

# EFECTO DE LA CAPA CÓRNEA EN LA RESPUESTA FOTODINÁMICA

I. Salas García<sup>(1)</sup>, F. Fanjul Vélez<sup>(1)</sup>, N. Ortega Quijano<sup>(1)</sup>, J. L. Arce Diego<sup>(1)</sup>

isalas@teisa.unican.es, fanjulf@unican.es, ortegan@unican.es, arcedj@unican.es

<sup>(1)</sup> Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas. Dpto. TEISA. Universidad de Cantabria. Av. de los Castros s/n, 39005 Santander, España

**Abstract-** Photodynamic Therapy is a treatment modality based in biological material oxidation by using a photosensitizer and light. Treatment outcome with topical photosensitizers depends on the uneven distribution of drug through the tumour region and several studies have demonstrated the huge influence of corneal layer in the amount of photosensitizer accumulated in tumour tissue during the incubation period. In this work we present a PDT model for a topical photosensitizer that tries to predict the photodynamic effect on skin characterized by the permeability of the diffusion barrier layer exerted by the corneal layer. The results obtained allow us to estimate the cytotoxicity reached in the treated area adjusting parameters related to the optical source, the photosensitizer concentration, the incubation and exposition time or the diffusivity and permeability of the damaged tissue.

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de la luz para el tratamiento y el diagnóstico de patologías en diversos campos clínicos, constituye un importante campo dentro de la Biofotónica. Entre las terapias activadas por luz, la Terapia Fotodinámica (TFD) presenta una prometedora proyección de futuro debido a los buenos resultados clínicos que ofrece. Entre sus múltiples aplicaciones terapéuticas en diferentes modalidades clínicas, destacan aquellas relacionadas con la dermatología, como el tratamiento del cáncer y otras enfermedades crónicas de la piel como la psoriasis.

La TFD se basa en la activación mediante luz de un agente químico externo llamado fotosensibilizador (FS). El FS se puede administrar por vía intravenosa o tópica, como en el caso de ciertos cánceres de piel, [1]. Tras un periodo de incubación en el que el agente fotosensible se acumula en el tejido maligno, se aplica luz de una longitud de onda que pueda ser absorbida por éste. Como consecuencia de la interacción entre la luz, el PS y el oxígeno celular, se desencadenan una serie de reacciones fotoquímicas en las que se producen especies de oxígeno reactivas que pueden destruir el tejido tumoral.

El desarrollo de modelos predictivos de la respuesta fotodinámica ante diferentes condiciones de tratamiento, permitirá en un futuro adaptar la dosimetría actual, basada en un estricto protocolo de aplicación, de una forma más precisa y personalizada, [2]. Sin embargo, el modelado de la interacción fotoquímica subyacente a dicha terapia es complejo, puesto que ha de tener en cuenta una gran cantidad de parámetros relacionados con distribución de la radiación óptica en el tejido, la acumulación del fotosensibilizador y el suministro de oxígeno celular.

El modelo para TFD utilizado en este trabajo se presenta en la sección II. Dicho modelo tiene en cuenta una

distribución inhomogénea de un FS de uso tópico utilizado en dermatología. La distribución de la radiación óptica en el tejido se ha calculado aplicando el método de Monte Carlo a un modelo de transporte óptico basado en la Teoría de Transporte de la Radiación (RTT). El modelo fotoquímico utilizado permite caracterizar las reacciones que tienen lugar durante el proceso fotodinámico. A continuación, en la sección III, se exponen los resultados obtenidos. Finalmente, se recogen las conclusiones extraídas durante el desarrollo del presente trabajo.

## II. MODELO PARA TERAPIA FOTODINÁMICA

El modelo para TFD que se presenta a continuación, se estructura en tres partes fundamentales. En primer lugar, se modela la distribución inhomogénea de un FS tópico utilizado en dermatología y se obtiene la concentración acumulada en el tejido tumoral durante el periodo de incubación. A continuación, se presenta el modelo de transporte óptico basado en la RTT, que se ha utilizado para obtener la distribución de la radiación óptica en el tejido. Finalmente, se recoge el modelo fotoquímico utilizado para caracterizar las reacciones que tienen lugar durante el proceso fotodinámico.

