

ZORIENTOWANA KRYSZTALIZACJA METALOPORFIRYN: WPŁYW POLA MAGNETYCZNEGO I BŁON LIPIDOWYCH*

ORIENTED CRYSTALLIZATION OF METALLOPORPHYRINS: EFFECT OF MAGNETIC FIELD AND LIPID MEMBRANES

Witold K. SUBCZYŃSKI¹, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA¹,
William E. ANTHOLINE²

¹Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków;

²Biophysics Research Institute, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

Streszczenie: Tetrafenyloporfirynewy kompleks miedzi (CuTPP) wiąże się z lipidową dwuwarstwą. Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) zorientowanych, ciekłokrystalicznych błon z fosfatydylocholino dimyrystynowej (DMPC) zawierających CuTPP wskazują, że dla zawartości CuTPP ≤ 1 mol% powierzchnia cząsteczek CuTPP jest prostopadła do powierzchni błony, natomiast dla zawartości ≥ 4 mol% ich powierzchnia jest równoległa do powierzchni błony. Metody impulsowe ERP oraz symulacja komputerowa widm ERP wskazują, że za zmianę orientacji cząsteczek CuTPP ze wzrostem ich zawartości w błonie odpowiedzialna jest wzajemna asocjacja CuTPP w pobliżu środka błony. Tworzą się tam kilkucząsteczkowe struktury podobne do kryształów CuTPP. Innym czynnikiem, który może indukować zorientowaną krystalizację cząsteczek CuTPP, jest pole magnetyczne o natężeniu ≥ 1000 G. Kryształy powstające w przesyconych roztworach w polu magnetycznym zorientowane są tak, że płaszczyzny cząsteczek CuTPP są równoległe do linii sił pola. Szybkość krystalizacji cząsteczek CuTPP jest też większa w obecności pola magnetycznego. Przedyskutowane jest znaczenie wymienionych zjawisk dla fototerapii nowotworów wykorzystującej porfiryne jako czynniki fotoczułujące. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 285–296)

Słowa kluczowe: agregacja porfiryne; orientacja porfiryne w błonie; lipidowa dwuwarstwa; fototerapia z wykorzystaniem porfiryne.

Summary: Copper(II) tetraphenylporphyrin (CuTPP) has been found to partition favorably into lipid bilayer membranes. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of oriented fluid-phase dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) membranes indicate that for a low ($\leq 1/100$) CuTPP/DMPC molar

*Praca częściowo finansowana w ramach grantu RR 01008 z NIH, USA i częściowo przez Uniwersytet Jagielloński.

ratio the plane of CuTPP is preferentially perpendicular to the membrane surface while for a high ($\geq 1/25$) CuTPP/DMPC molar ratio the plane of the molecule is parallel to the bilayer surface. Additional saturation-recovery EPR measurements, as well as computer simulations of EPR spectra lead to the conclusion that the change of the CuTPP orientation at high CuTPP/DMPC molar ratio is coupled with self-association by planar stacking of CuTPP molecules near the lipid bilayer center. An additional factor that can induce oriented crystallization of CuTPP is a strong (≥ 1000 G) magnetic field. Crystals formed in oversaturated solutions are oriented with planes of molecules parallel to the magnetic field. The presence of the magnetic field also increases the rate of CuTPP crystallization. The relevance of these findings to porphyrin photodynamic therapy is discussed. (*Advances in Cell Biology 2001: suppl. 16: 285–296*)

Key words: porphyrin aggregation; porphyrin-membrane orientation; lipid bilayer; porphyrin phototherapy.

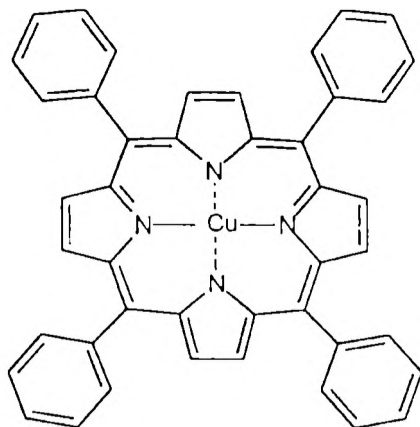
WSTĘP

Związki porfiryne stosowane są szeroko w fototerapii nowotworów jako czynnik fotouczulający. Zazwyczaj, czynnik ten jest mieszaniną porfiryń z różnymi grupami bocznymi [4, 11]. Uważa się, że głównym miejscem fotouczulanych reakcji zachodzących z udziałem porfiryń są błony komórkowe [5, 12]. Zastosowanie fotouczulaczy w terapii opiera się na ich selektywnym wchłanianiu przez komórki nowotworowe i długotrwałym przebywaniu w tych komórkach [7] lub/i ich selektywnym oddziaływaniu z błonami plazmatycznymi komórek nowotworowych [23]. Ważne jest więc zrozumienie podstawowych procesów odpowiedzialnych za oddziaływanie fotouczulacza z lipidową dwuwarstwą błon biologicznych oraz badanie procesów transportu fotouczulacza do miejsc jego działania. Istotne jest również określenie czynników zwiększających wydajność akumulacji fotouczulacza w nowotworach.

