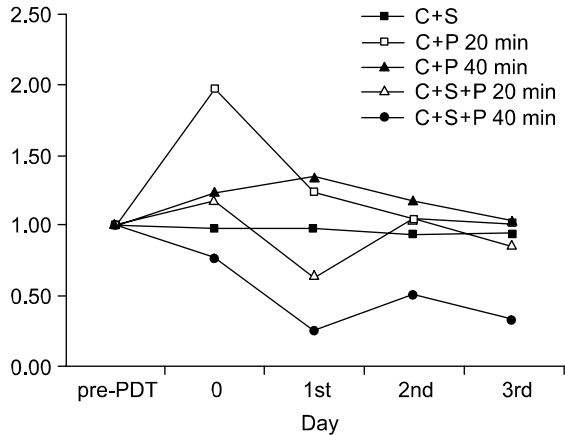


Fig. 3. The changes of viability according to time when concentration of photosensitizer was 0.3 μM.

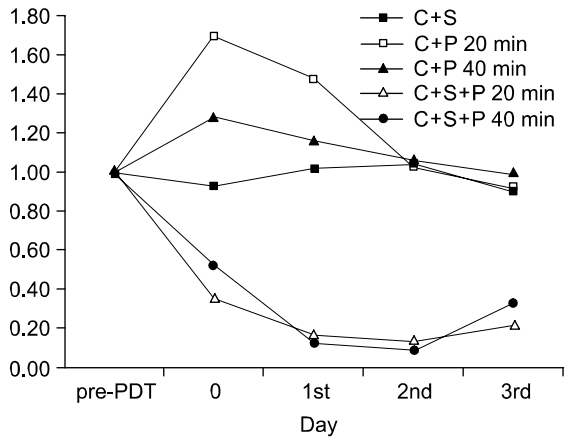


Fig. 4. The changes of viability according to time when concentration of photosensitizer was 0.5 μM.

증가하는 양상을 보였으며 PDT-48군 또한 PDT 직후부터 76.2%로 감소하여 24시간, 48시간 그리고 72시간에는 각각 24.4, 50.3, 32.6%로 감소하여 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.00, Fig. 1, 2A, B).

0.3 μM을 넣은 군에서도 대조군은 모두 변화가 없었으나 PDT-24군과 PDT-48군은 PDT 직후, 24, 48, 그리고 72시간 후 생활력이 각 40.3, 17.4, 26.3, 21.4%와 31.2, 14.6, 8.3 그리고 11.9%로 감소하여 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.00, Fig. 3).

0.5 μM을 넣은 군에서도 대조군은 변화가 없었으나 PDT-24군과 PDT-48군은 PDT 직후, 24시간 및 48시간 후까지 각 35.3, 15.8, 12.6% 및 51.8, 12.5, 8.2%로 유의하게 감소하였다가 72시간 후에는 각 21.4 및 32.9%로 약간 상승하였다(P=0.00, Fig. 4).

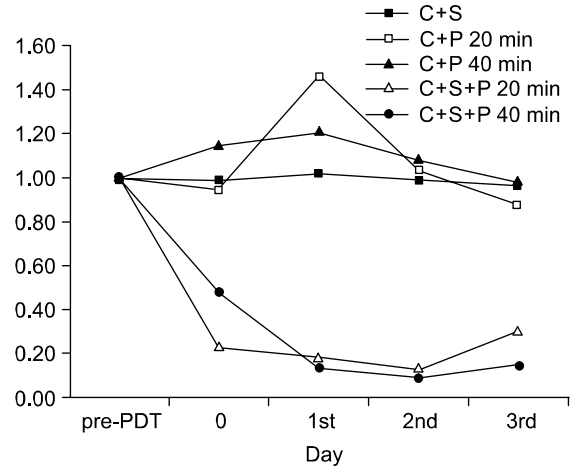


Fig. 5. The changes of viability according to time when concentration of photosensitizer was 1 μM.

1 μM을 넣은 군에도 대조군은 모두 변화가 없었으며 PDT-24군과 PDT-48군은 PDT 직후, 24시간 및 48시간 후까지 각 22.6, 18.0, 12.7% 및 47.6, 13.4, 8.9%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 72시간에는 다시 30.0 및 15.4%로 상승하였다(P=0.00, Fig. 5).