### A. Distribución de un fotosensibilizador de uso tópico

El fotosensibilizador de uso tópico MAL (Metilo Aminolevulinato), es un precursor del elemento fotoactivo conocido como Protoporfirina IX (PpIX). Tras la administración tópica del MAL en la superficie cutánea, se produce un proceso de difusión a través de las diferentes capas de la piel y a continuación una transformación metabólica en la PpIX. Existen diferentes estudios que han evaluado la cantidad de PpIX acumulada en la piel mediante técnicas de fluorescencia y que han demostrado la gran influencia que tiene la capa córnea de la epidermis en el proceso de difusión del precursor hacia las capas más profundas de la piel, [3,4].

Se ha utilizado la ley de difusión de Fick, mostrada en la ecuación 1 para caracterizar la distribución inhomogénea del fotosensibilizador y calcular la concentración de fotosensibilizador acumulada en cada punto del tejido durante el periodo de incubación. Según esta ley, si existe una diferencia de concentración de una sustancia, sus moléculas se mueven desde la zona de mayor concentración a la de menos, de forma que el flujo de sustancia sigue la dirección opuesta al gradiente de concentración.

$$J = -D \frac{\partial M}{\partial z} \quad (1)$$

Donde  $J$  es el vector de flujo que indica la dirección y magnitud de la sustancia,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $M$  es la concentración de precursor y  $z$  es la profundidad en el tejido.

La difusión del fotosensibilizador a través de las capas de la piel, está limitada por varios factores, entre los que se encuentra el efecto barrera que ofrece la capa cornea a la difusión del precursor y que se caracteriza mediante la permeabilidad,  $K$ , el coeficiente de difusión a través de la epidermis y la dermis,  $D$ , el tiempo de eliminación del fotosensibilizador,  $\tau$ , y la tasa de conversión del fotosensibilizador en su elemento activo PpIX, [5]. La evolución temporal de la concentración de fotosensibilizador a diferente profundidad en la muestra de tejido se puede calcular como

$$M(t) = M_o \int_0^t \left( \frac{K}{\sqrt{D\pi t'}} e^{-\frac{z^2}{4Dt'}} - \frac{K^2}{D} e^{-\frac{Kz}{D}} e^{-\frac{K^2 t'}{D}} \operatorname{erfc} \left( \frac{K}{\sqrt{D}} \sqrt{t'} + \frac{z}{2\sqrt{Dt'}} \right) \right) e^{-\frac{t'}{\tau}} dt' \quad (2)$$

Donde  $M_o$  es la concentración de fotosensibilizador en la superficie de la piel en  $t=0$  y  $z$  es la distancia desde la capa cornea localizada en  $z=0$ . Una vez conocida la concentración del precursor MAL alcanzada en cada punto del tejido, se calcula la concentración de la sustancia fotosensible,  $S_o$ , acumulada durante el periodo de incubación. Este cálculo permite conocer la concentración de fotosensibilizador disponible en el tejido tumoral al comienzo del periodo de radiación. Asumiendo que la eliminación del componente activo es mucho más rápida que el tiempo de transmisión del fotosensibilizador,  $\tau_p \ll t$ , la concentración de PpIX es proporcional a la concentración instantánea de MAL y se puede calcular mediante la expresión 3, donde  $\varepsilon_p$  es el rendimiento del proceso de conversión y  $\tau_{a \rightarrow p}$  es el tiempo invertido en la generación de PpIX, [5].

$$S_o(t) = \varepsilon_p \frac{\tau_p}{\tau_{a \rightarrow p}} M(t) \quad (3)$$

La permeabilidad de la capa córnea de la epidermis varía dependiendo del estado en el que se encuentra la piel. Así, en el caso del carcinoma basocelular, dicha capa está dañada o reducida y por tanto se puede caracterizar mediante una elevada permeabilidad.

### B. Distribución de la radiación óptica

Los tejidos son medios turbios, fuertes dispersores de la luz, y con grandes variaciones en sus propiedades ópticas. La distribución de la luz en el tejido se puede obtener mediante la Teoría de Transporte de la Radiación (RTT). En el estado estacionario cuando la fuente de luz ha iluminado la muestra de tejido durante el tiempo suficiente de forma que los niveles de luz han alcanzado el equilibrio, y en una región libre de fuentes, la ecuación RT puede expresarse como

$$\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}) = -(\mu_a + \mu_s) I(r, \hat{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') I(r, \hat{s}') d\Omega' \quad (4)$$

Donde  $\hat{s}'$  es la dirección de la luz incidente y  $\hat{s}$  es la dirección de salida,  $I(r, \hat{s})$  es la intensidad específica en  $W/m^2sr$ ,  $\mu_a$  es el coeficiente de absorción,  $\mu_s$  es el coeficiente de scattering,  $p(\hat{s}, \hat{s}')$  es la función de fase de scattering que contiene las probabilidades de que la luz sea esparcida en diferentes direcciones y  $\Omega$  es el ángulo sólido.