Prowadzone przez nas badania dotyczyły wymienionych powyżej zagadnień. Użyliśmy w nich głównie porfiryń skompleksowanych z miedzią. Wprowadzenie do pierścienia porfiryneowego jonu miedzi czyni tę cząsteczkę sondą paramagnetyczną. Umożliwia to zastosowanie różnych technik spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). Kompleks miedzi z tetrafenyloporfiryną (CuTPP) ma unikalne własności spektralne. Widma ERP pozwalają nie tylko określić ruchliwość i orientację cząsteczek CuTPP w układzie, gdy związek ten występuje w formie monomerów, ale także stopień agregacji oraz orientację mikrokryształów CuTPP względem zewnętrznego pola magnetycznego. Zdobyte przez nas wcześniej doświadczenie w badaniach oddziaływania kompleksów miedzi z lipidową dwuwarstwą [1, 19, 20, 24, 25] i białkami [30], a także w symulacji widm ERP tych kompleksów [15, 16] pozwoliło na przeprowadzenie eksperymentów i analiz, które dostarczyły nowych wyników. Trzeba podkreślić, że badane uprzednio związki miedzi wykazywały aktywność przeciwnowotworową [18], a także były stosowane jako środki kontrastowe w tomografii z wykorzystaniem emisji pozytronów [14].

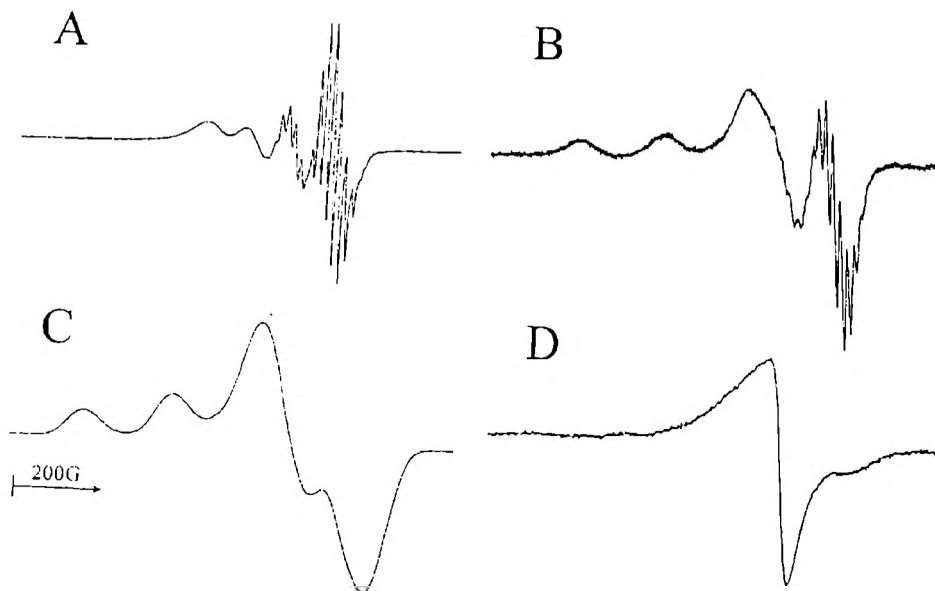
WIDMA ERP METALOPORFIRYN

W badaniach prowadzonych metodą ERP, porfiryne kompleksy miedzi są bardziej użyteczne niż żelazoporfiryne, gdyż pomiary nie są ograniczone do niskich temperatur. Opisane w pracy badania dotyczą głównie CuTPP, w której jon miedzi tworzy wiązania koordynacyjne z czterema atomami azotu (rys. 1). Widmo ERP tego kompleksu składa się więc z czterech linii struktury nadsubtelnej, które ulegają rozszczepieniu supernadsubtelnemu, w wyniku oddziaływania niesparowanego elektronu z jądrami czterech atomów azotu o spinie jądrowym $I = 1$ dając złożoną strukturę supernadsubtelną. Struktura ta widoczna jest w widmach ERP dla roztworów CuTPP o niskiej (chloroform, rys. 2A) i wysokiej (olej parafinowy, rys. 2B) lepkości. W takich roztworach rotacja cząsteczek CuTPP powoduje częściowe lub całkowite uśrednienie anizotropii oddziaływania nadsubtel-



CuTPP

RYSUNEK 1. Struktura chemiczna CuTPP



RYSUNEK 2. Zarejestrowane w temperaturze pokojowej widma ERP kompleksu CuTPP: roztwór w chloroformie (A); roztwór w oleju parafinowym (B); w postaci polikrystalicznej (C) i w formie agregatów z przypadkową wzajemną orientacją cząsteczek (D)