고 찰

광역학치료(PDT)는 포르피린계열의 광반응물질(photo-sensitizer)을 인체에 투여하게 되면 정상조직보다는 종양 등 병변이 있는 부위에 더 많이 분포하게 되고 여기에 램프나 레이저를 이용하여 특정파장의 빛을 조사하면 빛에너지가 세포 내에 흡수되어 세포의 파괴를 가져오는 원리를 이용한 치료기법이다.¹ PDT는 처음 Raab에 의해 광에너지에 의한 세포독성이 확인되고 1903년에 Tappeiner와 Jodlbauer 등이 피부암의 치료 과정에 광감작제를 국소요법으로 사용하면서 광역학(photodynamic)이란 용어가 사용되었으며 1940년대 Auler와 Banzer가 헤마토포르피린(hematoporphyrin)의 종양에 대한 친화성(affinity)을 보고하면서 임상적 이용이 모색되었다.¹ 1961년 Lipson 등²은 순도를 높인 헤마토포르피린 유도체(hematoporphyrin derivatives, Hpd)를 사용해서 광감작제의 종양에 대한 국소성(localization)을 높여 형광 반응을 이용하여 수술에 이용하였고 이후 광감작제에 맞는 파장의 광원을 레이저를 사용함으로써 임상적 이용이 가능하게 되었다.^{1,4}

임상적으로는 이미 1993년 캐나다에서 재발성 방광암 및 식도암에 대한 치료방법으로 처음 승인된 이래

유럽, 일본 등에서 폐암과 식도암의 치료(초기 및 진행성 병변), 자궁경부 이형성증을 포함한 자궁경부암, 위암 등에 대한 치료 방법으로 시도되고 있으며 1995년 미국 식약청(FDA)에서 정식 허가를 받아 현재 폐, 식도, 방광, 피부암의 치료에 이용되고 있으며¹⁵ 특히 조기암⁹의 경우에 효과가 입증되고 있다.

현재 사용되고 있는 광감착제로는 1세대인 amino-laevulinic acid (ALA), 포르피머 소듐(porphimer sodium, Photofrin[®]), 헤마토포르피린 유도체(Hpd, Photohem[®]) 등이 있으며 이들은 대부분 630 nm의 파장에서 에너지 흡수가 극대화되는 특징을 가지고 있다.^{4,16} 그러나 이들은 체내에서 약 한 달 이상 피부에 남아 햇빛에 노출될 경우 피부화상의 위험이 있으며 광독성의 깊이가 3~15 mm에 불과하여 커다란 종양에서는 치료 효과가 적다는 단점이 있다.¹⁵ 반면 2세대 광감착제는 저자들이 사용한 sulphonated aluminum phthalocyanine (Photosense[®])를 비롯해서 Chlorin e6 (NPe6), m-THPC (5,10,15,20-Tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin, Foscan[®]), bacteriochlorin A 등^{4,16}이 있으며 이들은 모두 최소 650 nm 이상의 파장을 가진 광에너지를 흡수하는 특징이 있으며 특히 Photosense[®]는 675 nm의 파장에서 흡수를 하므로 광독성이 1세대인 Photohem[®]보다 거의 두 배에 달하는 것으로 알려져 있다.¹⁶

Tan 등¹⁷은 위암세포주(MKN 28)에 대하여 1세대인 ALA를 사용하여 40 J/cm²을 조사한 결과 500 μ molar의 농도에서 50%로 감소하였고 800 μ molar에서는 20%까지 생활력이 떨어지는 것으로 보고하였으며 Pass 등¹⁸도 K-ras 암유전자가 전입된 세포주(45342)에서 2세대인 디헤마토포르피린 에테르(dihematoporphyrin ether, Photofrin II)를 사용하여 최고 1%까지 세포독성을 보였으며 그 시기도 대부분 2시간 이내에 시작되어 72시간까지 나타나는 것으로 보고하여 48~72시간에 최대 8.2%까지 감소한 저자들의 결과와 비교할 때 종양 세포주에 대한 PDT의 광독성은 광감착제의 종류에 따라 조금씩 다르기는 하지만 유의한 효과를 기대할 수 있을 것으로 보이며 그 기간 또한 PDT후 약 72시간 정도 지속되는 것으로 보인다.