El método de Monte Carlo se aplicó al modelo RTT, [6]. Este método proporciona una buena aproximación para resolver problemas relacionados con el transporte de la luz en los tejidos debido a su carácter aleatorio.

### C. Reacciones fotoquímicas

La interacción entre la luz con el fotosensibilizador produce el cambio de éste a su estado triplete excitado, que a su vez interacciona con el oxígeno celular mediante dos tipos de reacciones, conocidas como Tipo I y Tipo II. Entre estos dos tipos de reacciones, las de Tipo II se consideran predominantes y se caracterizan por producir una especie de oxígeno reactivo conocida como oxígeno singlete. Este tipo de oxígeno se considera como el principal agente citotóxico responsable de la necrosis de las células malignas.

Para modelar una reacción de Tipo II, se ha utilizado un modelo fotoquímico que tiene en cuenta las transiciones entre estados energéticos de las partículas involucradas en el proceso, como el fotosensibilizador o el oxígeno, [7,8]. Las soluciones del sistema de ecuaciones diferencial stiff, (5) a (10), se han obtenido mediante una herramienta de resolución de ecuaciones diferenciales disponible en la plataforma Matlab®. Las soluciones obtenidas proporcionan la evolución temporal de las concentraciones moleculares de los componentes involucrados en este tipo de reacciones en cualquier punto del tejido.

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -\nu\rho\sigma_{psa}[S_0] - kpb[{}^1O_2][S_0] + \frac{\eta_{10}}{\tau_1}[S_1] + \frac{\eta_{30}}{\tau_3}[T] + \frac{\alpha S}{\tau_3}[T][{}^3O_2] \quad (5)$$

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -\frac{1}{\tau_1}[S_1] + \nu\rho\sigma_{psa}[S_0] \quad (6)$$

$$\frac{d[T]}{dt} = -\frac{\eta_{30}}{\tau_3}[T] - \frac{\alpha S}{\tau_3}[T][{}^3O_2] + \frac{\eta_{13}}{\tau_1}[S_1] \quad (7)$$

$$\frac{d[{}^3O_2]}{dt} = -\frac{\alpha S}{\tau_3}[T][{}^3O_2] + \frac{\eta_0}{\tau_0}[{}^1O_2] + P \quad (8)$$

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = -kpb[S_0][{}^1O_2] - kc\alpha[R][{}^1O_2] - ksc[C][{}^1O_2] - \frac{\eta_0}{\tau_0}[{}^1O_2] + \frac{\alpha S}{\tau_3}[T][{}^3O_2] \quad (9)$$

$$\frac{d[R]}{dt} = -kc\alpha[{}^1O_2][R] + U \quad (10)$$

En estas ecuaciones,  $[S_0]$  es la concentración de fotosensibilizador en estado base,  $[S_1]$  es la concentración de fotosensibilizador en estado singlete excitado,  $[T]$  es la concentración de fotosensibilizador en estado triplete excitado,  $[{}^3O_2]$  es la concentración de oxígeno en estado base,  $[{}^1O_2]$  es la concentración de oxígeno singlete,  $[R]$  es la concentración de receptores intracelulares del oxígeno singlete,  $[C]_i$  es la concentración de scavengers,  $\tau_1$  es el tiempo de relajación del estado  $S_1$  a  $S_0$ ,  $\tau_3$  es el tiempo de