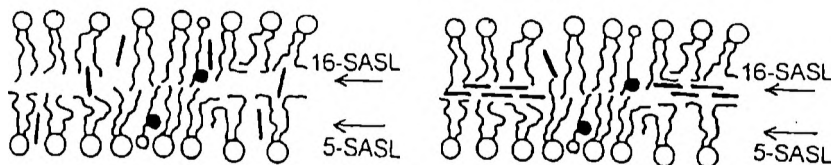
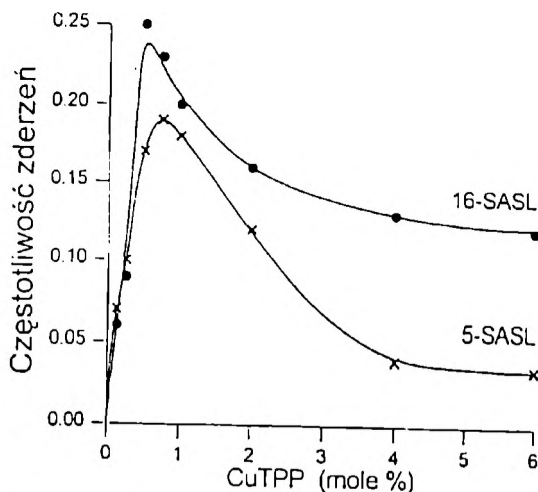
nego i współczynnika spektroskopowego rozszczepienia g . Dla niskich stężeń kompleksu magnetyczne oddziaływania między cząsteczkami są zanedbywalne.

W magnetycznie czystych kryształach cząsteczki CuTPP ułożone są równoległe do siebie i przesunięte względem siebie o pół długości pierścienia [6]. Odległość Cu–Cu wynosi w tych kryształach 8,3 Å, co sugeruje, że silne dipolowe oddziaływanie magnetyczne między sąsiadującymi jonami miedzi spowoduje poszerzenie linii ERP i „zlanie się” ich w jedną szeroką linię. Oddziaływanie dipolowe jest jednak silnie zredukowane przez cztery pierścienie fenylove ustawione prostopadłe do pierścienia porfiryny, dzięki czemu widma ERP takich kryształów mają dobrze rozdzieloną strukturą nadsubtelną (rys. 2C). Struktura supernadsubtelna jest jednak w tych widmach niewidoczna, co wskazuje na pewne dipolowe poszerzenie widm ERP [2, 13]. Magnetycznie czyste agregaty, w których cząsteczki CuTPP zorientowane są przypadkowo względem siebie, dają widma ERP mające pojedynczą, szeroką linię (rys. 2D).

LOKALIZACJA, ORIENTACJA I RUCHLIWOŚĆ CuTPP W LIPIDOWEJ DWUWARSTWIE

Porfiryny i metaloporfiryny znane są ze swej tendencji do agregacji w roztworach wodnych nawet przy niskich stężeniach [3]. Inaczej oddziałują one na błony w formie monomerów, a inaczej w formie zagregowanej. Na przykład hemina katalizuje utlenianie lipidów i białek błonowych przede wszystkim w formie monomerycznej, natomiast narusza strukturę błony głównie w formie zagregowanej [22]. Hydrofobowe składniki stosowanych w fototerapii mieszanin pochodnych porfiryny wykazują także tendencję do agregacji w roztworach wodnych. Włączanie ich do błon, głównego miejsca fotouczulanych reakcji, zachodzi po powtórnym rozpuszczeniu się zagregowanych cząsteczek porfiryn [4, 12]. Badania nad lokalizacją, orientacją, dynamiką i agregacją CuTPP w lipidowych dwuwarstwach prowadzone są przez naszą grupę od wielu lat [17, 20, 27].

W celu określenia lokalizacji CuTPP w błonach z fosfatydylocholiny dimiry-stynowej (DMPC) w fazie ciekłokrystalicznej mierzyliśmy częstotliwość zderzeń CuTPP z wolnorodnikowym, nitroksylowym fragmentem znacznika spinowego 5-SASL, zlokalizowanym w rejonie węgla C-5 łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów i znacznika 16-SASL, zlokalizowanym w centrum błony. Zgodnie z równaniem Smoluchowskiego częstotliwość zderzeń zależy od sumy współczynników dyfuzji zderzających się cząsteczek i stężenia CuTPP w miejscu lokalizacji fragmentu nitroksylowego. Jak widać na rysunku 3, dla niskich zawartości CuTPP w błonie ($\leq 0,5$ mol%) częstotliwości zderzeń z obydwoma znacznikami są podobne i wzrastają liniowo wraz ze wzrostem zawartości CuTPP. Częstotliwości zderzeń osiągają maksimum przy zawartości CuTPP 0,5–0,75 mol% i przy dalszym jej