그러나 Malham 등¹⁹은 같은 aluminum phthalocyanine 이라도 disulphonate제제(AlS₂Pc)는 1세대인 HpD와 비슷하나 aluminum phthalocyanine chloride (AlPc)는 약 250배나 강력한 것으로 나타나며 이는 각 광감착제의 세포 내 분포 양상과 관련이 있는 것으로 보인다고 하여 PDT의 작용기전이 각 광감착제에 따라 다르게 일어날 수 있음을 시사하였고 Brasseur 등²⁰은 Colo-26 대

장암세포주에 대한 실험에서 수용성 aluminum phthalocyanine이 적은 용량에서도 효과적인 결과를 나타낸다고 하였고 ALA의 사용보다는 ALA-ester의 형태가 오히려 적은 농도에서 효과적인 protoporphyrin IX의 세포내 농도를 유지할 수 있다는 보고도 있어²¹ 각 광감착제의 종류에 따른 효과뿐 아니라 같은 제제라도 유도체에 따라 결과는 차이가 많으며 Fisher 등²²은 p53유전자가 정상인 대장암세포주가 변이를 가진 세포주보다 더 PDT에 대해 효과가 좋은 것으로 보고하여 세포주의 성격에 따라서도 다르게 나타나므로 광감착제와 세포주에 따른 광감착제의 농도와 에너지의 양을 설정하는 것이 중요하다고 하겠다.

광원으로는 초기에 사용하던 램프대신 각 광감착제에 맞는 정확한 파장의 광원으로 레이저를 사용하는 데 임상적으로 이용할 때에는 약 50~500 J/cm²의 에너지를 전달하게 되나 mTHPC와 같은 2세대의 광감착제같이 효율이 높은 경우 10 J/cm²로도 충분한 효과가 있는 것으로 이해되고 있다. 세포주에 대한 실험에서는 일반적으로 20~40 J/cm² 정도 혹은 300 W의 일반 광원에 단지 필터만 장착해서 필요한 파장만 통과시켜도 충분한 세포독성을 확인할 수 있으며 결과는 큰 차이가 없는 것으로 보고되고 있으며²³ 저자들의 경우 PDT의 세포주 실험을 96 well plate에서 시행하였으므로 레이저가 조사되는 microlens의 최대직경이 2 cm²에 불과해서 부적절하다고 판단하여 670 nm의 빛만 투과하는 필터를 장착한 램프를 사용하였으며 정확한 에너지의 전달을 확인하기 위해 선량계(dosimetry)를 이용하여 24 및 48 J/cm²을 각각 조사하였는데 저자들의 연구 결과는 48 J/cm²에서 더 효과적인 것으로 나타났고 세포독성의 효과도 레이저를 사용했던 다른 보고와¹⁷ 차이가 크지 않았다.

PDT의 효과에 대한 기전은 일반적으로 세포 내에서 발생하는 singlet oxygen (¹O₂)에 의한 세포의 비활성화로 설명이 된다.⁵ 일반적으로 ¹O₂는 세포 내 이동에 문제가 있으므로²⁴ 주로 광감착제가 분포하는 미토콘드리아(mitochondria), 리소좀(lysosome) 혹은 세포벽에서 발생하여 광독성을 나타내는 것으로 이해되고 있다.¹⁹ PDT의 주된 효과는 세포괴사(cell necrosis)로 보고되고 있으나²⁵ PDT 후 30분 내에 세포사멸(apoptosis)의 객관적인 증거의 하나인 DNA ladder가 확인된다는 보고도 있으나 일반적으로 apoptosis는 1~3일 후에 나타나며 대부분 저농도 혹은 저에너지의 경우에 관찰되는 것으로 이해되고 있다.²⁶ 또한 PDT이후에 숙주에서의 Interleukin-2 수용체가 감소하고 Interleukin-2 (IL-2)와

자연살해세포(natural killer cell, NK cell)의 증가가 보고되고 있어¹¹ PDT에 의한 면역증강도 암세포독성에 대해 일부분 기여하는 것으로 보인다. 저자들의 실험 결과에서도 PDT직후부터 세포독성의 결과인 세포의 수 감소, 세포벽의 부종, 혹은 농포(bleb) 등을 확인할 수 있었으며 역시 주된 효과는 세포괴사로 간주되었으나 정확한 광독성의 기전에 대해서는 DNA ladder의 확인 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

대장암에 대한 임상적용은 재발성 직장암²³ 혹은 수술중 보조요법²⁷으로 PDT를 시행하거나 내시경적 절제가 어려운 용모성 선종,¹² 가족성용종증의 치료 후에 발생하는 위 혹은 십이지장의 용종 등²⁸의 치료도 보고되어 있어 있으나 아직은 임상시험단계에 머물고 있으므로 향후 각 광감착제개발과 이에 따른 광원 등에 대한 연구가 수반된다면 부분적으로는 대장암치료에 도움이 될 수 있을 것으로 보인다.