relajación del estado  $T$  a  $S_0$ ,  $\tau_0$  es el tiempo de relajación del estado  $^1O_2$  a  $^3O_2$ ,  $\eta_{10}$  es el rendimiento cuántico de transición del estado  $S_1$  a  $S_0$ ,  $\eta_{13}$  es el rendimiento cuántico de transición de  $S_1$  a  $T$ ,  $\eta_{30}$  es el rendimiento cuántico de transición de  $T$  a  $S_0$ ,  $\eta_0$  es el rendimiento cuántico de transición de  $^1O_2$  a  $^3O_2$ ,  $\alpha_s$  es el factor de eficiencia para la transferencia de energía de  $T$  a  $^3O_2$ ,  $k_{pb}$  es la tasa de fotoquemado biomolecular,  $k_{cx}$  es la tasa de citotoxicidad biomolecular,  $k_{sc}$  es la tasa de reacción del  $^1O_2$  con varios scavengers,  $\nu$  es la velocidad de la luz en el tejido,  $\rho$  es la densidad de fotones,  $\sigma_{psa}$  es la sección transversal de absorción de las moléculas de  $S_0$ ,  $P$  es la tasa de difusión y perfusión de oxígeno y  $U$  es la tasa de reparación de daño celular.

### III. RESULTADOS

Se ha utilizado el modelo de TFD presentado en la sección anterior para simular el protocolo de aplicación clínica seguido en dermatología para el fotosensibilizador de uso tópico MAL. Dicho protocolo establece diferentes parámetros, entre ellos, un periodo de incubación del fotosensibilizador de 3 horas antes de irradiar la zona tumoral con una dosis lumínica de  $37 \text{ J/cm}^2$  durante 8 o 9 minutos utilizando una lámpara Aktelite CL16 que emite en la región espectral del rojo a 630 nm.

Los resultados obtenidos permiten observar la influencia de la permeabilidad de la capa córnea de la epidermis en la difusión del fotosensibilizador a través de las capas de la piel, y consecuentemente en la cantidad de fotosensibilizador acumulada en el tejido tumoral tras el periodo de incubación. En la Figura 1 se puede observar la evolución temporal de la concentración del fotosensibilizador a diferentes profundidades en la piel. En este caso se ha considerado que la piel presenta una patología que daña la capa córnea, como podría ser el caso de los carcinomas basocelulares, y por lo tanto se toma un valor elevado de permeabilidad,  $K = 10^{-6} \text{ m/s}$ . Durante el inicio del periodo de incubación, se puede observar el bloqueo de la difusión del fotosensibilizador a las capas más profundas de tejido, lo que produce una distribución inhomogénea de éste tras tres horas de incubación.

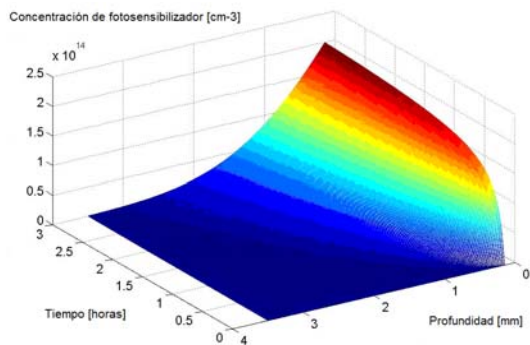
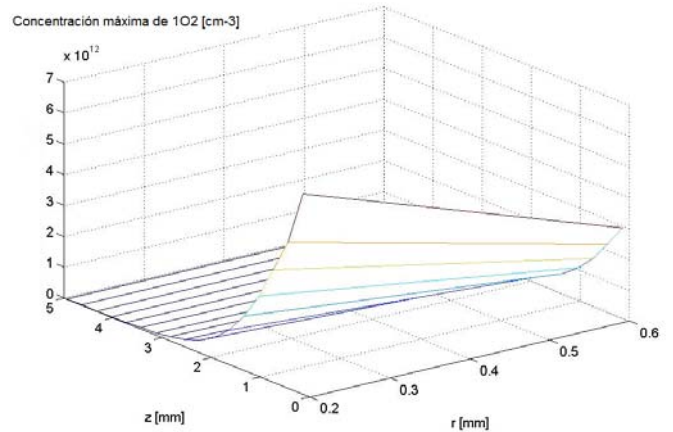


Fig. 1. Evolución espacial y temporal de la concentración del fotosensibilizador durante el periodo de incubación.

Tras obtener el perfil de distribución del fotosensibilizador después de tres horas de acumulación en el

tejido tumoral, se ha utilizado el modelo fotoquímico presentado anteriormente para obtener la evolución temporal de las concentraciones moleculares de los compuestos que intervienen en el proceso. Entre estos compuestos, se ha fijado especial interés en la concentración de oxígeno singlete alcanzada en cada punto del tejido. En la Figura 2, se muestra de forma gráfica la cantidad máxima de oxígeno singlete alcanzada en diferentes puntos de una muestra de piel afectada por una patología cutánea, como podría ser el carcinoma basocelular para una  $K = 10^{-6} \text{ m/s}$ . Como se puede observar la concentración máxima de oxígeno reactivo disminuye a medida que profundizamos en la muestra de tejido. Este aspecto tiene especial relevancia a la hora de predecir el efecto citotóxico del tratamiento, que dependerá en gran medida de concentración de oxígeno singlete alcanzada.