RYSUNEK 3. Częstotliwość zderzeń (jednostki względne) cząsteczek CuTPP z wolnorodnikowym fragmentem znacznika spinowego 5-SASL i 16-SASL w funkcji zawartości CuTPP w błonie DMPC w fazie ciekłokrystalicznej (25°C). Schematy u dołu wskazują pozycję fragmentu wolnorodnikowego znacznika 5-SASL (w pobliżu głów polarnych) i 16-SASL (w centrum błony) oraz ilustrują lokalizację i orientację monomerycznej lub zasocjowanej formy CuTPP w błonie DMPC. Z lewej strony zilustrowany jest przypadek dla zawartości CuTPP w błonie $0 \leq 1$ mol%, a z prawej dla zawartości ≥ 4 mol%

wzroście spadają do 20–50% swej maksymalnej wartości. Przy zawartości 4–6 mol%, częstotliwość zderzeń CuTPP z 16-SASL jest około 3,5 razy większa niż z 5-SASL. Sugeruje to, że w tym zakresie stężeń, cząsteczki CuTPP zlokalizowane są głównie w centrum błony. A więc można wyróżnić dwa wyraźne obszary zawartości CuTPP w lipidowej dwuwarstwie (poniżej i powyżej 0,5–1 mol%), dla których sposób oddziaływania CuTPP z błoną w fazie ciekłokrystalicznej różni się w zasadniczy sposób. Częstotliwość zderzeń innego, hydrofobowego kompleksu miedzi, CuKTSM₂ (kompleks miedzi z bis(N⁴,N⁴-dimetylo-tiosemikarbazonem)-3-etoksy-2-oksyaldehydu masłowego) ze zlokalizowanymi w błonie znacznikami spinowymi wzrastała liniowo aż do 2 mol% CuKTSM₂ (maksymalna użyta zawartość) [24]. Była ona porównywalna z częstotliwością zderzeń dla CuTPP w zakresie <0,5 mol%. Analiza widm ERP CuTPP w zorientowanych błonach pozwoliła na wyjaśnienie przyczyny tego nieoczekiwanego zachowania cząsteczek CuTPP w lipidowej dwuwarstwie.

Niskie zawartości CuTPP w błonie

• Widma ERP układu zorientowanych błon DMPC w fazie ciekłokrystalicznej zawierających 1 mol% CuTPP zarejestrowane dla pola magnetycznego równoległego i prostopadłego do powierzchni błony mają dobrze rozdzieloną strukturę supernadsubtelną. Widma te różnią się jednak znacznie między sobą. Obecność struktury supernadsubtelnej w widmach wskazuje na znaczną ruchliwość pojedynczych cząsteczek (monomerów) CuTPP w błonie. Różnice w widmach sugerują uprzywilejowaną orientacją powierzchni cząsteczek CuTPP prostopadłą do powierzchni błony. Stosując opracowaną przez nas wcześniej metodę „pseudokonwolucji” [16] przeprowadzono symulacje komputerowe widm. Widma symulowane dobrze odtwarzały widma eksperymentalne przy założeniu silnie ograniczonej reorientacji cząsteczki CuTPP względem osi prostopadłej do powierzchni błony. Parametr uporządkowania powierzchni cząsteczek CuTPP względem normalnej do powierzchni błony wynosił $S_{\text{mol}} = 0,88$. Pomimo znacznego uporządkowania, dyfuzja rotacyjna kompleksu jest szybka. Odpowiednie współczynniki dyfuzji wraz z ich dokładną definicją podane są w pracy [17]. Schemat ilustrujący lokalizację i orientację monomerów CuTPP w błonie DMPC dla niskich zawartości CuTPP przedstawiony jest na rysunku 3 z lewej strony.