결 론

PDT는 대장암세포주에 대해 유의한 세포독성을 보였으며 그 효과는 PDT직후부터 나타나서 48시간이 지난 후 극대화되었고 최소 0.3mM 이상의 광감착제 농도에서 높게 나타났다. 그러므로 향후 동물실험 등을 통한 안전성 확보 및 적절한 치료계획이 수립된다면 대장암 치료에 적용할 수 있을 것으로 보인다.

REFERENCES

1. van Hillegersberg R, Kort WJ, Wilson JH. Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* 1994;48: 510-27.
2. Ripson RL, Blades EJ, Olsen AM. The use of hematoporphyrin in tumor destruction. *J Natl Cancer Inst* 1961; 26:1-11.
3. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol* 1976;115:150-1.
4. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905.
5. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 1976;36:2326-9.
6. Barr H, Krasner N, Boulos PB, Chatlani P, Bown SG. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study. *Br J Surg* 1990;77:93-6.
7. Tajiri H, Daikuzono N, Joffe SN, Oguro Y. Photoradiation therapy in early gastrointestinal cancer. *Gastrointest Endosc* 1987;33:88-90.
8. Nseyo UO. Photodynamic therapy in the management of bladder cancer. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:271-80.
9. Edell ES, Cortese DA. Photodynamic therapy for early stage lung cancer. *J Clin Laser Med Surg* 1991;9:391-3.
10. Hillemanns P, Korell M, Schmitt-Sody M, Baumgartner R, Beyer W, Kimmig R, et al. Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 1999;81:34-8. 345.
11. Lai JP, Tao ZD, Xiao JY, Zhao SP, Tian YQ. Effect of photodynamic therapy on selected laboratory values of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:680-2.
12. Loh CS, Bliss P, Bown SG, Krasner N. Photodynamic therapy for villous adenomas of the colon and rectum. *Endoscopy* 1994;26:243-6.
13. May A, Gossner L, Gunter E, Stolte M, Ell C. Local treatment of early cancer in short Barrett's esophagus by means of argon plasma coagulation: initial experience. *Endoscopy* 1999;31:497-500.
14. Morton CA, Whitehurst C, Moseley H, McColl JH, Moore JV, Mackie RM. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol* 1996;135:766-71.
15. Webber J, Herman M, Kessel D, Fromm D. Current concepts in gastrointestinal photodynamic therapy. *Ann Surg* 1999;230:12-23.
16. Stranadko EF, Skobelkin OK, Litvin GD, Astrakhankina TA. Photodynamic therapy of human malignant tumors: a comparative study between photohem and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine. *Proc SPIE* 1996;2625: 440-8.
17. Tan WC, Krasner N, O'Toole P, Lombard M. Enhancement of photodynamic therapy in gastric cancer cells by removal of iron. *Gut* 1997;41:14-8.
18. Pass HI, Evans S, Matthews WA, Perry R, Venzon D, Roth JA, et al. Photodynamic therapy of oncogene-transformed cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101: 795-9.
19. Malham GM, Thomsen RJ, Finlay GJ, Baguley BC. Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematoporphyrin derivative in cultured human meningioma cells. *Br J Neurosurg* 1996; 10:51-7.
20. Brasseur N, Ouellet R, La Madeleine C, van Lier JE. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 1999;80:1533-41.
21. Gaullier JM, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo PK, Ma

- LW, et al. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res* 1997;57:1481-6.
22. Fisher AM, 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.
23. Kashtan H, Haddad R, Yossiphov Y, Bar-On S, Skornick Y. Photodynamic therapy of colorectal cancer using a new light source: from in vitro studies to a patient treatment. *Dis Colon Rectum* 1996;39:379-83.
24. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-53.
25. Lavie G, Kaplinsky C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, et al. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyltetrahydroxyhelianthone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1999;79:423-32.
26. Ball DJ, Luo Y, Kessel D, Griffiths J, Brown SB, Vernon DI. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. *J Photochem Photobiol B* 1998;42:159-63.
27. Allardice JT, Abulafi AM, Grahn MF, Williams NS. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy for colorectal carcinoma: A clinical study. *Surg Oncol* 1994;3:1-10.
28. Mlkvy P, Messmann H, Debinski H, Regula J, Conio M, MacRobert A, et al. Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis--a pilot study. *Eur J Cancer* 1995;31A:1160-5.
-