Para comprobar la influencia de la capa córnea de la epidermis en el resultado del tratamiento, entendiéndolo como tal la citotoxicidad alcanzada en función de la concentración de oxígeno reactivo producida en las reacciones fotoquímicas, se ha modelado la PDT bajo dos situaciones. En la primera, para una patología que daña severamente la capa córnea, en cuyo caso se ha utilizado una permeabilidad de la capa córnea elevada ( $K = 10^{-6} \text{ m/s}$ ) y en la segunda para una capa córnea sin deteriorar ( $K = 10^{-8} \text{ m/s}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.

TABLA I  
CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE VS.  
PROFUNDIDAD EN EL TEJIDO

z (mm)	$[^1O_2]$ (cm <sup>-3</sup> )	$[^1O_2]$ (cm <sup>-3</sup> )
	$K = 10^{-6} \text{ m/s}$	$K = 10^{-8} \text{ m/s}$
0.15	$6.497 \times 10^{12}$	$7.867 \times 10^{11}$
0.45	$4.721 \times 10^{12}$	$5.350 \times 10^{11}$
0.75	$3.628 \times 10^{12}$	$3.643 \times 10^{11}$
1.05	$2.593 \times 10^{12}$	<b><math>2.383 \times 10^{11}</math></b>
1.35	$1.762 \times 10^{12}$	<b><math>1.596 \times 10^{11}</math></b>
1.65	$1.089 \times 10^{12}$	$8.983 \times 10^{10}$
2.25	$3.849 \times 10^{11}$	$2.820 \times 10^{10}$
2.55	<b><math>2.131 \times 10^{11}</math></b>	$1.470 \times 10^{10}$
2.85	<b><math>1.119 \times 10^{11}</math></b>	$7.7498 \times 10^9$
3.15	$5.567 \times 10^{10}$	$3.437 \times 10^9$
3.45	$2.652 \times 10^{10}$	$1.643 \times 10^9$

Para calcular la concentración de oxígeno singlete necesaria para que se produzca citotoxicidad y por lo tanto, necrosis celular, nos hemos apoyado en los resultados de diferentes experimentos in vitro llevados a cabo previamente con otros fotosensibilizadores de la familia de las porfirinas, [9,10]. Así, hemos asumido que la dosis de  $^1O_2$  necesaria para reducir la supervivencia celular por 1/e en un volumen celular de  $1000 \mu\text{m}^3$  es de 0.3 mM, que corresponde a una concentración de  $^1O_2$  de  $1.8066 \times 10^{11}$  moléculas de oxígeno singlete por  $\text{cm}^3$ . Considerando dicha concentración como el umbral necesario para que se produzca la oxidación del tejido necrótico y apoyándonos en los resultados recogidos en la tabla I, podemos obtener la profundidad a la que el tratamiento deja de ser efectivo para diferentes estados de la capa córnea. Los resultados obtenidos demuestran la gran influencia del estado de la barrera de difusión en el efecto del tratamiento. Así para una patología que daña severamente la capa córnea, se alcanza el umbral de concentración de oxígeno singlete necesario para producir daño citotóxico hasta una profundidad de entre 2.55 y 2.85 mm, mientras que para el caso de una capa córnea sin deteriorar es presumible que la necrosis deseada se alcance hasta profundidades de entre 1.05 mm y 1.35 mm.

Los resultados obtenidos demuestran la gran influencia que tiene el tipo de patología tratada en los resultados del tratamiento. Las diferencias observadas en la respuesta citotóxica dependiendo del estado de las lesiones tratadas, sugiere que el protocolo clínico aplicado actualmente, debería ser ajustado de forma más personalizada para cada patología o paciente.