Wysokie zawartości CuTPP w błonie

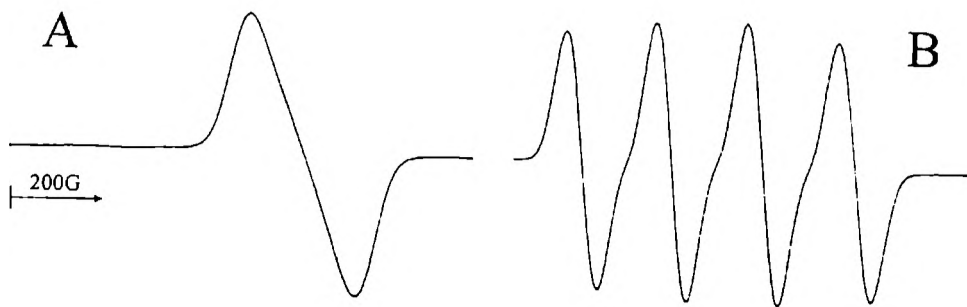
Widma ERP otrzymane dla wysokich zawartości CuTPP (4 mol%) w zorientowanych błonach DMPC w fazie ciekłokrystalicznej różnią się zasadniczo od widm otrzymanych dla niskich zawartości. Nie ma w nich struktury supernadsubtelnej, natomiast wyraźna struktura nadsubtelna (cztery linie składowej g_{\parallel}) obserwowana jest tylko wtedy, gdy pole magnetyczne jest prostopadłe do powierzchni błony. Dla pola równoległego do powierzchni błony linie składowej g_{\parallel} widma praktycznie znikają. Ten nieoczekiwany wynik może być wytłumaczony tylko przy założeniu, że dla zawartości CuTPP $\geq 4\text{mol}\%$ powierzchnia cząsteczek jest równoległa do powierzchni błony. A więc orientacja cząsteczek w błonie zależy od stosunku molowego CuTPP/DMPC i zmienia się z jego wzrostem z prostopadłej na równoległą do powierzchni błony. Brak struktury supernadsubtelnej sugeruje znaczne oddziaływanie dipolowe Cu–Cu, tak jak w kryształach CuTPP [2, 13].

Nasze wcześniejsze badania wskazują, że inne płaskie, hydrofobowe kompleksy miedzi CuKTSM₂ [25] i CuL [19] nawet przy wysokich zawartościach (4 mol%), orientują się w błonach w fazie ciekłokrystalicznej z powierzchnią kompleksu prostopadłą do powierzchni błony. Równoległa do powierzchni błony orientacja CuTPP dla zawartości powyżej 1 mol% wyróżnia porfiryny wśród innych płaskich kompleksów miedzi. Przyczyną tego jest łatwość porfiryn i metaloporfiryn do tworzenia agregatów i stosów cząsteczek z równoległym ułożeniem ich powierzchni w wyniku oddziaływania π – π [29].

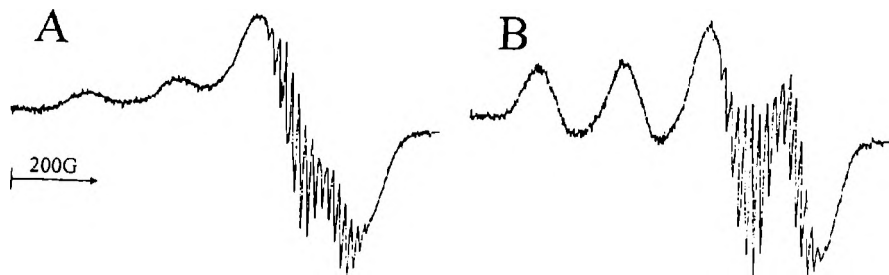
Powyższe wyniki, a także dane przedstawione na rysunku 3 wskazują, że przy wysokich stężeniach zachodzi asocjacja cząsteczek CuTPP w błonie. Zasocjowane cząsteczki CuTPP ulokowane są w centrum błony tak, że ich płaszczyzny są równoległe do jej powierzchni. Zasocjowane cząsteczki tworzą stopy o strukturze takiej, jaka występuje w kryształach CuTPP. Te zasocjowane struktury są kilkucząsteczkowe, tak że tworzące je cząsteczki CuTPP mają ciągle znaczny kontakt z otaczającymi je hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi lipidów. Wnioski wynikające z analizy widm ERP potwierdzają symulacje komputerowe. Zasocjowane struktury CuTPP i ich lokalizacja w błonie przedstawione są schematycznie na rysunku 3 z prawej strony.

KRYSZTAŁIZACJA W POLU MAGNETYCZNYM

Kryształy paramagnetycznych cząsteczek, takich jak CuTPP, mogą orientować się w polu magnetycznym, gdy mają anizotropię tensora podatności magnetycznej $\Delta\chi = \chi_{||} - \chi_{\perp}$ ($\chi_{||}$ i χ_{\perp} to podatności magnetyczne odpowiednio w kierunku równoległym i prostopadłym do normalnej do powierzchni cząsteczki CuTPP). Jeżeli $\Delta\chi$ jest ujemne, to kryształy orientują się tak, że linie sił pola magnetycznego są równoległe do powierzchni cząsteczek (orientacja negatywna). Jeżeli natomiast $\Delta\chi$ jest dodatnie, to kryształy zorientują się powierzchnią cząsteczek CuTPP prostopadle do linii sił pola magnetycznego (orientacja pozytywna). Widma ERP wskazują, że powstające w polu magnetycznym kryształy CuTPP zorientowane są negatywnie [26]. Pod nieobecność pola orientacja kryształów CuTPP jest przypadkowa. Pole magnetyczne o natężeniu 200 G orientuje już kryształy CuTPP, natomiast maksymalny efekt uporządkowania wywołuje pole o natężeniu 1000 G.



RYSUNEK 4. Widma ERP kryształów CuTPP otrzymanych na płaskim dnie kiuwety po powolnym (7 dni) odparowaniu chloroformu w polu magnetycznym o natężeniu 12 000 G. Powierzchnia dna kiuwety równoległa była do linii sił pola magnetycznego: A – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego równoległy do powierzchni dna kiuwety. W widmie widoczna jest tylko jedna linia składowej g_{\perp} . B – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego prostopadły do powierzchni dna kiuwety. W widmie widoczne są tylko cztery linie składowej $g_{||}$. Widma zarejestrowano w pasmie X w temperaturze 25°C



RYSUNEK 5. Widma ERP roztworu CuTPP oraz zawieszonych w nim mikrokryształów utworzonych w mieszaninie olej parafinowy – chloroform po odparowaniu chloroformu. Próbką zamrożona była w polu magnetycznym o natężeniu 3000 G do temperatury -170°C i dopiero potem rejestrowane były widma ERP: A – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego równoległy do pola podczas zamrażania próbki. B – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego prostopadły do pola zamrażania (po obrocie kapilary o 90°).

Gdy powierzchnia kiuwety, na której następuje krystalizacja, jest równoległa do linii sił pola magnetycznego, wtedy powstające na niej kryształy CuTPP są jednakowo zorientowane. Widma ERP takiego układu oraz pojedynczego kryształu CuTPP są identyczne. Widma ERP kryształów CuTPP otrzymanych w polu magnetycznym na płaskiej powierzchni pokazano na rysunku 4.

Można też otrzymać mikrokryształy CuTPP zawieszone bezpośrednio w roztworze i zorientowane w polu magnetycznym podczas odparowywania chloroformu z nasyconego roztworu CuTPP w mieszaninie olej parafinowy – chloroform. Uwidocznienie orientacji cząsteczek CuTPP możliwe jest tylko po zamrożeniu roztworu. Przypadek ten zilustrowano na rysunku 5. Po obrocie kapilary z niezamrożonym roztworem (w temperaturze pokojowej) mikrokryształy CuTPP wracają do orientacji zgodnej z kierunkiem działającego w danej chwili pola magnetycznego. Czas powrotu zależy od lepkości rozpuszczalnika i dla oleju parafinowego wynosi kilka sekund.

Pole magnetyczne nie tylko orientuje powstałe (lub powstające) mikrokryształy CuTPP, ale także zwiększa szybkość krystalizacji.

Powyższe dane wskazują na silne oddziaływanie pola magnetycznego z mikrokryształami CuTPP. Powinny być one zatem wciągane w obszar silnego pola magnetycznego i w tym obszarze utrzymywane. Bardzo podobnie zachowuje się też inny paramagnetyczny kompleks tetrafenyloporfiryny, FeTPP [26]. W tym przypadku uwidocznienie krystalizacji i orientacji możliwe jest tylko po zamrożeniu próbki do temperatury poniżej -150°C . W temperaturze pokojowej widmo ERP kompleksu FeTPP nie jest widoczne.

UWAGI KOŃCOWE

- Opisane powyżej badania podstawowe mogą mieć też znaczenie aplikacyjne:
- (1) Poznanie sposobu oddziaływania porfiryn z błoną lipidową jest ważne, gdyż właśnie błony są głównym miejscem ataku fotodynamicznego w fototerapii nowotworów. Jednakże, niewiele jest danych dotyczących tego zagadnienia. W prowadzonych przez inne ośrodki badaniach nad orientacją porfiryn w błonach używano specjalnie w tym celu chemicznie zmodyfikowanych związków [9, 10]. Zastosowane błony były też dalekie od błon biologicznych [10]. Co więcej, badania prowadzono w niefizjologicznych warunkach słabego uwodnienia błon i temperatury ciekłego azotu [9]. Gros i Ehrenberg [8] wykorzystali też metodę gaszenia fluorescencji porfiryn przez znaczniki spinowe do wyznaczenia lokalizacji porfiryn w błonie w fazie ciekłokrystalicznej. Jednakże, praca ta zawierała poważne błędy metodyczne (patrz dyskusja w [27]). Prowadzone przez nas badania [17, 20, 27] dotyczyły błon w fazie ciekłokrystalicznej i utworzonych z lipidów występujących w układach biologicznych. Poznanie orientacji, lokalizacji i agregacji porfiryn w błonie jest niezbędne dla lepszego zrozumienia procesu fotouczulania. Najważniejszym otrzymanym przez nas wynikiem jest wykazanie zależności stężeniowej; przy dużych stężeniach cząsteczki CuTPP agregują w błonie, w efekcie czego ulega zmianie ich orientacja i lokalizacja. Hydrofobowa komponenta stosowanych w fototerapii mieszanin porfiryn powinna zachowywać się w wyżej opisany sposób, to znaczy agregować i zmieniać orientację w błonie. Nasze prace niosą więc pewną wskazówkę (czy też ostrzeżenie) dla lekarzy i innych osób zaangażowanych w badania z tej dziedziny, gdyż akumulacja porfiryn w błonie niekoniecznie musi prowadzić do zwiększenia efektywności procesu fotouczulania.
 - (2) Silne oddziaływanie paramagnetycznych metaloporfiryn z polem magnetycznym sugeruje możliwość wykorzystania pola magnetycznego w celu ukierunkowania transportu porfiryn do fotouczulanego miejsca, którym może być nowotwór, a także zwiększenia efektywności akumulacji porfiryn w obszarze niszczonego nowotworu przez wzmożenie ich krystalizacji. W tym celu wystarczyłoby umieścić silny magnes nad nowotworem, a do krwioobiegu (lub w pobliże nowotworu) wstrzyknąć zawiesinę mikrokryształów paramagnetycznej metaloporfiryny.
 - (3) Anizotropia podatności magnetycznej fosfolipidów wykorzystana została w ostatnich latach do orientacji fragmentów błon lipidowych (*bicelles*) w silnym polu magnetycznym [21]. Skompleksowanie z powierzchnią błony paramagnetycznych jonów metali z grupy lantanowców znacznie wzmacnia ten proces [28]. Wydaje się, że paramagnetyczne kompleksy porfiryn (CuTPP lub FeTPP), które dobrze orientują się w błonie lipidowej, a także wykazują znaczną anizotropię podatności magnetycznej, mogą być wykorzystane do orientacji lipidowej dwuwarstwy w polu magnetycznym. W zależności od stężenia kompleksu możliwe byłoby orientowanie błony prostopadle lub równoległe do linii sił pola. Można przypuszczać, że silne