#### IV. CONCLUSIONES

La Terapia Fotodinámica presenta actualmente una gran potencialidad para el tratamiento de diferentes patologías en diversos campos clínicos. En dermatología se ha venido utilizando a lo largo de los últimos años para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y enfermedades crónicas de la piel. El procedimiento clínico de aplicación de esta técnica terapéutica sigue un estricto protocolo en el que se fijan, entre otros, las características de la fuente de iluminación o el tiempo de incubación del fotosensibilizador en el tejido tumoral. Sin embargo, el protocolo actual no genera resultados óptimos en todos los casos tratados, observándose diferencias en la respuesta al tratamiento de los pacientes y en ciertos casos la recidiva de las lesiones ya tratadas. El desarrollo de modelos predictivos permitirá en un futuro, un ajuste más preciso de la dosimetría de aplicación del tratamiento de una forma más personalizada.

En este trabajo se presenta la utilización de un modelo predictivo para PDT, que considera la distribución inhomogénea de un fotosensibilizador de uso tópico, la distribución de la radiación óptica en el tejido y la evolución de las reacciones fotoquímicas involucradas en el procedimiento fotodinámico. Dicho modelo permite determinar si se alcanza la citotoxicidad deseada para que se produzca la necrosis del tejido neoplásico a diferentes profundidades dentro del tejido tratado ajustando la dosimetría de aplicación.

Los resultados obtenidos constatan la relevancia del proceso de difusión del fotosensibilizador a través del tejido tratado. Igualmente demuestran la gran influencia de la capa

córnea de la epidermis en la acumulación de agente fotoactivo en el tejido y por lo tanto en la citotoxicidad alcanzada.

El desarrollo de este tipo de modelos permitirá en un futuro ajustar el protocolo clínico actual para maximizar la respuesta al tratamiento dependiendo de factores como la patología tratada e incluso de parámetros característicos de cada paciente.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha utilizado para su realización fondos del Programa para el desarrollo de proyectos de I+D+i de interés estratégico en la comunidad de Cantabria en el campo de la Biomedicina y Biotecnología de la Fundación Leonardo Torres Quevedo.

#### REFERENCIAS

- [1] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics handbook*, T. Vo-Dinh, ed., CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [2] F. Fanjul-Vélez, O. G. Romanov, M. López-Escobar, N. Ortega-Quijano and J. L. Arce-Diego, "Necrosis prediction of Photodynamic Therapy applied to skin disorders", *Proceedings of SPIE*, vol. 7161, pp. 71610P, 2009.
- [3] F. Scarmato De Rosa, R. Fonseca Vianna Lopez, J. A. Thomazine, A. C. Tedesco, N. Lange, and M. V. Lopes Badra Bentley, "In Vitro Metabolism of 5-ALA Esters Derivatives in Hairless Mice Skin Homogenate and in Vivo PpIX Accumulation Studies", *Pharmaceutical Research*, vol. 21, no. 12, pp. 2247-2252, 2004.
- [4] Harvinder S. Gill, Samantha N. Andrews, Senthilkumar K. Sakthivel, Andrew Fedanov, Ifor R. Williams, David A. Garber, Frances H. Priddy, Seth Yellin, Mark B. Feinberg, Silvija I. Staprans, Mark R. Prausnitz, "Selective removal of stratum corneum by microdermabrasion to increase skin permeability", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 38, pp. 95-103, 2009.
- [5] L. O. Svaasand, P. Wyss, M. T. Wyss, Y. Tadir, B. J. Tromberg, M. W. Berns, "Dosimetry model for PDT with topically administered photosensitizers", *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 18, pp. 139-149, 1996.
- [6] L. Wang, S. L. Jacques, L. Zheng, "MCML – Monte Carlo modelling of light transport in multi-layered tissues", *Computer methods and programs in biomedicine*, vol. 47, pp. 131-146, 1995.
- [7] T. H. Foster, R. S. Murant, R. G. Bryant, R. S. Knox, S. L. Gibson and R. Hilf, "Oxygen Consumption and Diffusion Effects in Photodynamic Therapy", *Radiation Research*, vol. 126, no. 3, pp. 296-303, 1991.
- [8] Xin-Hua Hu, Yuanming Feng, Jun Q. Lu, Ron R. Allison, Rosa E. Cuenca, Gordon H. Downie and Claudio H. Sibata, "Modeling of a Type II Photofrin-mediated Photodynamic Therapy Process in a Heterogeneous Tissue Phantom", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 81, no. 6, pp. 1460-1468, 2005.
- [9] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher and A. T. Byrne, "Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 85, pp. 1053-1074, 2009.
- [10] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro", *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, pp. 2597-2616, 2005.