oddziaływanie CuTPP z polem magnetycznym pozwoli na zorientowanie fragmentów błon (*bicelles*) w polach magnetycznych stosowanych w konwencjonalnej spektroskopii ERP (~3000 G dla pasma X i ~ 12 000 G dla pasma Q).

Zdajemy sobie dobrze sprawę z niedostatków naszych „aplikacyjnych” rozważań. Stosowane w fototerapii porfiryry albo nie zawierają żadnych jonów metali lub zawierają jony diamagnetyczne. Obecność paramagnetycznego jonu w pierścieniu porfiryrynowym znacznie skraca czas życia stanów wzbudzonych porfiryry, a co za tym idzie, zmniejsza efektywność ich fotodynamicznego działania. Wydaje się jednak, że wnioski z punktu (1) dotyczące CuTPP można też przenieść i na inne porfiryry, gdyż proces agregacji jest charakterystyczny dla wszystkich porfiryry. Omówiony w punkcie (2) indukowany polem magnetycznym ukierunkowany transport oraz akumulacja CuTPP nie zachodzi dla porfiryry diamagnetycznych. Wydaje się, że stosowane w fototerapii mieszaniny porfiryry można dotować pewną ilością porfiryrynowych kompleksów miedzi lub żelaza. Pozwoliłoby to wykorzystać paramagnetyczną składową jako „ciągnącą” i zapoczątkowującą krystalizację (tworzącą zarodki krystalizacji w polu magnetycznym), podczas gdy diamagnetyczna składowa działałaby fotouczulająco. Mieszaniny porfiryry powinny być wprowadzane do organizmu w formie mikrokryształów zawierających „wystarczającą” ilość jednakowo zorientowanych paramagnetycznych kompleksów. Makroskopowa anizotropia podatności magnetycznej agregatów przypadkowo zorientowanych cząsteczek zanika. Omówione w punkcie (3) zastosowania wymagają jedynie sprawdzenia, jaka jest niezbędna ilość jednakowo zorientowanych cząsteczek CuTPP lub FeTPP we fragmentach błon (*bicelles*) do ich orientacji w polu magnetycznym.

LITERATURA

- [1] ANTHOLINA WE, SUBCZYŃSKI WK, HYDE JS, PETERING DH. A model study for transport of metalodrugs within lipid bilayers. [w] Soreson JRJ [red.] *Biology of Copper Complexes*. Clifton: Humana Press 1987: 493–500.
- [2] ASSOUR JM. Electron spin resonance of tetraphenylporphine chelates. *J Chem Phys* 1965; **43**: 2477–2489.
- [3] BROWN SB, VERNON DI. The quantitative determination of porphyrins in tissue and body fluids: applications in studies of photodynamic therapy. [w] Kessel D [red.] *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease*. Boca Rotan: CRC Press 1970: 109–129.
- [4] DOUGHERTY TJ. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 1986; **45**: 879–889.
- [5] DOUGHERTY TJ, KAUFMAN JE, GOLDFARB A, WEISHAUPHT KR, BOYLE D, MITTMAN A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978; **38**: 2628–2635.
- [6] FLEISCHER EB, MILLER CK, WEBB LE. Crystal and molecular structures of some tetraphenylporphines. *J Am Chem Soc* 1964; **86**: 2342–2347.
- [7] GOMER CJ, DOUGHERTY TJ. Determination of ^3H and ^{14}C hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res* 1979; **39**: 146–151.

- [8] GROSS E, EHRENBERG B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1989; **983**: 118–122.
- [9] GROVES JT, NEUMANN R. Regioselective oxidation catalysis in synthetic phospholipid vesicles. Membrane-spanning steroidal metalloporphyrins. *J Am Chem Soc* 1989; **111**: 2900–2909.
- [10] ISHIKAWA Y, KUNITAKE T. Design of spatial disposition of anionic porphyrins in matrices of ammonium bilayer membranes. *J Am Chem Soc* 1991; **113**: 621–630.
- [11] KESSEL D. Hematoporphyrin and HPD: photophysics, photochemistry and phototherapy. *Photochem Photobiol* 1984; **39**: 851–859.
- [12] MALIK Z, DJALDETTI M. Destruction of erythroleukemia, myeloma, leukemia and Burkitt lymphoma cells by photoactivated protoporphyrin. *Int J Cancer* 1980; **26**: 495–500.
- [13] MANOHARAN PT, ROGERS MT. ESR study of copper(II) and silver(II) tetraphenylporphyrin [w] Yen TF [red.] *Electron Spin Resonance of Metal Complexes*. New York: Plenum Press 1969: 143–173.
- [14] MATHIAS CJ, GREEN MA, MORRISON WB, KNAPP DW. Evaluation of CuPTSM as a tracer of tumor perfusion: comparison with labeled microspheres in spontaneous canine neoplasms. *Nucl Med Biol* 1994; **21**: 83–87.
- [15] PASENKIEWICZ-GIERULA M, ANTHOLINE WE, SUBCZYNSKI WK, BAFFA O, HYDE JS, PETERING DH. Assessment of the ESR spectra of CuKTSM₂. *Inorg Chem* 1987; **26**: 3945–3949.
- [16] PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Dynamics of cupric bithiosemicarbazonate complex in solution and in oriented artificial membrane. [w]. Proc 2nd Symp Inorg Biochem Mol Biophys. Wrocław 1989: 94–98.
- [17] PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Rotational motion of square planar copper complexes in solution and phospholipid bilayer membranes. *J Phys Chem* 1997; **101**: 5596–5606.
- [18] PETERING DH, PETERING HG. Metal chelates of 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazonate), H₂KTS [w] Scartorelli AC, Johns DG [red.] *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York: Springer 1975: 841–876.
- [19] PEZESHK A, PEZESHK V, SUBCZYNSKI WK. Orientational and motional properties of copper(II) complexes of dibenzotetraaza (14) annulenes in lipid bilayers: an ESR study. *J Inorg Biochem* 1991; **44**: 47–53.
- [20] PEZESHK A, PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Motional properties of copper(II) tetraphenylporphyrin and copper(II) hematoporphyrin IX in lipid bilayers: an ESR study. *J Phys Chem* 1990; **94**: 451–456.
- [21] SANDERS CR, SCHWONEK JP. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixture of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* 1992; **31**: 8898–8905.
- [22] SCHMITT TH, FREZZETTI WJ, SCHREIER S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys* 1993; **307**: 69–103.
- [23] SIEBER F. Merocyanine 540. *Photochem Photobiol* 1987; **46**: 1035–1042.
- [24] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, HYDE JS, KUSUMI A. Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structure of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of copper complex in the membrane. *Biochemistry* 1990; **29**: 7936–7945.
- [25] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, HYDE JS, PETERING DH. Orientation and mobility of copper square planar complex in a lipid bilayer. *J Am Chem Soc* 1987; **109**: 46–52.
- [26] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, PASENKIEWICZ-GIERULA M, HYDE JS. Magnetic field oriented crystallization of CuTPP. 22nd International EPR Symposium, Denver, USA 1999 Abstract No. 93.

- [27] SUBCZYŃSKI WK, PASENKIEWICZ-GIERULA M, ANTHOLINE WE, HYDE JS. Oriented self-association of copper(II) tetraphenylporphine in liquid-crystalline lipid bilayer membranes: an EPR study. *J Am Chem Soc* 1999; **121**: 4054–4059.
- [28] VOLD RR, PROSSER RS. Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *J Magn Reson B* 1996; **113**: 267–271.
- [29] WHITE WI. Aggregation of porphyrins and metalloporphyrins [w] Dolpin D [red.] *The Porphyrins*. New York: Academic Press 1978: 303–339.
- [30] YUAN H, ANTHOLINE WE, SUBCZYŃSKI WK, GHREEN MA. Release of CuPTSM from human serum albumin after addition of fatty acids. *J Inorg Biochem* 1996; **61**: 251–259.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków