



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Poszukiwanie aktywnych związków fotouczulających pod kątem ich aplikacji w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworowej

Author: Marzena Rams-Baron

Citation style: Rams-Baron Marzena. (2012). Poszukiwanie aktywnych związków fotouczulających pod kątem ich aplikacji w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworowej. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet śląski w Katowicach
Instytut fizyki im. Augusta Chełkowskiego

MARZENA RAMS-BARON

**POSZUKIWANIE AKTYWNYCH ZWIĄZKÓW
FOTOUCZULAJĄCYCH POD KĄTEM ICH APLIKACJI
W FOTODYNAMICZNEJ DIAGNOSTYCE I TERAPII
NOWOTWOROWEJ**

PRACA DOKTORSKA WYKONANA
POD KIERUNKIEM
PROF. DR HAB. ALICJI RATUSZNEJ

KATOWICE 2012

SKŁADAM SERDECZNE PODZIĘKOWANIA
PROF. DR HAB. ALICJI RATUSZNEJ
ZA STWORZENIE IDEALNYCH WARUNKÓW PRACY,
OPIEKĘ NAUKOWĄ, CENNE WSKAZÓWKI I SUGESTIE
ORAZ OKAZANĄ ŻYCZLIWOŚĆ.

DZIĘKUJĘ **DR AGNIESZCE SZURKO** ZA POŚWIĘCONY CZAS,
POMOC I WSPARCIE PODCZAS REALIZACJI PRACY.

WYRAZY WDZIĘCZNOŚCI DLA
PROF. DR. FRANZA-PETERA MONTFORTSA
ZA UDOSTĘPNIENIE ZWIĄZKÓW DO BADAŃ.

DZIĘKUJĘ WSZYSTKIM **WSPÓŁPRACOWNIKOM**
ZA OKAZANĄ POMOC I SERDECZNĄ ATMOSFERĘ W PRACY.

NAJBLIŻSZYM DZIĘKUJĘ ZA CIERPLIWOŚĆ I OGROMNE WSPARCIE.

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP - AKTUALNY STAN WIEDZY NA TEMAT TERAPII FOTODYNAMICZNEJ	7
II.	CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1.	Procesy fotofizyczne i fotochemiczne towarzyszące terapii fotodynamicznej	10
2.	Charakterystyka reaktywnych form tlenu	13
3.	Własności tlenu singletowego	14
4.	Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego	17
5.	Utlenianie biomolekuł przez reaktywne formy tlenu	18
6.	Charakterystyka fotouczulaczy stosowanych w PDT	21
7.	Fotostabilność fotouczulaczy	29
8.	Wnikanie i biodystrybucja fotouczulaczy	31
9.	Mechanizmy śmierci komórek podczas terapii fotodynamicznej	33
10.	Białko p53 i jego rola w procesie apoptozy	37
11.	Rola światła w terapii fotodynamicznej	38
12.	Znaczenie tlenu w terapii fotodynamicznej	40
13.	Kliniczne zastosowania terapii fotodynamicznej	41
III.	CEL I ZAKRES PRACY	46
IV.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	47
1.	Badane związki	47
2.	Badania fizyczne	51
2.1	Spektroskopia elektronowa UV-VIS	51
2.1.1	Widma absorpcyjne	51
2.1.2	Widma fluorescencji	52
2.1.3	Kwantowa wydajność fluorescencji	53
2.2	Laserowa fotoliza błyskowa	54
2.2.1	Wyznaczanie czasu życia molekuł w stanie trypletowym	55
2.2.2	Wyznaczenie kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego ...	56
2.3	Badanie fotostabilności	57

3. Badania biologiczne	57
3.1 Komórki nowotworowe i warunki hodowli	57
3.2 Cytotoksyczność i fototoksyczność	58
3.3 Ocena przeżywalności komórek testem MTS	60
3.4 Ocena przeżywalności komórek testem klonogenności	61
3.5 Badanie kinetyki wnikania fotouczulaczy do komórek	62
3.6 Mikroskopowe badanie cech morfologicznych komórek po terapii.....	63
3.7 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa	64
3.8 Analiza statystyczna	65
V. OTRZYMANE WYNIKI I DYSKUSJA	67
1. Badania fizyczne	67
1.1 Widma absorpcyjne	67
1.2 Własności emisyjne	75
1.3 Kwantowa wydajność fluorescencji	79
1.4 Wyznaczanie czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym.....	83
1.5 Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego	86
1.6 Fotostabilność fotouczulaczy	93
2. Badania biologiczne	98
2.1 Badanie kinetyki wnikania fotouczulaczy do komórek	98
2.2 Badanie cytotoksyczności i fototoksyczność	101
2.3 Zmiany morfologii komórek po naświetleniu	110
2.4 Ocena lokalizacji fotouczulaczy przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej..	116
VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	119
VII. LITERATURA	123
VIII. SPIS TABEL	136
IX. SPIS RYSUNKÓW	138
X. SPIS WYKRESÓW	141

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AIF	– czynnik indukujący apoptozę (ang. <i>apoptosis inducing factor</i>)
AK	– rogowacenie słoneczne (ang. <i>actinic keratosis</i>)
ALA	– kwas 5-aminolewulinowy (ang. <i>5-aminolevulinic acid</i>)
AMD	– starcze zwyrodnienie plamki żółtej (ang. <i>age-related macular degeneration</i>)
AP	– miejsce w DNA pozbawione zasady (apurynowe/apirymidynowe)
BCC	– rak podstawnokomórkowy skóry (ang. <i>basal cell carcinoma</i>)
BCG	– szczepionka przeciw gruźlicy (<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>) wykorzystywana w leczeniu nowotworów pęcherza moczowego
BPD-MA	– monokwasowa pochodna benzoporfiryny (ang. <i>benzoporphyrin derivative monoacid</i>)
BSA	– albumina z bydlęcej surowicy (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CDAM	– wzorce molekularne związane ze śmiercią komórki (ang. <i>cell death-associated molecular patterns</i>)
DABCO	– 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DAMP	– wzorce molekularne związane z uszkodzeniem komórki (ang. <i>danger/damage associated molecular patterns</i>)
DISC	– kompleks sygnałowy zapoczątkowujący śmierć komórki (ang. <i>death-inducing signaling complex</i>)
DMEM	– podłoże hodowlane Dulbecco zmodyfikowane przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>)
DMSO	– dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy
ER	– siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i>)
FBS	– bydlęca surowica płodowa (ang. <i>foetal bovine serum</i>)
FCS	– cielęca surowica płodowa (ang. <i>foetal calf serum</i>)
Hct116	– komórki nowotworowe gruczolaka okrężnicy (ang. <i>human colon carcinoma cell line</i>)
HGD	– dysplazja przełyku dużego stopnia (ang. <i>high grade dysplasia</i>)
HOMO	– najwyższy zajęty orbital molekularny (ang. <i>highest occupied molecular orbital</i>)
IC ₅₀	– stężenie badanego czynnika powodujące zahamowanie żywotności komórek o 50% (ang. <i>inhibitory concentration</i>)

ISC	– przejście międzysystemowe (ang. <i>intersystem crossing</i>)
LDL	– lipoproteiny niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
LIF	– fluorescencja wzbudzana laserowo (ang. <i>light induced fluorescence</i>)
LUMO	– najniższy nie zajęty orbital molekularny (ang. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MDA	– dialdehyd malonowy (ang. <i>malondialdehyde</i>)
mTHPC	– 5,10,15,20-tetra(m-hydroksyfenilo)chloryna
MTS	– sól błękitu tetrazolowego: [3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium]
NIR	– promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu bliskiej podczerwieni
NK	– komórki układu odpornościowego odpowiedzialne za zjawisko naturalnej cytotoxyczności NK (ang. <i>natural killers</i>)
PBS	– zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDD	– diagnostyka fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic diagnosis</i>)
PDT	– terapia fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic therapy</i>)
PE	– wydajność posiewu (ang. <i>plating efficiency</i>)
PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i>)
PLA	– polilaktyd (ang. <i>polylactide</i>)
PLGA	– poli(D,L-laktydo-ko-glikolid) (ang. <i>poly(D,L-lactide-co-glycolide)</i>)
PVP	– poliwinylpirolidon (ang. <i>polyvinylpyrrolidone</i>)
RFT	– reaktywne formy tlenu
SCC	– rak kolczystokomórkowy skóry (ang. <i>squamous cell carcinoma</i>)
SF	– frakcja przeżywająca (ang. <i>survival fraction</i>)
TPP	– 5,10,15,20-tetrafenyloporfiryne
UV	– promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu nadfioletu
VEGF	– czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VIS	– promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu widzialnego

I. WSTĘP - AKTUALNY STAN WIEDZY NA TEMAT TERAPII FOTODYNAMICZNEJ

Podstawą terapii fotodynamicznej (PDT) jest wprowadzenie do organizmu pacjenta światłoczułych związków chemicznych, nazywanych fotouczulaczami i naświetleniu ich promieniowaniem o określonej długości fali, w celu wywołania destrukcji tkanki nowotworowej. Proces ten wymaga współdziałania trzech składników:

- I. *fotouczulacza*, który jest barwnikiem selektywnie gromadzącym się w tkance nowotworowej i uczulającym ją na działanie światła,
- II. *tłenu*, którego obecność warunkuje rodzaj zachodzących reakcji fotochemicznych,
- III. *źródła światła* emitującego fale spójne z maksimum absorpcji danego fotouczulacza.

Terapia fotodynamiczna jest metodą interdyscyplinarną. Wymaga ścisłej współpracy lekarzy, fizyków i chemików, która powinna zaczynać się już na etapie projektowania nowego związku fotouczulającego. Kluczowym elementem terapii fotodynamicznej jest posiadanie fotouczulacza o odpowiednich właściwościach. Wieloletnie badania pozwoliły na stworzenie listy cech, jakimi taki „idealny fotouczulacz” powinien się charakteryzować. Jednak pomimo dość dobrze ugruntowanej wiedzy w tym zakresie, liczba dostępnych fotouczulaczy wciąż pozostaje niezadawalająca.

Jak dotąd dość dobrze poznane zostały podstawy procesów fizycznych i fotochemicznych towarzyszących PDT. W wielu pracach opisano mechanizmy reakcji, podczas których powstają wolne rodniki, reaktywne nadtlenki oraz tlen singletowy, uszkadzające biomolekuły oraz prowadzące do śmierci komórek. Jednak biologiczny mechanizm odpowiedzi na PDT wciąż nie jest do końca wyjaśniony. Wiadomo, że jest to proces złożony, obejmujący bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych (w procesie nekrozy, apoptozy i autofagii) oraz procesy pośrednie, związane z uszkodzeniem naczyń guza oraz aktywnością układu immunologicznego. Ponieważ niszczenie komórek nowotworowych obejmuje wiele alternatywnych i krzyżujących się ze sobą szlaków, wciąż bada się zależności między obserwowanymi procesami

i zjawiskami. Wiele uwagi poświęca się mechanizmom pośrednim. Szczególnie immunostymulacyjne działanie PDT wydaje się być obiecujące, tym bardziej, że zarówno radio- jak i chemioterapia powodują zaburzenie funkcji układu odpornościowego.

Obecne badania skupiają się na poszukiwaniu strategii, która pozwoliłaby na zwiększenie udowodnionej już skuteczności terapeutycznej PDT. Odbywający się w ostatnich latach rozwój badań podstawowych pozwolił lepiej zrozumieć biologię guza, co umożliwiło tworzenie nośników specyficznym transportujących fotouczulacz do komórek nowotworowych np. dzięki ligandom skierowanym do konkretnych receptorów na powierzchni guza. Dużo uwagi poświęca się dozymetrii PDT i optymalizacji warunków leczenia. Dzięki rozwojowi technologii dostępny jest szeroki wybór źródeł światła odpowiednich dla terapii fotodynamicznej. Wciąż analizuje się wpływ stosowanych dawek światła, parametrów szybkości transferu energii i strategii związanych ze sposobem naświetlenia (dwufotonowe PDT, naświetlanie frakcjonowane, metronomiczne PDT) na obserwowane efekty terapeutyczne.

Obecnie terapia fotodynamiczna jest wykorzystywana w leczeniu niektórych typów nowotworów, stanów przedrakowych oraz pewnych chorób nienowotworowych (np. zwyrodnienia plamki żółtej, miażdżycy). Procedura stosowania PDT jest dwuetapowa i obejmuje podanie fotouczulacza (doustnie, dożylnie, miejscowo), a po odpowiednim czasie naświetlenie obszaru zmiany chorobowej. Selektywność leczenia osiągana jest dzięki wybiórczemu gromadzeniu fotouczulacza w guzie i precyzyjnemu naświetleniu obszaru zainteresowania. Taka podwójna selektywność z pewnością jest ogromną zaletą PDT. Uniemożliwia jednak niszczenie ewentualnych ognisk przerzutowych. Dlatego nadzieje pokładane są w immunologicznym aspekcie PDT i wywołaniu swoistej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, która mogłaby w przyszłości przyczynić się do niszczenia tego typu zmian. Do niewątpliwych zalet terapii fotodynamicznej możemy zaliczyć brak mutagennego wpływu na komórki, ponieważ żaden ze stosowanych fotouczulaczy nie gromadzi się w jądrze komórkowym. W porównaniu z chemo- i radioterapią PDT nie jest tak obciążająca dla zdrowia pacjenta. Specyficzny sposób działania (za pośrednictwem reaktywnych utleniaczy) sprawia, że PDT może być bezpiecznie łączona z innymi formami terapii. Ogromną zaletą jest możliwość połączenia PDT z diagnostyką fotodynamiczną (PDD). Natomiast wśród wad wymieniana jest nadwrażliwość pacjentów na światło, która

w zależności od fotouczulacza, może utrzymywać się przez różny czas po zakończeniu terapii oraz ograniczone możliwości wnikania światła do tkanek pozwalające na niszczenie zmian nowotworowych na głębokości, w zakresie od kilku milimetrów do 1 centymetra. Najważniejsze zalety i ograniczenia terapii fotodynamicznej podsumowano w tabeli 1. Pomimo wymienionych ograniczeń terapia fotodynamiczna cieszy się coraz większym zainteresowaniem i powoli znajduje swoje miejsce wśród powszechnie przyjętych strategii leczenia chorób nowotworowych, już nie tylko jako metoda uzupełniająca lub poprawiająca komfort życia przy braku możliwości innego leczenia, ale także jako terapia stosowana z wyboru.

Tabela 1. Główne zalety i ograniczenia terapii fotodynamicznej. Ograniczenia są sklasyfikowane jako fundamentalne dla idei PDT oraz narzucone przez obecny stan technologii (Wilson, 2008).

Zalety	Ograniczenia	
	<i>fundamentalne</i>	<i>technologiczne</i>
<p><u>Ogólne:</u> Platforma lecznicza o szerokim spektrum zastosowań. Minimalnie inwazyjna. Niska toksyczność systemowa.</p> <p>Różne mechanizmy biologicznego oddziaływania.</p> <p>Możliwość powtórnego zabiegu bez wywołania oporności i nadmiernego obciążania pacjenta. Możliwość kombinacji z innymi formami leczenia. Wysoce "przenośna" (możliwość stosowania w warunkach ambulatoryjnych) i stosunkowo niedroga metoda terapeutyczna.</p>	<p>Ograniczona możliwość wnikania światła w głąb tkanek.</p> <p>Nie dotyczy leczenia chorób systemowych.</p> <p>Kompleksowa optymalizacja wymaga uwzględnienia wielu czynników.</p>	<p>Brak systemów naświetlania ogólnego przeznaczenia.</p> <p>Ograniczone stosowanie i dokładność dozymetrii klinicznej. Konieczność optymalizacji i personalizacji warunków leczenia.</p>
<p><u>Guzy łitte:</u> Szybki efekt pojedynczego zabiegu.</p> <p>Różne możliwości stosowania: lecznicze, paliatywne, zapobiegające progresji choroby.</p>	<p>Efekt terapeutyczny zależny od obecności tlenu i własności fotouczulacza.</p> <p>Trudne do osiągnięcia pożądane efekty terapeutyczne przy leczeniu guzów litych o większych objętościach.</p>	<p>Ograniczona specyficzność klinicznych fotouczulaczy (powoduje nadwrażliwość na światło słoneczne po zabiegu).</p>

II. CZEŚĆ TEORETYCZNA

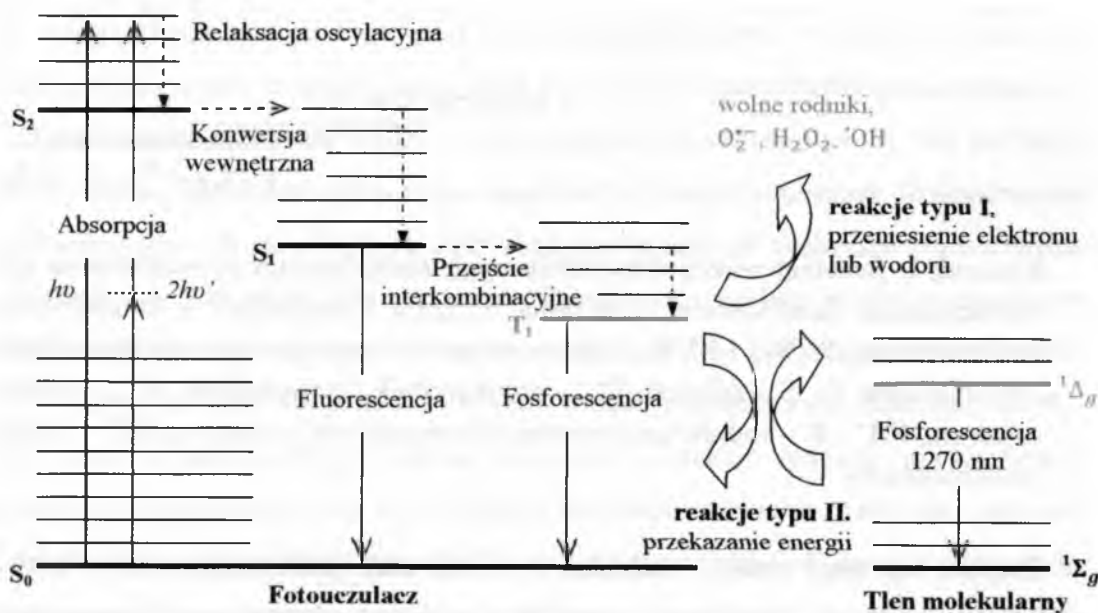
1. Procesy fotofizyczne i fotochemiczne towarzyszące terapii fotodynamicznej

Warunkiem koniecznym do zainicjowania reakcji fotodynamicznej jest zaabsorbowanie przez cząsteczkę fotouczulacza światła o energii odpowiedniej do jego wzbudzenia. Wykorzystuje się w tym celu promieniowanie z zakresu ultrafioletu (UV), światła widzialnego (VIS) lub bliskiej podczerwieni (NIR). Promieniowanie o krótszej długości fali (czyli większej energii) spowodowałoby jonizację molekuł, natomiast to o większej długości, posiadałoby energię niedostateczną do wzbudzenia elektronowego. W praktyce, do wzbudzenia wykorzystuje się światło o długości fali przypadającej na czerwony zakres światła widzialnego, przesunięte nieco w kierunku podczerwieni.

Procesy fotofizyczne zachodzące po wzbudzeniu cząsteczki fotouczulacza przedstawiono na rysunku 1 przy pomocy zmodyfikowanego diagramu Jabłońskiego. W wyniku absorpcji kwantu o odpowiedniej energii, cząsteczka fotouczulacza przechodzi do najniższego wzbudzonego stanu singletowego S_1 . Jeżeli dojdzie do zaabsorbowania fotonu o wyższej energii, to wówczas wzbudzone zostaną wyższe poziomy energetyczne, z których dochodzi do szybkiej relaksacji oscylacyjnej i powrotu do stanu S_1 poprzez konwersję wewnętrzną. Ze stanu S_1 powrót do stanu podstawowego S_0 odbywa się najczęściej na drodze promienistej, w procesie fluorescencji. Formalnie fluorescencją nazywamy promieniste przejście między stanami o tej samej multipletowości. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej zjawisko fluorescencji jest istotne na przykład podczas obrazowania, badania farmakokinetyki, czy też z punktu widzenia dozymetrii PDT. Przejście z poziomu S_1 na S_0 na drodze bezpromienistej, choć dozwolone spinowo, jest mało prawdopodobne ze względu na dużą przerwę energetyczną między tymi stanami. Drugim sposobem dezaktywacji stanu S_1 jest przejście z zamianą spinu do stanu T_1 w procesie konwersji międzysystemowej, nazywanej przejściem interkombinacyjnym (ISC). Przejścia między stanami o różnej multipletowości są wzbronione, natomiast możliwe ze względu na małą przerwę energetyczną między stanami S_1 , a T_1 . Większość fotouczulaczy jest tak zbudowana, że posiada szeroką przerwę energetyczną między stanem S_1 , a S_0 , natomiast znacznie węższą między stanem S_1 , a T_1 , co zwiększa prawdopodobieństwo przejścia. Czas życia większości fotouczulaczy w stanie singletowym S_1 wynosi około 1 ns do 15 ns. Czas życia stanu T_1 jest znacznie dłuższy. Związane jest to z utrudnionym powrotem ze stanu

T_1 do S_0 , wymagającym nie tylko odwrócenia spinu, ale również pokonania szerokiej przerwy energetycznej między tymi stanami. W efekcie przy braku interakcji z innymi molekułami, czas ten może wynosić kilkaset mikrosekund lub więcej. Poza bezpromienistym przejściem do stanu podstawowego czas życia fotouczulacza w stanie trypletowym T_1 może skracać zjawisko fosforescencji, związane z utratą energii wzbudzenia i powrotem do stanu podstawowego S_0 na drodze promienistej. Fosforescencja dotyczy promienistego przejścia między stanami o różnej multipletowości, jest zatem procesem wzbronionym, który w fazie ciekłej i temperaturze pokojowej ma niewielkie praktyczne znaczenie (Paszyc, 1992), (Hamblin, 2008), (Plaetzer, 2009), (Josefsen, 2008).

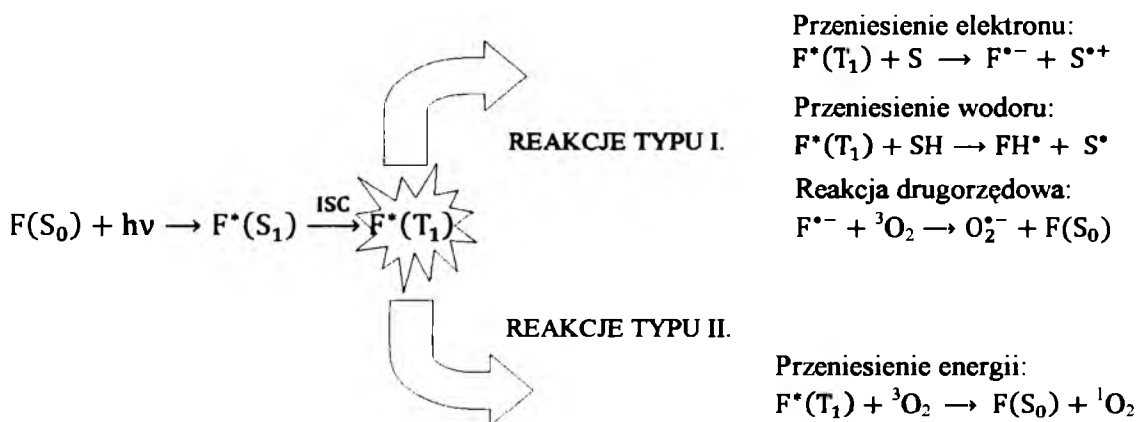
W badaniach nad skutecznością terapii fotodynamicznej, jedną z nowszych strategii jest zastosowanie dwufotonowego PDT, wykorzystującego do wzbudzenia fotouczulacza krótkie (około 100 femtosekundowe) impulsy laserowe, o bardzo wysokiej mocy szczytowej. Oba fotony są pochłaniane jednocześnie, a każdy z nich dostarcza połowę energii wymaganej do wzbudzenia, co pozwala na zastosowanie promieniowania o większej długości fali niż w przypadku jednofotonowego PDT (Agostinis, 2011), (Hamblin, 2008), (Starkey, 2008).



Rysunek 1. Schemat procesów fotofizycznych zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki fotouczulacza

Metastabilny stan trypletowy odgrywa ważną rolę w terapii fotodynamicznej jako punkt wyjścia dla reakcji fotochemicznych, w wyniku których powstają wolne rodniki, reaktywne nadtlenki i tlen singletowy, odpowiedzialne za niszczenie komórek nowotworowych (Graczykova, 1999). Proces ten może przebiegać według dwóch mechanizmów (Josefsen, 2008), (Plaetzer, 2009):

- mechanizm reakcji typu I – obejmuje reakcje związane z przeniesieniem elektronu lub wodoru między wzbudzoną cząsteczką fotouczulacza i substratem, co prowadzi do powstania wolnych rodników, które następnie reagując z tlenem inicjują dalsze reakcje utlenienia,
- mechanizm reakcji typu II – obejmuje reakcje przeniesienia energii pomiędzy wzbudzoną cząsteczką fotouczulacza, a cząsteczką tlenu $^3\text{O}_2$, prowadzące do powstania niezwykle reaktywnego tlenu singletowego $^1\text{O}_2$.

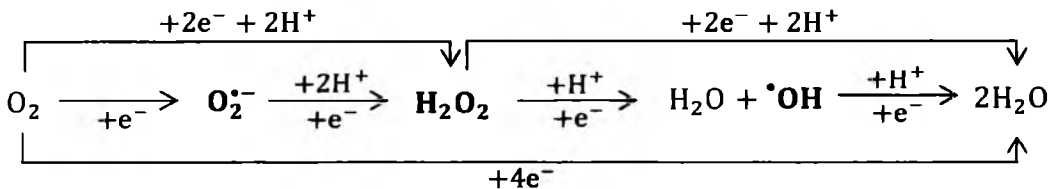


Rysunek 2. Schemat reakcji fotochemicznych zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki fotouczulacza. Zastosowane oznaczenia: $F(S_0)$ - fotouczulacz w singletowym stanie podstawowym, $F^*(S_1)$ i $F^*(T_1)$ - fotouczulacz we wzbudzonym stanie singletowym S_1 i trypletowym T_1 , S - substrat, $F^{\bullet-}$ - anionorodnik fotouczulacza, $S^{\bullet+}$ - kationorodnik substratu, FH^{\bullet} i S^{\bullet} - rodniki odpowiednio fotouczulacza i substratu, $\text{O}_2^{\bullet-}$ - anionorodnik ponadtlenkowy.

Zwykle oba typy reakcji zachodzą w komórkach jednocześnie, a to który z nich przeważa zależy od różnych czynników, w szczególności typu fotouczulacza oraz stężenia tlenu. Dla większości fotouczulaczy stosowanych w PDT, reakcje prowadzące do powstania tlenu singletowego wydają się jednak dominujące (Plaetzer, 2009), (Castano, 2004).

2. Charakterystyka reaktywnych form tlenu

Reaktywne formy tlenu (RFT) są produktami ubocznymi metabolizmu tlenowego (Woźniak, 2008). Zaliczamy do nich wolne rodniki i nadtlenki, powstające w trakcie kolejnych etapów redukcji cząsteczki tlenu (m. in. anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, nadtlenek wodoru H_2O_2 , rodnik hydroksylowy OH^{\bullet}) oraz tlen singletowy. Na rysunku 3 przedstawiono kolejne etapy redukcji cząsteczki tlenu.

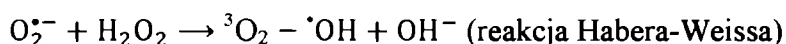


Rysunek 3. Schemat powstawania reaktywnych form tlenu podczas jedno-, dwu- oraz trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu (Bartosz, 2008).

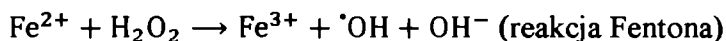
Anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ - powstaje w większości biologicznych reakcji w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu i jest swego rodzaju prekursorem wszystkich pozostałych RFT (Ścibior-Bentkowska, 2009). W środowisku wodnym $O_2^{\bullet-}$ może przyłączać proton dając rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^{\bullet} . Obydwa rodniki mogą ulegać reakcji dysmutacji, produkując nadtlenek wodoru oraz tlen, co sprawia, że praktycznie wszędzie tam, gdzie pojawia się anionorodnik ponadtlenkowy pojawia się również nadtlenek wodoru. Anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ nie jest zbyt reaktywny wobec głównych elementów budulcowych makrocząsteczek biologicznych (np. aminokwasów lub elementów kwasów nukleinowych). W reakcjach chemicznych może pełnić rolę reduktora lub utleniacza. Stosunkowo szybko może reagować ze związkami zawierającymi grupy tiolowe, może inaktywować białka zawierające centra żelazowo-siarkowe oraz reagować z jonami metali metaloprotein (Bartosz, 2008). Bardzo ważne z biologicznego punktu widzenia są reakcje redukcji jonów metali przejściowych, znajdujących się na wyższych stopniach utlenienia. Jako taki, właśnie reduktor prowadzi do powstania jonu Fe^{2+} niezbędnego w reakcji Fentona i przyczynia się tym samym do powstania rodnika hydroksylowego. Dodatkowo może reagować z samym rodnikiem hydroksylowym, powodując powstanie tlenu singletowego lub z tlenkiem azotu (NO^{\bullet}), powodując powstanie nadtlenuazotynu ($ONOO^-$), silnie utleniającej cząsteczki wchodzącej w reakcje z lipidami i białkami (Castano, 2004).

W porównaniu do $O_2^{\bullet-}$, rodnik wodoronadtlenkowy jest silniejszym utleniaczem i może łatwiej dyfundować przez błony biologiczne. Dodatkowo w przeciwieństwie do $O_2^{\bullet-}$, rodnik wodoronadtlenkowy może atakować kwasy tłuszczowe i inicjować reakcje peroksydacji lipidów (Bartosz, 2008), (Gutowicz, 2011).

Nadtlenek wodoru H_2O_2 - jest stosunkowo mało reaktywny, ale posiada łatwość dyfuzji przez błony komórkowe i dzięki temu może pojawiać się w różnych przedziałach komórkowych (Plaetzer, 2009). Jest lepszym utleniaczem, ale gorszym reduktorem od anionorodnika ponadtlenkowego. Biologicznie istotne są dwa rodzaje reakcji: utlenianie grup tiolowych oraz utlenianie jonów metali przejściowych (Fe^{2+} do Fe^{3+} oraz Cu^+ do Cu^{2+}) prowadzące do powstania rodnika hydroksylowego (Bartosz, 2008). W wyższych stężeniach nadtlenek wodoru może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym produkując rodnik hydroksylowy (Plaetzer, 2009), (Ścibior-Bentkowska, 2009):



Rodnik hydroksylowy $\bullet OH$ - jest jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy. Wysoka reaktywność w połączeniu z brakiem swoistości substratowej sprawia, że rodnik hydroksylowy może reagować praktycznie ze wszystkimi substancjami występującymi w organizmie (Gutowicz, 2011). Głównymi reakcjami, w których uczestniczy są reakcje oderwania atomu wodoru od alkanów i ich pochodnych oraz reakcje addycji do wiązań podwójnych. Do reakcji chemicznych będących źródłem rodnika hydroksylowego zaliczamy reakcję Fentona oraz reakcję Habera-Weissa. Obecnie przyjęta koncepcja wyjaśniająca źródło rodnika hydroksylowego w układach biologicznych, zakłada istnienie cyklu dwóch reakcji. Jedną z nich jest właściwa reakcja Fentona, a drugą reakcja anionorodnika ponadtlenkowego z jonem żelaza (III) (Bartosz, 2008). Zapis sumaryczny obu reakcji jest następujący:



3. Własności tlenu singletowego

Stan podstawowy tlenu molekularnego, oznaczany w spektroskopii jako ${}^3\Sigma_g$, jest stanem trypletowym (wypadkowy spin elektronowy S wynosi 1, a krotność stanu $2S+1$ wynosi 3), co wynika z obecności dwóch niesparowanych elektronów na antywiążących orbitalach typu π . Tlen molekularny posiada dwa nisko położone stany wzbudzone,

oznaczone jako $^1\Delta_g$ oraz $^1\Sigma_g$, których konfiguracja elektronowa różni się między sobą strukturą antywiążących orbitali typu π (DeRosa, 2002), (Bensasson, 1993), (Bonnett, 2000). Ponieważ stany wzbudzone tlenu molekularnego są stanami singletowym, do ich powstania wymagane jest dostarczenie energii pozwalającej na takie przegrupowanie elektronów w cząsteczce, aby wypadkowy spin elektronowy wynosił zero (wówczas krotność stanu $2S+1$ wynosi 1) (Puzanowska-Tarasiewicz, 2008). Ze względu na bardzo krótki czas życia, tlen molekularny w wyższym wzbudzonym stanie singletowym $^1\Sigma_g$ nie odgrywa roli w procesach ważnych z punktu widzenia terapii fotodynamicznej i jest w opisie pomijany. Stosowany termin „tlen singletowy” dotyczy wyłącznie niższego, wzbudzonego stanu tlenu molekularnego (DeRosa, 2002). Porównanie własności stanów elektronowych tlenu molekularnego przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka stanów elektronowych tlenu molekularnego (Bonnett, 2000), (DeRosa, 2002)

Oznaczenie stanu	Energia [kJ · M ⁻¹]	Czas życia			Konfiguracja elektronowa
		w fazie skondensowanej	w fazie gazowej	w roztworze	
$^1\Sigma_g$	155	< 10 ⁻⁹ s	7 ÷ 12 s	10 ⁻¹¹ ÷ 10 ⁻³ s	$\uparrow \downarrow$
$^1\Delta_g$	94	~ 10 μ s	45 min	10 ⁻⁶ ÷ 10 ⁻⁹ s	$\uparrow\downarrow$ —
$^3\Sigma_g$	0	∞	-	-	$\uparrow \uparrow$

Tlen we wzbudzonym stanie singletowym $^1\Delta_g$ jest bardziej reaktywny od tlenu w stanie podstawowym $^3\Sigma_g$. Rozkład elektronów sprawia, że udział tlenu w stanie $^3\Sigma_g$ w reakcjach utlenienia jest utrudniony. Aby taka reakcja była możliwa, utleniana cząsteczka musiałaby również znajdować się w stanie trypletowym, co nie jest proste, ponieważ większość cząsteczek organicznych posiada singletowe stany podstawowe. W innym wypadku musiałoby nastąpić odwrócenie spinu jednego z elektronów utlenianej cząsteczki, co z kolei jest procesem silnie wzbronionym (Puzanowska-Tarasiewicz, 2008).

Tlen we wzbudzonym stanie singletowym może reagować z wieloma typami molekuł. Oddziaływanie to odbywa się na dwa sposoby. Poprzez przekazanie energii wzbudzenia cząsteczkom i powrót do podstawowego stanu trypletowego w procesie tzw. wygaszania fizycznego oraz poprzez udział w reakcjach chemicznych z innymi

molekułami (DeRosa, 2002). Do najważniejszych reakcji chemicznych w których uczestniczy tlen singletowy zaliczamy (Bartosz, 2008), (Bonnett, 2000):

- reakcje addycji do alkenów i ich pochodnych (związków alifatycznych posiadających wiązanie podwójne) oraz związków heterocyklicznych,
- utlenianie alkenów i ich pochodnych zawierających dwie lub więcej grup alkilowych do alkilonadtlenków, czemu towarzyszy zmiana położenia wiązania podwójnego (np. reakcja utleniania cholesterolu),
- 1,2-addycja do wiązań podwójnych w alkenach i ich pochodnych,
- utlenianie sulfidów do sulfotlenków (np. reakcja utleniania metioniny),
- utlenianie fenoli.

Czas życia tlenu singletowego w roztworze zależy od rozpuszczalnika (tabela 3) i dla czystej wody wynosi około 4 μ s. We wnętrzu komórek czas życia tlenu singletowego będzie determinowany głównie przez środowisko wodne i ulegnie skróceniu, w wyniku interakcji z różnymi biomolekułami (Hamblin, 2008). Oszacowano, że w układach biologicznych droga dyfuzji cząsteczki tlenu singletowego może wynosić od 10 nm do 55 nm (Agostinis, 2011). Wartość tę możemy porównać z rozmiarem typowej komórki (ok. 10 μ m - 30 μ m średnicy), rozmiarem mitochondriów (ok. 500 nm), czy grubością błon biologicznych (ok. 10 nm) (Hamblin, 2008), (Jiménez-Banzo, 2008). Tak ograniczone możliwości dyfuzji tlenu singletowego sprawiają, że generowane przez niego uszkodzenia dotyczą głównie tych miejsc, w których fotouczulacz się gromadzi (Phillips, 2010), (Castano, 2004). Aczkolwiek, pewne aktualne badania zakładają możliwość istnienia znacznie dłuższego czasu życia tlenu singletowego w środowisku wewnątrzkomórkowym, pozwalającego na dyfuzję nawet na odległość 0,3 μ m (Josefsen, 2008), (Hackbarth, 2010).

Najczęściej wykorzystywana metoda detekcji tlenu singletowego polega na rejestrowaniu charakterystycznej fosforescencji (przy około 1270 nm) towarzyszącej przejściu $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g$. Metoda ta doskonale nadaje się do badania roztworów fotouczulaczy w różnych rozpuszczalnikach chemicznych. Natomiast pomiar w niejednorodnym środowisku komórkowym niesie ze sobą wiele trudności, ale mimo to również cieszy się dużym zainteresowaniem. Moan i wsp. badając *in vitro* kinetykę fotodegradacji fotouczulaczy porfirynowych oszacowali, że czas życia tlenu singletowego w komórce może wynosić od 10 ns do 40 ns (Moan, 1991). Baker i wsp.

oszacowali, że czas ten może być dłuższy i wynosi od 170 ns do 320 ns (Baker, 1992). Pierwszy eksperyment związany z bezpośrednią detekcją fosforescencji tlenu singletowego wskazywał na wartości z zakresu od 4 μ s do 80 μ s (Baker, 1993). Bardziej aktualne badania wykonane zostały przez Niedre i wsp. Autorzy oszacowali, że czas życia tlenu singletowego może wynosić 600 ns \pm 400 ns, ale tylko 15 % - 19 % rejestrowanego sygnału pochodziło z komórki, a reszta z fotouczulacza zgromadzonego w medium zewnątrzkomórkowym (Niedre, 2002). Dużo kontrowersji budzą badania przeprowadzone przez Ogilby i wsp., którzy wykorzystując nową mikroskopową technikę detekcji tlenu singletowego uzyskali wyniki wskazujące na znacznie dłuższy czas życia tlenu singletowego (rzędu mikrosekund). Ich wyniki pokazują, że czas ten może być podobny do wartości uzyskiwanych w roztworach, co naukowcy tłumaczą wygaszaniem tlenu singletowego przede wszystkim przez oddziaływanie z cząsteczkami rozpuszczalnika, a nie jak dotąd zakładano, interakcje z elementami wewnątrzkomórkowymi (Snyder, 2005), (Snyder, 2006).

Tabela 3. Czas życia tlenu singletowego $^1\text{O}_2$ (τ_Δ) w różnych rozpuszczalnikach (Bensasson, 1993), (Bonnett, 2000)

Rozpuszczalnik	Czas życia tlenu singletowego τ_Δ [μ s]
woda	4
D ₂ O	60
metanol	7
benzen	30
toluen	27
aceton	50
chloroform	700

4. Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego

Zdolność fotouczulaczy do produkowania tlenu singletowego określa kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego Φ_Δ . Wielkość ta jest zależna od kwantowej wydajności stanu trypletowego Φ_T oraz wydajności procesu transferu energii pomiędzy wzbudzonym fotouczulaczem, a tlenem molekularnym, zgodnie z poniższą zależnością:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T \left(\frac{k_{en}[\text{O}_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[\text{O}_2]} \right) = \Phi_T \phi_{en}$$

Czynnik ϕ_{en} opisuje efektywność przekazania energii, tj. frakcję stanów trypletowych cząsteczek fotouczulacza, które uległy dezaktywacji na drodze transferu energii, prowadząc do powstania tlenu singletowego. Wartość ta jest wyrażona jako stosunek stałej szybkości reakcji przeniesienia energii k_{en} do sumy stałych szybkości reakcji wszystkich możliwych procesów mogących prowadzić do dezaktywacji stanu trypletowego T_1 . Stała k_q opisuje dezaktywację stanu trypletowego fotouczulacza poprzez reakcje transferu energii, przeniesienia elektronu lub indukowanego tlenem przejścia interkombinacyjnego. Natomiast stałe k_r i k_{nr} opisują odpowiednio, stałe szybkości promienistego (fosforescencja) i bezpromienistego (przejście interkombinacyjne) powrotu fotouczulacza ze wzbudzonego stanu trypletowego T_1 do stanu podstawowego S_0 . Wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego zależy również od stężenia tlenu w środowisku reakcji $[O_2]$.

Większość powszechnie stosowanych fotouczulaczy posiada kwantową wydajność generowania tlenu singletowego rzędu $0,3 \div 0,8$. Znaczenia tej wartości, choć istotnej z punktu widzenia użyteczności fotouczulacza w PDT, nie można jednak przeceniać odkąd wiadomo, że ilość produkowanego tlenu singletowego zależy również od wielu innych czynników (m. in. oddziaływania fotouczulacza z biopolimerami, zjawiska agregacji, efektu lokalnego wyczerpania tlenu podczas PDT) (DeRosa, 2002), (Lang, 2004).

5. Utlenianie biomolekuł przez reaktywne formy tlenu

Powstające w PDT reaktywne formy tlenu reagują ze związkami biologicznie czynnymi występującymi w komórce. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że najmniej wrażliwe na reakcje fotoutleniania są węglowodany, a jednym z głównych celów ataku RFT są białka. Stałe szybkości reakcji przedstawione w tabeli 4 wskazują, że tlen singletowy w pierwszej kolejności reaguje właśnie z białkami (Graczykova, 1999).

Tabela 4. Stałe szybkości reakcji 1O_2 z wybranymi biomolekułami (Graczykova, 1999)

Związek	Stała szybkości reakcji k [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]
białka	$10^8 - 10^9$
DNA	$10^5 - 10^6$
kwasy tłuszczowe występujące w membranach	$10^4 - 10^5$

Wśród wolnych rodników głównym mediatorem oksydacyjnych uszkodzeń białek jest rodnik hydroksylowy (Ścibior-Bentkowska, 2009), który odrywając proton przy węglu α wytwarza rodnik alkilowy, który następnie reagując z tlenem tworzy rodnik alkoksylowy. Oba te rodniki mogą utleniać kolejne aminokwasy, co prowadzi do pęknięć w łańcuchu polipeptydowym (Gutowicz, 2011). Wywołane RFT uszkodzenia białek obejmują fragmentację, di- oraz multimeryzację, rozwijanie i zmiany strukturalne białek prowadzące do zmian w ich funkcjonowaniu, zmian ich własności mechanicznych, agregacji, zmian w wiązaniu kofaktorów i jonów metali, tworzenia dalszych reaktywnych form i w efekcie przyspieszonej degradacji (Hamblin, 2008). Najbardziej podatne na działanie RFT są reszty aminokwasów aromatycznych i siarkowych. Szczególną wrażliwość wykazują tyrozyna, tryptofan, cysteina i metionina (Ścibior-Bentkowska, 2009). W kontekście PDT procesy te nie zostały dokładnie zbadane, natomiast zaobserwowano powstawanie wiązań krzyżowych (Liu, 2004), (Shen, 1996), karbonylację białek (Magi, 2004) oraz oksydacyjne modyfikacje białek zależne od rodzaju fotouczulacza i miejsca jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji (Hamblin, 2008).

Wiele fotouczulaczy wykazuje tendencję do oddziaływania z różnymi obszarami dwuwarstwy lipidowej. Dlatego błony biologiczne wydają się być krytycznym miejscem cytotoksycznego działania PDT (Graczykova, 1999). Najczęściej występującym procesem wolnorodnikowym w komórce jest łańcuchowa reakcja peroksydacji lipidów. Polega ona na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (zawierających wiele wiązań podwójnych), które wchodzi w skład fosfolipidów błonowych i lipoprotein, prowadząc do powstania nadtlenków tych związków (Gutowicz, 2011), (Bartosz, 2008). Formy wolnorodnikowe, w tym rodnik hydroksylowy, mogą inicjować reakcję peroksydacji lipidów poprzez usunięcie wodoru, natomiast tlen singletowy oddziałuje bezpośrednio z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi i cholesterolem (Hamblin, 2008). Do produktów końcowych, powstałych podczas rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zaliczamy różnego rodzaju aldehydy, hydroksyaldehydy oraz węglowodory etan i pentan (Bartosz, 2008). Charakterystycznym produktem jest mutagenny dialdehyd malonowy (MDA). Związki te modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych powodując zmiany przepuszczalności i depolaryzację błony, zaburzenie charakterystycznej asymetrii lipidowej, zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportowych, co może prowadzić do utraty integralności błon wewnątrzkomórkowych i błony

plazmatycznej (Bartosz, 2008). Girotti zwraca uwagę na istotną rolę produktów pośrednich reakcji peroksydacji lipidów (np. wodoronadtlenków lipidowych), które charakteryzują się dłuższymi czasami życia i w komórce mogą dyfundować na większe odległości, pełniąc rolę wtórnych przekaźników uszkodzeń generowanych przez RFT (Girotti, 2001).

Generalnie przyjmuje się, że PDT nie wykazuje działania mutagennego, tym bardziej, że zaden ze stosowanych fotouczulaczy nie gromadzi się w jądrze komórkowym (Hamblin, 2008). Aczkolwiek, pewne doniesienia potwierdziły powstawanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA *in vitro* pod wpływem PDT, obejmujących powstawanie miejsc AP (miejsc bez zasady), pojawienie się jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA, siostrzaną wymianę chromatyd, indukcję abberacji chromosomowych (Gomer, 1983). Zmiany te nie były jednak bezpośrednią przyczyną śmierci komórek. Dodatkowo zaobserwowano, że działanie mutagenne jest różne w zależności od typu komórek, co prawdopodobnie odzwierciedla różnice w możliwościach wykrycia i naprawy powstałych uszkodzeń (Robertson, 2009). Moan i wsp. porównali potencjał mutageny PDT oraz promieniowania rentgenowskiego i pokazali, że promieniowanie rentgenowskie powoduje 80% więcej pęknięć nici DNA, 5% częstszą siostrzaną wymianę chromatyd oraz więcej abberacji chromosomowych niż PDT (Macdonald, 2001). Uszkodzenia DNA są generowane przede wszystkim przez rodnik hydroksylowy lub ewentualnie tlen singletowy (pod warunkiem, że znajdzie się w sąsiedztwie kwasów nukleinowych). Reakcje oksydacyjnego uszkodzenia DNA przez rodnik hydroksylowy mogą być związane z uszkodzeniem zasad nukleinowych, reszt cukrowych lub rozrywaniem wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy, co prowadzi do powstawania pęknięć nici kwasów nukleinowych (Bartosz, 2008). Wykazano, że puryny ulegają łatwiej fotoutlenianiu niż pirymidyny, a guanina jest najbardziej wrażliwa na utlenienie w warunkach fizjologicznych (Sobolev, 2000). Z dotychczasowych badań wynika, że to właśnie guanina jest głównym celem ataku PDT (Graczykova, 1999). Potwierdzono powstawanie 8-hydroksyguaniny pod wpływem PDT, produktu wskazującego na oksydacyjne uszkodzenie DNA (Graczykova, 1999), (Chiaviello, 2011).

6. Charakterystyka fotouczulaczy stosowanych w PDT

Fotouczulacze wykorzystywane w terapii fotodynamicznej muszą posiadać odpowiednie własności: (Ethirajan, 2011), (Lang, 2004), (Hamblin, 2008), (Josefsen, 2008), (Plaetzer, 2009), (Allison, 2004), (Nyman, 2004), (Bonnett, 2000), (Král, 2006)

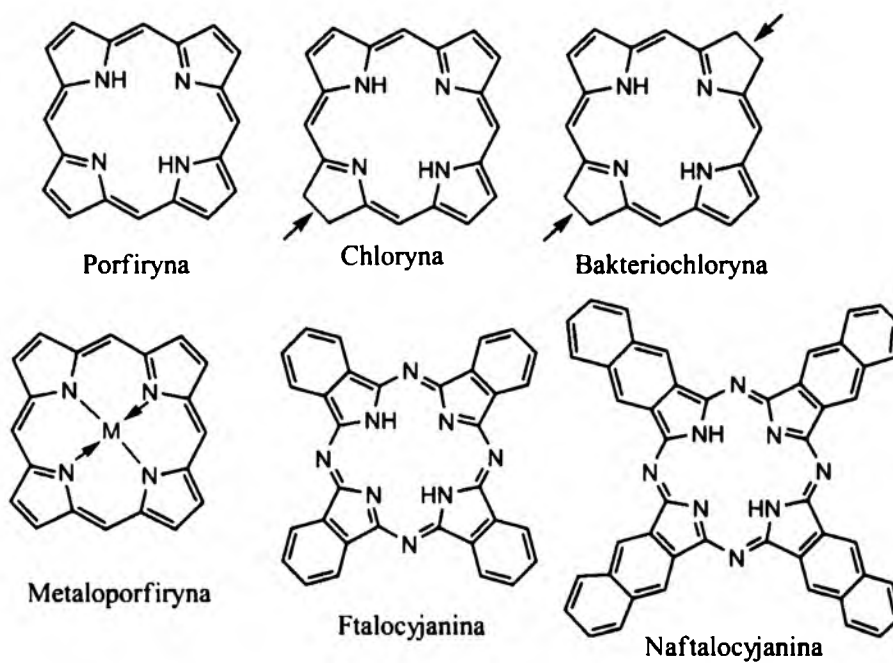
1. Muszą silnie absorbować promieniowanie z zakresu 600 nm – 800 nm (w obszarze tzw. okna terapeutycznego), które może głębiej wnikać do tkanek i jest w mniejszym stopniu osłabiane przez absorpcję wody oraz barwników endogennych, a jednocześnie posiada energię dostateczną do wzbudzenia cząsteczki tlenu ($\Delta E > 94 \text{ kJ} \cdot \text{M}^{-1}$, $\lambda < 1269 \text{ nm}$).
2. Po naświetleniu powinny wydajnie generować tlen singletowy $^1\text{O}_2$ lub inne reaktywne formy tlenu (RFT) pozwalające na skuteczne zniszczenie komórek nowotworowych, co uwarunkowane jest odpowiednimi własnościami fotofizycznymi:
 - wysoką kwantową wydajnością generowania stanu trypletowego $\Phi_T \geq 0,5$,
 - wysoką kwantową wydajnością generowania tlenu singletowego $\Phi_\Delta \geq 0,5$,
 - długim czasem życia w stanie trypletowym (τ_T rzędu mikrosekund),
 - wysoką energią stanu trypletowego ($\geq 94 \text{ kJ} \cdot \text{M}^{-1}$).
 Dodatkowo powinny posiadać umiarkowaną kwantową wydajność fluorescencji Φ_f ponieważ zbyt wydajna emisja, choć pożądana w diagnostyce fotodynamicznej, może ograniczać skuteczność terapeutyczną fotouczulacza ($\Phi_f + \Phi_T \leq 1$).
3. Powinny być stabilne w ciemności, podczas naświetlenia oraz w trakcie procesów fotochemicznych towarzyszących PDT.
4. Muszą być bezpieczne dla pacjenta, co gwarantuje brak toksycznego działania w ciemności, selektywne i szybkie gromadzenie w komórkach nowotworowych oraz szybkie wydalanie z organizmu.
5. Powinny posiadać własności fizykochemiczne pozwalające na skuteczną biodystrybucję (najlepiej gdy związek posiada właściwości amfifilowe) oraz zmniejszenie niepożądanego zjawiska agregacji.
6. Powinny charakteryzować się wysoką czystością chemiczną, a procedura ich otrzymywania powinna być możliwie prosta i wydajna.

Struktura większości fotouczulaczy opiera się na pierścieniu porfiryńowym (porfinie), który tworzą cztery cząsteczki pirolu połączone mostkami metinowymi. Ten makrocykliczny układ zbudowany jest z 22 elektronów π , w tym 18 zdelokalizowanych, spełniających warunek aromaticzności. Posiada charakterystyczne widmo absorpcji, zawierające intensywne pasmo Soreta przy ok. 400 nm (odpowiadające przejściu $\pi \rightarrow \pi^*$) oraz cztery pasma Q w obszarze widzialnym, charakteryzujące się mniejszą intensywnością. Redukcja zewnętrznych wiązań podwójnych, w naprzeciwnie położonych pierścieniach pirolowych nie powoduje utraty aromaticzności, ale zmienia symetrię układu, powodując batochromowe przesunięcie pasm Q (Hamblin, 2008), (Ethirajan, 2011), (Vo-Dinh, 2003). Zredukowane formy porfiryń nazywamy chlorynami (redukcja jednego wiązania podwójnego) lub bakteriochlorynami (redukcja dwóch wiązań podwójnych). Ostatnie pasmo absorpcji porfiryń położone jest w obszarze 630 nm – 650 nm, natomiast dla chloryn i bakteriochloryn, obserwuje się je odpowiednio przy 660 nm – 710 nm oraz 740 nm – 800 nm (Hamblin, 2008). Przesunięcie pasm absorpcji w kierunku fal dłuższych związane jest z różną szerokością przerwy energetycznej pomiędzy najwyższym zapełnionym orbitalem (HOMO) oraz najniższym nieobsadzonym orbitalem (LUMO), która rośnie następująco: bakteriochloryny < chloryny < porfiryńy (Bonnett, 2000), (Hamblin, 2008).

Kolejną grupę fotouczulaczy tworzą ftalocyjaniny zbudowane z czterech pierścieni indolowych, połączonych mostkami azometinowymi (Vo-Dinh, 2003). Ich ostatnie pasmo absorpcji występuje w obszarze 670 nm – 770 nm (Hamblin, 2008). Poprzez przyłączenie pierścienia benzenowego do każdego z czterech pierścieni indolowych, uzyskuje się jeszcze dalsze przesunięcie pasm absorpcji (o około 90 nm) i takie związki nazywamy naftalocyjaninami (Wainwright, 2009)

Dużą grupę fotouczulaczy tworzą związki zawierające centralnie wbudowany atom metalu. Taka modyfikacja pierścienia znacząco wpływa na własności fotouczulaczy. Zauważono, że diamagnetyczne metale, w przeciwieństwie do metali paramagnetycznych, najczęściej promują przejście interkombinacyjne i wydłużają czas życia fotouczulacza w stanie trypletowym. Jednakże od powyższej reguły można zaobserwować wyjątki, co sprawia, że nie ma ona uniwersalnego charakteru (Josefsen, 2008). Przykładem może być hematoporfiryna. Badania nad jej kompleksami z metalami, takimi jak miedź (II), kobalt (II), żelazo (II) lub cynk (II) pokazały, że związki te okazują się nieaktywne po naświetleniu (Ali, 1999). W przeciwieństwie do ftalocyjanin i teksafiryń, które tylko po przyłączeniu odpowiedniego (czyli

diamagnetycznego) metalu (np. cynk (II), aluminium (III), gal (III)) posiadają własności obiecujące z punktu widzenia zastosowań w PDT (Wainwright, 2009), (Ali, 1999), (Nyman, 2004). Poniżej przedstawiono struktury chemiczne fotouczulaczy



Rysunek 4. Struktury chemiczne omawianych fotouczulaczy (Hamblin, 2008), (Ethirajan, 2011)

W zależności od rozpuszczalności fotouczulacze możemy podzielić na (Bonnett, 2000), (Lang, 2004), (Macdonald, 2001):

- I. Hydrofilowe – to fotouczulacze wykazujące dobrą rozpuszczalność w środowisku wodnym. Tetrapiolowe fotouczulacze, anionowe lub kationowe, posiadające trzy lub cztery naładowane podstawniki zwykle wykazują polarny charakter. Symetrycznie rozmieszczone podstawniki zapewniają bardziej hydrofilowy charakter niż przyłączone w sposób asymetryczny. Przykładem mogą być metaloftalocyjaniny zawierające grupy karboksylowe lub sulfonowe oraz mezo-tetrafenylporfiryny.
- II. Hydrofobowe – to grupa fotouczulaczy nie rozpuszczalnych w wodzie i wykazujących powinowactwo do lipidowych błon komórkowych. Ze względu na hydrofobowość pierścienia porfirynowego, większość fotouczulaczy ma taki

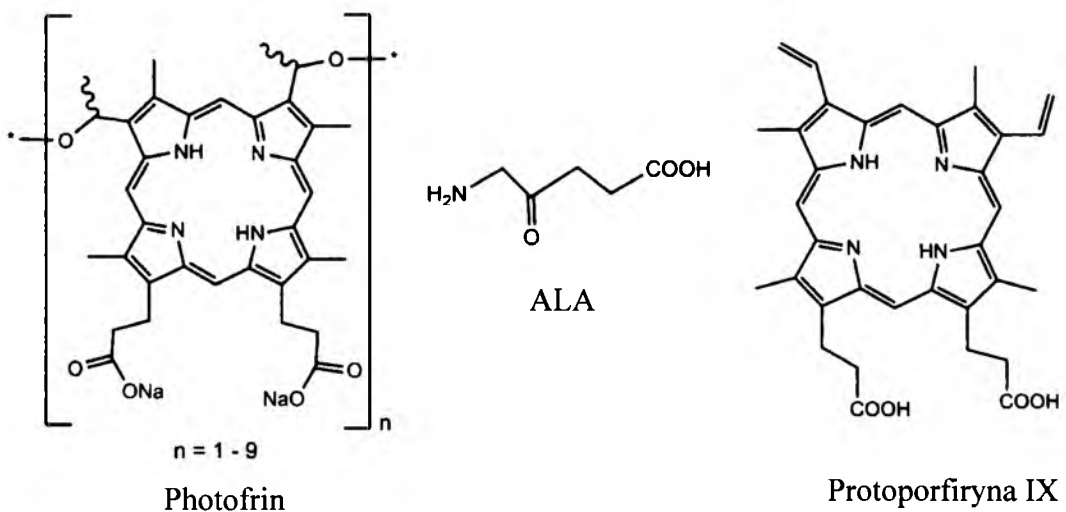
właśnie charakter (np. nienaładowane ftalocyjaniny i naftalocyjaniny). Konieczne jest wówczas zastosowanie odpowiednich hydrofilowych podstawników (grupy OH, COOH, kwas sulfonowy, grupy amonowe) zapewniających amfifilowy balans. Dla fotouczulaczy hydrofobowych konieczne jest stosowanie nośników pozwalających na ich skuteczną biodystrybucję.

III. Amfifilowe – to fotouczulacze posiadające zarówno hydrofilowe jak i hydrofobowe grupy, dzięki czemu mogą oddziaływać z substancjami o różnym charakterze. Przekładem jest fotouczulacz drugiej generacji - Visudyne.

Porfiryny należą do najszerzej przebadanej grupy fotouczulaczy. W praktyce klinicznej wykorzystuje się dwa fotouczulacze porfiryne:

- sól sodowa porfimeru (nazwa handlowa: Photofrin) – to pochodna hematoporfiryny będąca mieszaniną monomerów, dimerów i oligomerów wyższego rzędu połączonych w stosunku 14:19:67 (Nyman, 2004). Photofrin był pierwszym fotouczulaczem zatwierdzonym do użytku klinicznego i zaliczany jest do fotouczulaczy pierwszej generacji. Jego główne ograniczenia to stosunkowo słaba absorpcja w pożądanym zakresie widma, niska kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego oraz uciążliwa dla pacjentów nadwrażliwość na światło słoneczne, utrzymująca się nawet od 4 do 6 tygodni po naświetleniu (Vo-Dinh, 2003), (Macdonald, 2001).
- kwas 5-aminolewulinowy (ALA, nazwa handlowa: Levulan) – zaliczany jest do tzw. proleków (Bonnett, 2000), (Josefsen, 2008), (Allison, 2004). Jego egzogenne podanie prowadzi do nagromadzenia w komórkach prekursora hemu - protoporfiryny IX, odpowiedzialnej za właściwe fotouczulenie tkanek. Istnieją dwa etapy wpływające na szybkość biosyntezy hemu. Pierwszym jest synteza ALA, katalizowana przez syntazę kwasu aminolewulinowego, regulowana na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego przez produkt końcowy biosyntezy - hem. Drugim etapem jest reakcja katalizowana przez ferrochelatazę, polegająca na włączeniu jonu żelaza do cząsteczki protoporfiryny IX, prowadząca do powstania hemu (Piskorz, 2009). Egzogenne podanie ALA umożliwia ominięcie etapu limitującego

jego syntezę. Enzym ferrochelatazy nie może wówczas wydajnie przekształcić zwiększonej ilości protoporfiryny IX w hem, co prowadzi do jej nagromadzenia w komórce. Wśród niewątpliwych zalet ALA wymienia się szybkie wydalanie z organizmu oraz wysoką selektywność. Natomiast do wad zalicza się ból związany z leczeniem, ograniczoną możliwość penetracji guza przez światło wzbudzające protoporfirynę IX oraz indywidualne różnice wśród pacjentów, związane z wchłanianiem i farmakokinetyką ALA (Wachowska, 2011). W terapii fotodynamicznej z powodzeniem wykorzystuje się również estry ALA, np. ester metylowy (Metvix).



Rysunek 5. Budowa chemiczna wybranych fotouczulaczy z grupy porfiryń (Ethirajan, 2011)

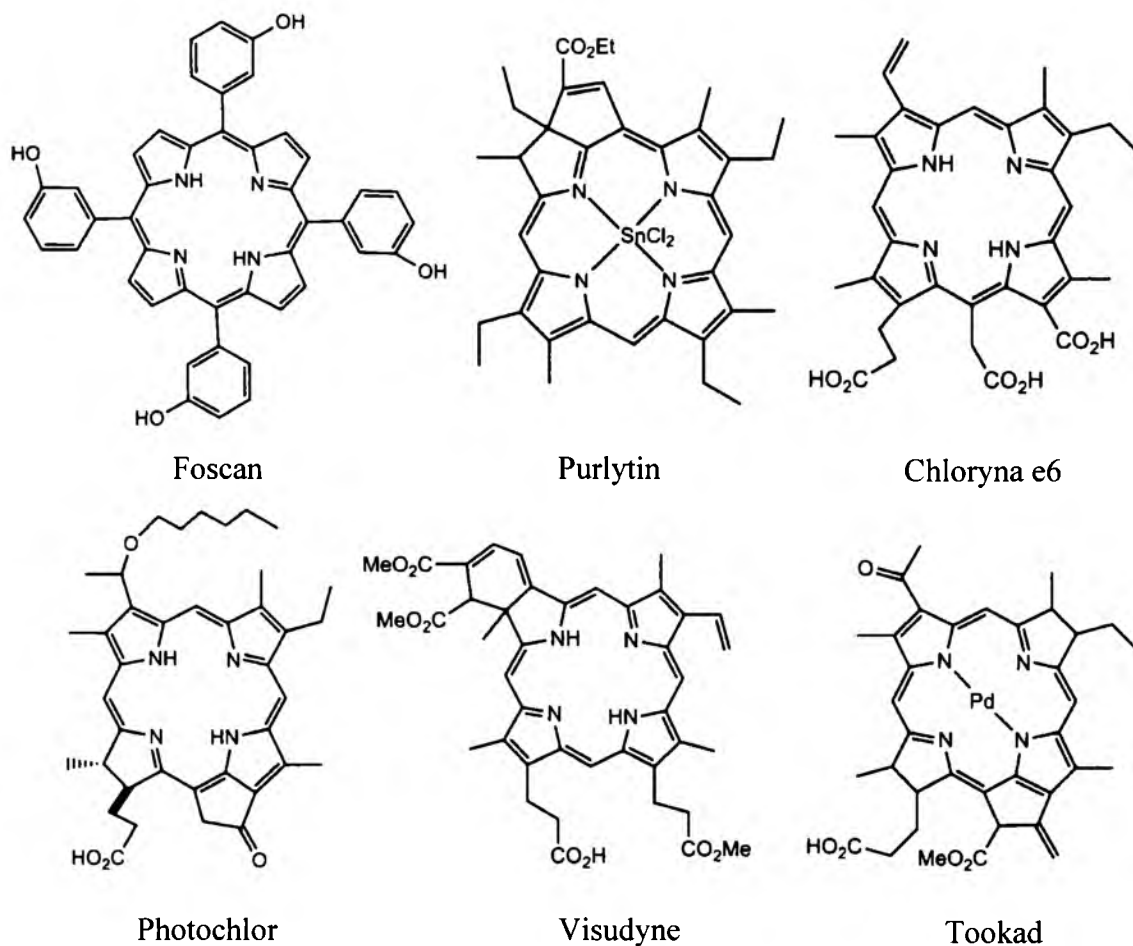
Głównym ograniczeniem fotouczulaczy porfiryńowych jest ich tendencja do agregacji w środowisku wodnym (Hamblin, 2008). Agregacja, to zjawisko zachodzące w roztworze, pomiędzy rozpuszczonymi cząsteczkami w sytuacji, gdy oddziaływania między nimi są korzystniejsze energetycznie od oddziaływań z cząsteczkami rozpuszczalnika. W powstających agregatach, molekuly utrzymywane są razem poprzez słabe oddziaływania międzycząsteczkowe (np. wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne typu $\pi - \pi$, oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe) (Bonnett, 2000). Płaski pierścień porfiryńowy w polarnych rozpuszczalnikach wykazuje tendencję do tworzenia dimerów oraz agregatów wyższego rzędu, utrzymywanych głównie poprzez oddziaływania typu $\pi - \pi$ pierścienia oraz oddziaływania hydrofobowe (Lang, 2004). Zjawisko to niekorzystnie wpływa na

własności fotofizyczne fotouczulaczy, powodując skrócenie czasu życia w stanie trypletowym oraz zmniejszając zdolność do generowania tlenu singletowego. W efekcie fotouczulacze wykazują mniejszą skuteczność terapeutyczną *in vivo* (Macdonald, 2001), (Bonnett, 2000).

Kolejną grupę fotouczulaczy stanowią zredukowane formy porfiryn, do których zaliczamy chloryny i bakteriochloryny. W praktyce klinicznej wykorzystuje się:

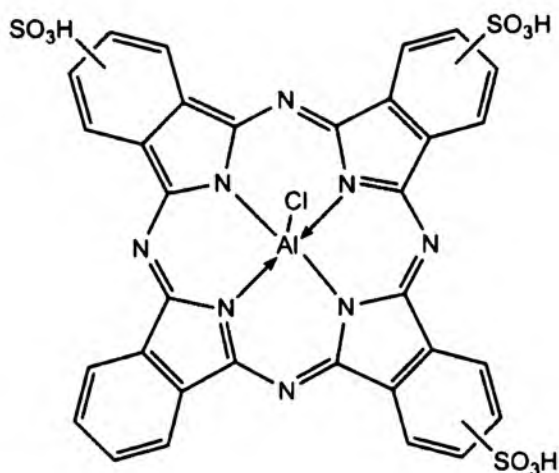
- temoporfine (mTHPC, nazwa handlowa: Foscan) – posiada kwantową wydajność generowania tlenu singletowego podobną do pozostałych fotouczulaczy, natomiast w porównaniu z innymi, działa przy znacznie mniejszych dawkach leku oraz światła. Foscan jest 100 razy bardziej aktywny od Photofrinu, co sprawia, że zalicza się go do najbardziej obiecujących fotouczulaczy drugiej generacji. Jego niewątpliwie słabą stroną jest powolne wydalanie z organizmu, które skutkuje długoterminową nadwrażliwością na światło słoneczne (O'Connor, 2009).
- werteporfine (BPD-MA, nazwa handlowa: Visudyne) – to zmodyfikowana forma protoporfiryny IX o amfifilowym charakterze (Lang, 2004). Znalazła zastosowanie w leczeniu starczego zwyrodnienia plamki żółtej (AMD) będącym główną przyczyną utraty wzroku wśród osób w podeszłym wieku. Jest szybko usuwana z organizmu, co minimalizuje skutki uboczne związane z nadwrażliwością na światło słoneczne (MacCormack, 2006).

Wśród chloryn wiele obiecujących związków znajduje się w trakcie badań klinicznych. Zaliczamy do nich liczne pochodne chloryny e6 (NPe6, LS11, związki znane pod nazwami Fotolon i Radachlorin), etiopurpurynę cyny (SnEt_2 , Purlytin), HPPH (Photochlor). Wśród bakteriochloryn na uwagę zasługuje bakteriofeoforbid palladu, znany pod handlową nazwą Tookad. Wzbudzany długością fali 763 nm jest szybko usuwany z organizmu eliminując problem nadwrażliwości na światło słoneczne (usunięcie z krwiobiegu następuje już po około 20 minutach, fotowrażliwość zanika całkowicie po ok. 1,3 godziny po naświetleniu). Dzięki obecności jonu metalu ciężkiego kwantowa wydajność generowania tlenu jest bardzo wysoka (około 99% w rozpuszczalnikach organicznych) (Yano, 2011), (O'Connor, 2009).



Rysunek 6. Budowa chemiczna wybranych fotouczulaczy - pochodnych chloryn i bakteriochloryn (Bonnett, 2000), (Ethirajan, 2011), (Wainwright, 2009)

Fotouczulaczom z grupy ftalocyjanin i naftalocyjanin poświęca się wiele uwagi ze względu na ich korzystne własności fotofizyczne, takie jak silna absorpcja w długofalowym zakresie widma (jednoczesna ograniczona absorpcja w zakresie 400 - 600 nm) oraz długi czas życia stanu trypletowego i wysoka wydajność generowania tlenu singletowego w obecności centralnie podstawionych jonów metali. Wśród tych fotouczulaczy testom klinicznym poddawane są dwa związki: metaloftalocyjanina Pc4 oraz związek o komercyjnej nazwie Photosens (AlPcS₂). Ze względu na swoje własności ftalocyjaniny i naftalocyjaniny mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu upigmentowanych i głębiej położonych zmian nowotworowych (O'Connor, 2009), (Hamblin, 2008).



Rysunek 7. Budowa chemiczna fotouczulacza Fotosens (Bonnert, 2000)

Oprócz omówionych fotouczulaczy pod kątem użyteczności w PDT bada się wiele innych światłoczułych związków, zdolnych do generowania tlenu singletowego. Należą do nich zmodyfikowane porfiryny - teksafiryny i safiryny oraz izomery porfiryn - porficyny (Král, 2006), (Mroz, 2010). Badania dotyczą również związków nie posiadających budowy tetrapirolowej. Przykładem mogą być związki pochodzenia naturalnego - hipericin lub pochodne hyperoceliny, a wśród związków syntetycznych m. in. czerwień bengalska lub błękit toluidynowy (Hamblin, 2004). Wiele doniesień dotyczy prób zastosowania fulerenów, których wykorzystanie w terapii fotodynamicznej wydaje się niezwykle interesujące, choć wymaga pokonania trudności wynikających z ich braku rozpuszczalności w wodzie i płynach wewnątrzkomórkowych oraz braku absorpcji w długofalowym zakresie widma (Mroz, 2010).

7. Fotostabilność fotouczulaczy

Większość fotouczulaczy wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej pod wpływem światła ulega degradacji (Hongying, 1999), (Rotomskis, 1997), (Bonnett, 2001), (Das, 2005). Proces ten nazwano fotowybieniem (ang. *photobleaching*). W fotochemii i fotobiologii termin ten oznacza zmniejszenie intensywności pasm absorpcji i/lub emisji spowodowane naświetleniem. Pod wpływem światła dochodzi wówczas do nieodwracalnych zmian w strukturze chemicznej związków, obejmujących nawet całkowite zniszczenie chromoforu (Bonnett, 2000). Fotouczulacze podczas naświetlania mogą ulegać następującym procesom:

- fotomodyfikacji – jest to proces związany z modyfikacją struktury chemicznej cząsteczek prowadzącą do zmian intensywności niektórych pasm absorpcji lub fluorescencji,
- fotowybienia – wówczas zmiany chemiczne obejmują rozpad cząsteczki na fragmenty, które nie absorbują promieniowania z zakresu widzialnego. Tego typu zmiany są obserwowane jako utrata barwy naświetlanego roztworu (Bonnett, 2000), (Bonnett, 2001).

Zazwyczaj zjawiska fotomodyfikacji i fotowybienia zachodzą jednocześnie i mogą obejmować:

- reakcje fotoaddycji i fotocyklizacji, których efektem może być zniszczenie chromoforu,
- reakcje transferu elektronu prowadzące do powstawania szerokich pasm absorpcji przesuniętych w kierunku czerwonego zakresu widma (zwykle odwracalne),
- reakcje fotoredukcji obejmujące nieodwracalne procesy zachodzące w obecności czynników redukujących.

Większość przypadków fotowybienia w PDT ma charakter oksydacyjny i związanych jest z obecnością tlenu lub jego reaktywnych form. Wykazano, że w warunkach beztlenowych proces fotodegradacji fotouczulaczy zachodzi znacznie wolniej (Hongying, 1999), (Bonnett, 2001). Ponadto, istnieje zależność pomiędzy szybkością procesu fotowybienia, a wartościami potencjału redoks. Proces fotowybienia zachodzi szybciej dla związków charakteryzujących się niższą wartością potencjału

utleniającego. Tłumaczy to dlaczego fotouczulacze zawierające wewnątrz pierścienia metale (np. Mg^{2+} , Zn^{2+}), obniżające potencjał utleniający, są stosunkowo mniej odporne na działanie światła. Wykazano również zależność pomiędzy szybkością procesu fotowybielenia, a zjawiskiem agregacji. Okazuje się, że reakcje fotowybielenia dotyczą głównie monomerów, natomiast fotomodifikacja występuje w formach zagregowanych. Dodatkowo, wpływ na szybkość procesu fotowybielenia ma rodzaj wykorzystywanego rozpuszczalnika (Bonnett, 2000).

Pierwsze obserwacje fotowybielenia *in vitro* wykonali Moan i in. w 1986. Od tamtej pory intensywnie bada się kinetykę oraz mechanizmy zachodzących reakcji fotochemicznych oraz podejmuje się próby identyfikacji powstających fotoproduktów. Najwięcej informacji wyjaśniających mechanizmy reakcji fotochemicznych zachodzących pod wpływem światła dotyczy fotouczulaczy z grupy porfiryn. Rotomskis i in. pokazali, że w wyniku naświetlenia wodnego roztworu hematoporfiryny dochodzi do powstania trzech rodzajów fotoproduktów:

1. powstałych w wyniku fotomodifikacji w obrębie pierścienia makrocyklicznego dipirolu i monopirolu absorbujących w zakresie UV (240 nm – 320 nm),
2. bilirubiny, powstałej w efekcie zerwania pierścienia porfiryнового,
3. chloryny i bakteriochloryny (Rotomskis, 1997).

Badaniu fotodegradacji fotouczulaczy z grupy chloryn poświęcono również wiele uwagi. Skupiano się przede wszystkim na badaniu kinetyki procesu fotowybielenia oraz roli tlenu w tym procesie. Rotomskis i in. badali procesy fotowybielenia fotouczulaczy z różnych grup (m. in. porfiryn, chloryn, ftalocyjanin). Spośród badanych fotouczulaczy chloryna e6 okazała się najbardziej podatna na fotodegradację. Możliwą przyczynę słabej fotostabilności autor przypisał działaniu tlenu na grupy zawierające wiązania podwójne między atomami węgla (m.in. grupy winylowe oraz wiązania podwójne w pierścieniu pirolowym) (Rotomskis, 1997). Również Hajdur i in. badali zmiany w widmie absorpcji m-THPC po naświetleniu. Zaobserwowali zmiany intensywności wszystkich pasm widocznych na widmie absorpcji oraz pojawienie się dodatkowego pasma przy 320 nm, które przypisali powstaniu fotoproduktu. Produkt ten nie został zidentyfikowany, natomiast za przyczynę jego powstania uznano właśnie tlen singletowy, generowany podczas naświetlenia (Hadjur, 1998).

Pomimo szerokiego zainteresowania problemem fotostabilności fotouczulaczy z grupy chloryn, wciąż niewiele jest informacji na temat natury powstających fotoproduktów. Próbę identyfikacji fotoproduktów powstałych po naświetleniu m-THPC podjęli Jones i in. W swoich badaniach zaobserwowali, że pod wpływem światła dochodzi głównie do hydroksylacji zredukowanego pierścienia porfiryнового. Zidentyfikowano pięć głównych fotoproduktów, a wśród nich dwie porfiryny oraz trzy izomery chlorynowe różniące się pozycją grupy hydroksylowej (Jones, 1996). Powstanie takich izomerów potwierdzili w swych badaniach Bonnett i in. Dodatkowo identyfikując inne produkty rozpadu m.in. pomarańczowe związki uznane za pochodne dipiryn oraz niewielkie ilości bezbarwnych produktów fragmentacji (Bonnett, 2002).

8. Wnikanie i biodystrybucja fotouczulaczy

Wnikanie i biodystrybucja fotouczulaczy we wnętrzu komórek, zależy od ich własności fizykochemicznych (ładunku, hydrofobowości/hydrofilowości, tendencji do agregacji) oraz struktury chemicznej (typu, liczby i ułożenia podstawników, ilości pierścieni, obecności centralnego atomu) (Sobolev, 2000), (Osterloh, 2002), (Lukšienė, 2003), (Robertson, 2009). *In vitro* fotouczulacze mogą wnikać do wnętrza komórek w różny sposób - poprzez dyfuzję, niespecyficzną endocytozę lub mniej efektywną pinocytozę. Duże agregaty wnikają na drodze fagocytozy. *In vivo* sytuacja jest bardziej skomplikowana. Po aplikacji fotouczulacz może gromadzić się zarówno w zdrowych, jak i w nowotworowych komórkach (Sobolev, 2000). Mechanizmy związane z selektywnym gromadzeniem fotouczulaczy w komórkach nowotworowych nie zostały do końca wyjaśnione. Przyjmowane hipotezy zakładają, że za selektywną dystrybucję fotouczulaczy odpowiadają pewne własności komórek tworzących guz nowotworowy, m. in. zwiększona liczba receptorów dla lipoprotein niskiej gęstości (LDL), obecność makrofagów i niższa wartość pH. Również specyficzna budowa guza nowotworowego posiadającego obszerne przestrzenie śródmiąższowe, nieszczelny układ naczyński, naruszony drenaż limfatyczny, dużą ilość nowo zsyntetyzowanego kolagenu (który wiąże porfiryny), może wpływać na wybiórcze gromadzenie fotouczulaczy w przestrzeni guza (Dougherty, 1998), (Castano, 2005), (Osterloh, 2002). Fotouczulacze krążąc we krwi wchodzi w reakcję z białkami osocza, głównie lipoproteinami i albuminami (Sobolev, 2000). Udowodniono, że fotouczulacze przyłączone do LDL lepiej lokalizują się w guzie, wnikając do jego wnętrza na drodze specyficznej endocytozy. Związane jest to ze zwiększoną liczbą receptorów dla LDL

(receptor apoB/E) na powierzchni komórek nowotworowych, co wynika z ich dużego zapotrzebowania na cholesterol, wykorzystywany do budowy błon komórkowych (Maiya, 2000), (Castano, 2005), (Hamblin, 2008).

Aby zwiększyć selektywność wnikania fotouczulaczy do komórek guza, a tym samym zwiększyć skuteczność terapeutyczną i ograniczyć efekty uboczne, wykorzystuje się następujące strategie:

- zastosowanie przeciwciał monoklonalnych rozpoznających nowotworowe antygeny (Dongen, 2004), (Bullous, 2011),
- kowalentne połączenie fotouczulaczy z białkami wychwytywanymi preferencyjnie przez komórki nowotworowe (np. transferyną, lipoproteinami) (Hamblin, 2008), (Bugaj, 2011),
- kowalentne przyłączenie fotouczulaczy z ligandem dla receptorów zmiataczy (np. metylowane BSA) obecnych na powierzchni makrofagów związanych z nowotworem (Hamblin, 2000), (Liu, 2005), (Demidova, 2004),
- kowalentne połączenie fotouczulaczy z mniejszymi cząsteczkami, takimi jak czynniki wzrostu (np. VEGF), hormony, witaminy (np. kwas foliowy) czy cukry, które są szczególnie wychwytywane przez komórki guza (Hamblin, 2008), (Sharman, 2004), (Solban, 2006),
- wykorzystanie polimerów do produkcji nośników (np. polimery PEG, PLA, PLGA) (Bugaj, 2011), (Verma, 2007),
- wykorzystanie nanonośników (Paszko, 2011), (Li, 2009), (Chatterjee, 2008), (Bechet, 2008), (Wang, 2004),
- transport za pośrednictwem liposomów, miceli, emulsji liposomowych (Chen, 2005), (Derycke, 2004),
- połączenie fotouczulaczy z aptamerami tj. krótkim oligonukleotydami DNA lub RNA, które zapewniają niezwykle wysoką specyficzność wiązania do określonych typów cząsteczek (Bugaj, 2011), (Shieh, 2010).

9. Mechanizmy śmierci komórek podczas terapii fotodynamicznej

Śmierć komórek nowotworowych podczas terapii fotodynamicznej jest procesem złożonym i obejmuje:

- I. bezpośrednio niszczenie komórek nowotworowych,
- II. niszczenie naczyń krwionośnych, odżywiających guza,
- III. indukcję stanu zapalnego i odpowiedź układu immunologicznego (Nowis, 2005).

To, który mechanizm zostanie aktywowany zależy od wielu czynników, m.in. stężenia i własności fizykochemicznych fotouczulacza, miejsca jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji, ilości tlenu oraz zastosowanej dawki światła, a także rodzaju komórek (Castano, 2005), (Robertson, 2009). Generalnie potwierdza się zasada, że fotouczulacze gromadzące się w mitochondriach lub siateczce śródplazmatycznej powodują apoptozę, natomiast te gromadzące się w błonach plazmatycznych i lizosomach nekrozę (Firczuk, 2011), (Buytaert, 2007), (Chiaviello, 2011). Aczkolwiek, w przypadku większości fotouczulaczy możliwe jest wywołanie nekrozy poprzez zwiększenie dawki światła lub stężenia fotouczulacza (Buytaert, 2007).

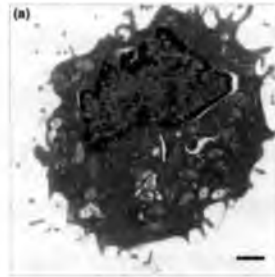
- I. **Bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych** może odbywać się na drodze nekrozy, apoptozy lub autofagii (Chwiłkowska, 2011), (Agostinis, 2011), (Chiaviello, 2011). Nekroza to proces patologicznej i przypadkowej śmierci komórki, charakteryzujący się pęcznieniem cytoplazmy, rozpadem organelli i błon wewnątrzkomórkowych prowadzącym do wydostania się zawartości komórek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (tzw. lizą komórek) (Castano, 2005). *In vivo*, rozpadowi komórki towarzyszy silna reakcja zapalna. Nekroza może być wywołana poważnym uszkodzeniem komórki przez chemiczne i fizyczne czynniki zewnętrzne, np. niedotlenieniem (Dworakowska, 2005). Apoptoza jest naturalnym procesem fizjologicznym, genetycznie uwarunkowanym, umożliwiającym usunięcie zbędnych i nieprawidłowych komórek (Bednarek, 2005). Towarzyszą jej morfologiczne i biochemiczne zmiany prowadzące do proteolitycznej i nukleolitycznej degradacji składników komórki. Cechą charakterystyczną tego procesu jest agregacja chromatyny, obkurczanie i zagęszczanie cytoplazmy oraz powstawanie ciałek apoptotycznych (Chwiłkowska, 2011). Istnieje wiele szlaków

apoptozy, nazywanej też programowaną śmiercią komórki. Dwa najlepiej poznane to szlak zewnętrzny (receptorowy), związany z błoną komórkową oraz wewnętrzny, przebiegający z udziałem mitochondriów (Stępień, 2007):

- wewnętrzny szlak – rozpoczyna się z chwilą uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy szeregu czynników białkowych, m.in. cytochromu c oraz innych białek proapoptotycznych, np. białka Smac/Diablo oraz czynnika indukującego apoptozę, AIF. Proces ten może być wywołany wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu, wzrostem ilości wapnia w cytoplazmie, zmianą wewnętrznego potencjału błonowego powodującą otwarcie megakanałów mitochondrialnych. Cytochrom c wraz z białkami cytoplazmatycznymi (np. białkiem Apaf-1, prokaspazą-9) tworzy apoptosom. Dalszym etapem jest aktywacja kolejnych kaspaz, enzymów z grupy proteaz, z których najważniejsza jest kaspaza-3, co prowadzi do ostatniego etapu apoptozy, tj. kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA.
- zewnętrzny szlak – nazywany jest szlakiem receptorów śmierci. Te błonowe receptory po przyłączeniu odpowiednich białek cytoplazmatycznych tworzą kompleks sygnałowy DISC, nazywany też degradosomem, aktywujący kaspazę-8. Późniejsza aktywacja kolejnych kaspaz prowadzi do planowanego procesu degradacji składników komórki (Hamblin, 2008), (Grądzka, 2006), (Almeida, 2004).

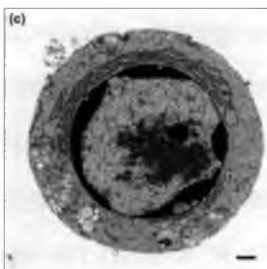
Do programowanych mechanizmów śmierci komórki zalicza się również autofagię, choć proces ten jest raczej wykorzystywany przez komórki w celu przeżycia i jego rola w PDT wciąż jest wyjaśniana. Autofagia występuje w przypadku narażenia komórki na stres, przy braku czynników odżywczych lub przy niedotlenieniu (Kopij, 2008). Dochodzi wówczas do przemodelowania struktury i powstania pęcherzyków zwanych autofagosomami, które zawierają uszkodzone organella (Grądzka, 2006). Zawartość pęcherzyków jest trawiona przez enzymy lizosomowe, co pozwala na pozyskanie substratów życiowych. Wydaje się, że w terapii fotodynamicznej proces ten ma na celu przede wszystkim ochronę i naprawę uszkodzonych organelli, a dopiero gdy to się nie powiedzie, prowadzi on do śmierci komórki (Buytaert, 2007), (Firczuk, 2011), (Hamblin, 2008).

ŻYWA KOMÓRKA



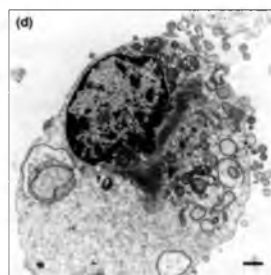
APOPTOZA

- kurczenie się komórki
- tworzenie pęcherzyków (ang. *blebbing*).
- zachowanie integralności błony we wczesnych etapach
- kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA
- fragmentacja jądra
- wiązanie fragmentów komórki przez skondensowaną błonę
- depolaryzacja cytoszkieletu



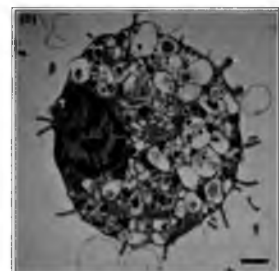
NEKROZA

- obrzęk komórek
- utrata integralności błony
- puchnięcie organelli
- brak fragmentacji DNA



AUTOFAGIA

- brak zmian w rozmiarze komórek
- wzrost liczby autofagosomów otoczonych podwójną błoną.
- degradacja aparatu Golgiego, polirybosomów, siateczki śródplazmatycznej
- częściowa kondensacja chromatyny
- brak fragmentacji DNA



Rysunek 8. Różnice i podobieństwa w morfologii komórek uległych śmierci na drodze trzech podstawowych mechanizmów. Na schemat naniesiono zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające komórki zdrowe (a) oraz komórki podczas autofagii (b), apoptozy (c) i nekrozy (d). Skala naniesiona na zdjęcia odpowiada 1 μm (Henriquez, 2008), (Edinger, 2004).

- II. **Destrukcja naczyń** występująca po PDT jest ważnym czynnikiem biorącym udział w niszczeniu tkanki nowotworowej. Podczas terapii fotodynamicznej zaobserwowano zapadanie się naczyń, mogące prowadzić do silnego i utrzymującego się również po terapii, niedotlenienia guza (Castano, 2005). Wykazano, że powstawanie skrzeplin w naczyniach krwionośnych oraz niszczenie mikronaczyń, uniemożliwia zaopatrywanie komórek nowotworowych w tlen i substancje odżywcze, co prowadzi do ich obumierania (Graczykova, 1999). Efekty naczyniowe towarzyszące PDT silnie zależą od rodzaju fotouczulacza. Dla różnych związków zaobserwowano, m.in.: zwężanie naczyń krwionośnych, wzrost ich przepuszczalności, zahamowanie przepływu krwi w naczyniach, przyleganie leukocytów do ścian naczynia oraz formowanie się zakrzepów, co prowadzi do aktywacji płytek krwi i uwolnienia tromboksanu (Castano, 2005), (Nowis, 2003). Z drugiej strony zauważono, że wywołana zwężeniem naczyń hipoksja może powodować nadekspresję czynnika transkrypcyjnego (HIF)-1, który reguluje ekspresję genów, m.in. związanych z procesem angiogenezy i którego podwyższony poziom, wiąże się ze słabą odpowiedzią komórek na stosowaną terapię fotodynamiczną (Robertson, 2009). Przeprowadzone badania wskazują, że destrukcja naczyń występująca po PDT, jest potrzebna do wytworzenia reakcji zapalnej, obserwowanej po naświetleniu (Graczykova, 1999).
- III. **Powstanie silnej reakcji zapalnej i odpowiedź układu immunologicznego** jest ważnym elementem niszczenia guza nowotworowego podczas terapii fotodynamicznej. Pod wpływem PDT dochodzi do uwolnienia szeregu mediatorów stanu zapalnego, takich jak: substancje wazoaktywne, elementy układu dopełniacza, cytokiny (IL-1 β , IL-2, czynnik martwicy nowotworów TNF- α), czynniki wzrostu i inne immunoregulatory. Coraz więcej dowodów wskazuje, że całkowite zniszczenie guza wymaga udziału układu odpornościowego. Inwazja neutrofilii, komórek tucznych, makrofagów/monocytów w trakcie i po naświetleniu, została udokumentowana w badaniach na mysich modelach guza (Canti, 2002). Wywołana PDT reakcja immunologiczna może mieć duże znaczenie w osiągnięciu długoterminowej kontroli nad guzem (Kawczyk-Krupka, 2010), (Korbelik, 1999), (Canti, 2002), ponieważ obejmuje mechanizmy zarówno nieswoistej, jak i swoistej odpowiedzi układu immunologicznego. Rolę łącznika pełnią komórki dendrytyczne (Nowis, 2005). Odpowiedź nieswoista stanowi pierwszą linię obrony

przed patogenami. W pierwszym etapie musi dojść do rozpoznania przez leukocyty charakterystycznych dla patogenów wzorców molekularnych związanych ze śmiercią komórki (CDAM) oraz jej uszkodzeniem (DAMP), np. białek szoku cieplnego. Pobudzone leukocyty produkują czynniki wazoaktywne, zwiększające przepuszczalność naczyń, pozwalające na wysięk prozapalnych mediatorów w miejscu uszkodzenia. Aktywacja alternatywnego szlaku dopełniacza prowadzi do generowania silnych czynników chemotaktycznych, indukcji kaskady sygnałów i czynników transkrypcyjnych, powodujących wydzielanie cytokin, metaloprotein i cząsteczek adhezyjnych (Firczuk, 2011). Późniejsza działalność związana jest z indukcją odpowiedzi swoistej, odbywa się w węzłach chłonnych i obejmuje prezentację antygenów przez komórki dendrytyczne antygenowo specyficznym limfocytom T (CD4+ i CD8+). Aktywowane limfocyty T poprzez naczynia limfatyczne, mogą później przenikać w miejsca guza, powodując jego bezpośrednie zniszczenie lub pobudzać inne komórki układu odpornościowego (makrofagi i komórki NK) do szybkiego i skutecznego niszczenia komórek nowotworowych (Nowis, 2005). Immunostymulujący i prozapalny efekt terapii fotodynamicznej jest niezwykle obiecujący i intensywnie badany, szczególnie biorąc pod uwagę, że zarówno chemio- jak i radioterapia powodują upośledzenie funkcji układu immunologicznego (Kawczyk-Krupka, 2010).

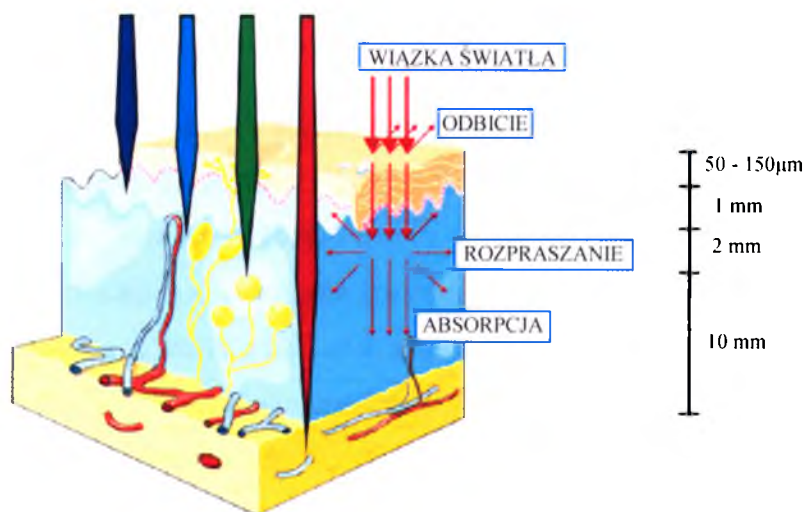
10. Białko p53 i jego rola w procesie apoptozy

Śmierć komórek może być indukowana przez różne bodźce fizjologiczne i patologiczne, zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i pochodzenia wewnątrzkomórkowego, w tym uszkodzenie DNA (Kaźmierczuk, 2010). Również nieprawidłowości w przebiegu cyklu komórkowego mogą prowadzić do jego zatrzymania i uruchomienia mechanizmu apoptozy. Ze szlakiem tym powiązane jest białko p53 określone mianem „strażnika genomu” (Chen, 2009). Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym rolę w odpowiedzi komórek na bodźce wywołujące uszkodzenie DNA. W prawidłowych komórkach występuje w postaci nieaktywnej i dopiero pod wpływem uszkadzających DNA czynników dochodzi do jego aktywacji. Białko p53 jest zaangażowane w regulację wielu procesów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, których celem jest utrzymanie stabilności genetycznej komórki. Do najważniejszych możemy zaliczyć starzenie komórki, przechodzenie przez kolejne punkty kontrolne cyklu komórkowego, naprawa DNA oraz indukcja apoptozy

(Vousden, 2002), (Sznarkowska, 2010), (Zawacka-Pankau, 2008). W większości nowotworów ludzkich białko p53 występuje w postaci nieaktywnej. Ponieważ ma własności supresora nowotworowego, jego obecność w komórkach nowotworowych jest niepożądana. Dlatego komórki nowotworowe wykształciły różne mechanizmy prowadzące do dezaktywacji białka p53, która jest warunkiem koniecznym do progresji nowotworowej. Mechanizmy te obejmują zarówno mutacje w obrębie genu kodującego białko p53, jak również mutacje dotyczące czynników regulujących aktywność białka p53 (Vousden, 2002), (Zawacka-Pankau, 2008).

11. Rola światła w terapii fotodynamicznej

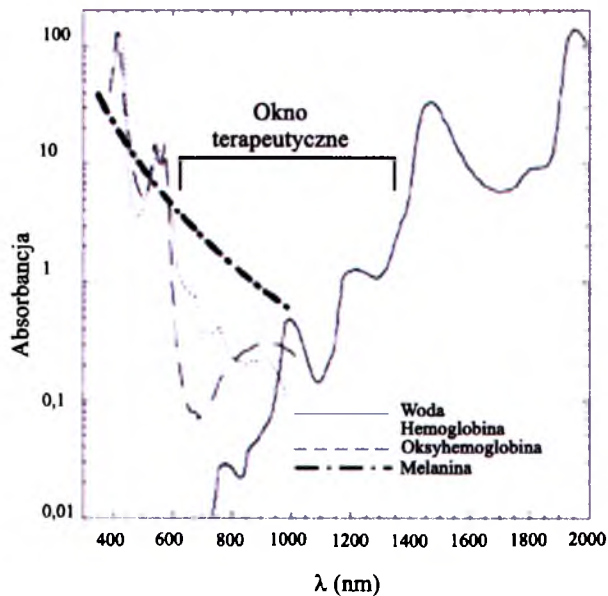
Światło, czyli promieniowanie elektromagnetyczne o długościach fal z zakresu widzialnego (VIS), nadfioletu (UV) i bliskiej podczerwieni (NIR), pełni kluczową rolę w terapii fotodynamicznej. Aby zainicjować procesy fotofizyczne i fotochemiczne towarzyszące PDT, musi dojść do wzbudzenia cząsteczek fotouczulacza. Promieniowanie wzbudzające przechodząc przez tkankę, która jest ośrodkiem silnie anizotropowym strukturalnie i biochemicznie, ulega częściowej absorpcji, rozproszeniu, odbiciu oraz załamaniu (Podbielska, 2004).



Rysunek 9. Propagacja światła w tkankach (Agostinis, 2011)

Najważniejszymi chromoforami w tkance są woda, oksyhemoglobina i deoksyhemoglobina, melanina oraz cytochromy. Widma absorpcyjne tych cząsteczek definiują tzw. okno terapeutyczne tkanki (Plaetzer, 2009), tj. obszar między

600 nm a 1200 nm, w którym wiązka promieniowania nie jest osłabiana przez barwniki endogenne oraz wodę. W praktyce, najczęściej stosuje się światło o długości fali do ok. 800 nm (Agostinis, 2011) posiadające odpowiednią energię do pobudzenia fotouczulacza i zainicjowania reakcji fotochemicznych towarzyszących PDT (Zhu, 2008). Głębokość wnikania światła zależy od typu tkanki oraz długości fali promieniowania. Promieniowanie o długości 630 nm wnika do tkanki mózgowej na głębokość 800 μm , natomiast w pęcherzu moczowym na głębokość 4 mm. Wykazano również, że promieniowanie z zakresu od 600 nm do 700 nm wnika do tkanek 50% do 200% efektywniej niż promieniowanie z zakresu od 400 nm do 500 nm (Brancaleon, 2002).



Rysunek 10. Widma absorpcji najważniejszych barwników endogennych oraz wody warunkujące położenie tzw. okna terapeutycznego tkanek (600 nm - 1200 nm)

Odpowiedni dobór fotouczulacza, źródła światła oraz parametrów naświetlania jest istotny dla zapewnienia powodzenia terapii fotodynamicznej. Nie istnieje uniwersalne źródło światła idealne do wszystkich rodzajów zastosowań (Agostinis, 2011). Jego wybór zależy przede wszystkim od własności absorpcyjnych fotouczulacza i rodzaju naświetlanej zmiany (jej lokalizacji, wielkości, dostępności). Pod uwagę brane są także praktyczne aspekty związane z kosztami, funkcjonalnością i wygodą użytkowania. W PDT stosuje się trzy typy źródeł światła:

- lasery,
- diody elektroluminescencyjne (LED),

– lampy z filtrami optycznymi (Wilson, 2008).

Źródłem światła wykorzystywanym najczęściej są lasery, które dzięki specyficznym własnościom generowanego promieniowania, m.in. wysokiej monochromatyczności, spójności, dużej gęstości spektralnej mocy, pozwalają na precyzyjne formowanie wiązki i dostarczanie jej do miejsca docelowego za pośrednictwem światłowodów (Podbielska, 2004). W terapii fotodynamicznej wykorzystuje się przede wszystkim lasery barwnikowe wzbudzone laserem argonowym lub laserami na parach metali, lasery na ciele stałym (np. Nd:YAG), lasery półprzewodnikowe (diodowe), cieszące się obecnie największym zainteresowaniem (Brancaleon, 2002). Tańszą alternatywą dla laserów mogą być diody elektroluminescencyjne (LED), generujące światło o odpowiedniej energii i wybranej długości fali. Są one wygodne w użytkowaniu, ponieważ dają możliwość łączenia w układy o różnych wielkościach i geometriach (Pervaiz, 2006). Pierwszymi źródłami światła stosowanymi w PDT były niekoherentne źródła światła tj. lampy halogenowe, łukowe lampy ksenonowe oraz lampy fluorescencyjne. Takie źródła światła mogą być używane w połączeniu z filtrami optycznymi różnego typu (Brancaleon, 2002).

Również rozwój technologii światłowodowej odegrał istotną rolę w PDT, pozwalając na skuteczne dostarczenie światła do miejsca docelowego i jego jednorodną dystrybucję. Do powierzchniowego naświetlania światłowodów wyposaża się w soczewkę pozwalającą na rozprzestrzenienie światła na docelowym obszarze (Triesscheijn, 2006), (Stewart, 1998). Światłowodów może być też zakończony balonem mocująco-centrującym zapewniającym równomierne oświetlenie. Naświetlenie może odbywać się śródmiaższowo, przy pomocy dyfuzorów stożkowych lub z odległości, wykorzystując na przykład dyfuzory cylindryczne. Obecnie, aby poprawić skuteczność terapii fotodynamicznej prowadzi się intensywne prace związane ze standaryzacją i optymalizacją procedury terapeutycznej, skupiając się szczególnie na opracowaniu wskazań dozymetrycznych dotyczących, m.in. dawek promieniowania dla poszczególnych jednostek chorobowych (Zieleźnik, 1999).

12. Znaczenie tlenu w terapii fotodynamicznej

Jednym z warunków skutecznej terapii fotodynamicznej jest obecność tlenu cząsteczkowego w tkance podczas naświetlania (Huang, 2008). Związane jest to z faktem, że tlen molekularny jest substratem reakcji fotochemicznych towarzyszących

PDT, prowadzących do powstania tlenu singletowego oraz innych reaktywnych form tlenu. Wykazano, że przy braku tlenu, niedotlenione komórki guza litego są zwykle odporne na terapeutyczne działanie PDT (Huang, 2008), (Chen, 2002). Podobny problem oporności na leczenie wśród komórek z obniżonym parcjalnym ciśnieniem tlenu, obserwuje się w radioterapii (Hamblin, 2008), (Stewart, 1998), (Gasińska, 2010). Zawartość tlenu w większości tkanek wynosi 5% (Hamblin, 2008). Badania *in vitro* z wykorzystaniem Photofrinu pokazały, że 5% stężenie tlenu jest wystarczające do zaobserwowania pełnego efektu fotodynamicznego, natomiast efekt połówkowy osiągany jest przy stężeniu z zakresu od 0,5% do 1% (Stewart, 1998), (Henderson, 1987). Wieloletnie badania kliniczne potwierdziły, że ponad połowa zaawansowanych litych guzów nowotworowych, posiada obszary hipoksji (ciśnienie parcjalne tlenu $pO_2 \leq 2,5$ mmHg) i/lub anoksji (braku tlenu) niejednorodnie rozłożone w masie guza (Vaupel, 2007). Hipoksja w PDT może więc wynikać z fizjologicznych właściwości komórek nowotworowych lub może być wynikiem lokalnego wyczerpania tlenu podczas reakcji fotochemicznych związanych z PDT. Dotyczy to szczególnie przypadków stosowania wysokich stężeń fotouczulacza i dużych gęstości mocy promieniowania. Potwierdzono, że wykorzystywanie gęstości mocy promieniowania rzędu 50 mW/cm^2 do 200 mW/cm^2 bardzo szybko prowadzi do wyczerpania tlenu, co skutkuje obniżeniem efektywności terapii fotodynamicznej (Stewart, 1998). Obecnie stosuje się kilka technik zapobiegających szybkiemu wyczerpaniu tlenu w trakcie PDT. Zaliczamy do nich frakcjonowane naświetlanie oraz stosowanie umiarkowanych gęstości mocy (rzędu 30 mW/cm^2) pozwalających na zniszczenie guza, jeszcze zanim pojawi się efekt naczyniowy i wyczerpią się zapasy tlenu (Hamblin, 2008). Mimo pewnych zalet, techniki te posiadają również słabe strony, m.in. znacząco wydłużają czas potrzebny na dostarczenie w miejsce docelowe wymaganej dawki światła (Huang, 2008), (Chen, 2002).

13. Kliniczne zastosowania terapii fotodynamicznej

Od 1978 roku, kiedy to Thomas Dougherty przedstawił pierwsze wyniki badań, liczba doniesień na temat efektów zastosowania PDT w leczeniu różnych jednostek chorobowych stale się powiększa. Zastosowanie terapii fotodynamicznej przy użyciu Photofrinu, kwasu aminolewulinowego (ALA) i jego pochodnych zostało dokładnie zbadane pod kątem leczenia zmian przednowotworowych i nowotworowych skóry. PDT jest obecnie zatwierdzone w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Unii Europejskiej

(UE) do leczenia rogowacenia słonecznego (AK) i zatwierdzone w UE i Kanadzie do leczenia raka podstawnokomórkowego skóry (BCC). PDT wykazuje skuteczność w leczeniu raka kolczystokomórkowego skóry (SCC) *in situ* (choroby Bowena) i jest również używany z pewnym powodzeniem w leczeniu pozasutkowej choroby Pageta. Jednak wyniki PDT dla SCC były niezadawalające, z wskaźnikiem nawrotów większym niż 50% (Agostinis, 2011).

Termin nowotwory głowy i szyi odnosi się do różnych nowotworów złośliwych, które rozwijają się w jamie ustnej, gardle, jamie nosowej i krtani. W 2001 roku w Europie zatwierdzono zastosowanie fotouczulacza Foscan do paliatywnego leczenia pacjentów z zaawansowanymi nowotworami głowy i szyi, którzy wyczerпали inne możliwości leczenia (Huang, 2005). Ogólnie na całym świecie przebadano ponad 500 pacjentów z wczesnymi nowotworami jamy ustnej, gardła, krtani osiągając podobne efekty terapeutyczne. Stosując Photofrin 450 pacjentów zostało całkowicie wyleczonych (~89%), nieco ponad 50 częściowo (~10%) oraz w dwóch przypadkach nie uzyskano żadnej odpowiedzi (Agostinis, 2011), (Hamblin, 2008). Podobne efekty uzyskano wykorzystując fotouczulacz Foscan. W przypadkach nowotworów we wczesnym stadium ~85% pacjentów zostało całkowicie wyleczonych, ~17% częściowo i nie odnotowano przypadku braku odpowiedzi na zastosowane leczenie (Hopper, 2004). Wśród 128 pacjentów z zaawansowanymi nowotworami głowy i szyi, którzy nie zakwalifikowali się do konwencjonalnego leczenia, terapia fotodynamiczna z zastosowaniem fotouczulacza Foscan spowodowała 100% zmniejszenie masy guza w 43% przypadkach, a wśród reszty pacjentów odnotowano zmniejszenie masy guza przynajmniej o połowę. Dodatkowo dla 53% pacjentów zaobserwowano znaczący wzrost jakości życia (D'Cruz, 2004). Prowadzone badania kliniczne wyraźnie sugerują, że PDT może być skutecznym podstawowym i alternatywnym sposobem leczenia pacjentów z niezaawansowanymi nowotworami głowy i szyi (Bredell, 2010). Dodatkowo odgrywa istotną rolę w leczeniu paliatywnym oraz jako uzupełniająca terapia śródoperacyjna w przypadku guzów zaawansowanych klinicznie (Sieroń, 2008).

W gastroenterologii endoskopowo dostępne zmiany przednowotworowe i złośliwe zmiany nowotworowe zlokalizowane w przełyku, żołądku, drogach żółciowych lub jelicie grubym, charakteryzujące się wysokim ryzykiem operacyjnym, stały się odpowiednim celem PDT. Terapia fotodynamiczna wykorzystująca Photofrin została zatwierdzona do leczenia wczesnych stadiów raka przełyku oraz przełyku Barretta w kilku krajach (Huang, 2005). Przełyk Barretta oraz wczesne stadia raka

przełyku to jedne z najlepiej zbadanych zastosowań PDT (Agostinis, 2011). Najczęściej stosowanymi fotouczulaczami są Photofrin i ALA (Yano, 2011). Overholt i in. wykonali 5-letnie randomizowane badania wśród chorych z HGD (dysplazją przełyku dużego stopnia), będącą głównym czynnikiem ryzyka rozwoju raka przełyku (u około 0,5% pacjentów z HGD zaobserwowano rozwój raka w ciągu roku), które wykazały, że terapia fotodynamiczna wykorzystująca Photofrin oraz omeprazol (inhibitor pompy protonowej do zahamowania wydzielania soku żołądkowego), jest statystycznie skuteczna w produkcji długoterminowej ablacji HGD i zmniejsza ryzyko rozwoju raka (Yano, 2011), (Overholt, 2007). Rozwój w dziedzinie aplikatorów światła pozwolił na próby kliniczne zastosowania terapii fotodynamicznej w leczeniu zmian w narządach mięszzowych, takich jak wątroba i trzustka (Huang, 2005).

Wśród chorób pulmonologicznych PDT wydaje się być skuteczne w leczeniu niewielkich, powierzchownych i wczesnych zmian niedrobnokomórkowego raka płuca oraz w terapii paliatywnej obturacyjnych nowotworów drzewa tchawicz-oskrzelowego. Bronchoskopowe PDT z zastosowaniem chloryny e6 obecnie osiągnęło status standardowego protokołu w leczeniu wczesnego stadium raka płuc w Japonii (Huang, 2005).

Kilka grup badawczych opublikowało wyniki badań klinicznych dotyczących leczenia nowotworu prostaty przy pomocy PDT z wykorzystaniem fotouczulaczy drugiej generacji (m. in. temoporfiny, teksafiryny lutetu). Bardzo obiecujące są wyniki, wciąż trwających testów klinicznych, oceniających możliwość zastosowania nowego fotouczulacza - bakteriofeoforbidu palladu o komercyjnej nazwie Tookad (Agostinis, 2011), (Huang, 2005). Również powierzchniowy rak pęcherza moczowego jest atrakcyjnym celem terapii fotodynamicznej. Wczesny odsetek odpowiedzi (2 - 3 miesiące) na PDT obserwowano u około 50% do 80% pacjentów, a w dłuższym okresie (1 rok - 2 lata) trwałą odpowiedź stwierdzono u 20% do 60% pacjentów (Agostinis, 2011). Podobne wskaźniki obserwuje się przy zastosowaniu zatwierdzonych metod leczenia (elektroresekcji przezcewkowej oraz immunoterapii BCG) (Stewart, 1998). PDT zatwierdzono do leczenia powierzchniowego raka pęcherza w Kanadzie i kilku krajach Unii Europejskiej (Agostinis, 2011).

PDT przechodzi obecnie intensywne badania kliniczne pod kątem zastosowania jako leczenie uzupełniające nowotworów mózgu. Terapia fotodynamiczna może być szczególnie przydatna ze względu na specyficzny wychwyty fotouczulaczy przez tkankę mózgową (Agostinis, 2011), (Stewart, 1998). W ostatnich latach trzy grupy

przeprowadziły randomizowane badania oceniające skuteczność fotodiagnostyki i terapii fotodynamicznej we wspomagającym leczeniu pacjentów z glejakiem wielopostaciowym (Stummer, 2006), (Muller, 2006), (Eljamel, 2008). Początkowe wyniki badań są zachęcające i sugerują, że PDT może być stosowane jako leczenie uzupełniające u pacjentów ze złośliwymi guzami mózgu. Fotodiagnostyka skutecznie wspomaga resekcję guza i wraz z PDT może przyczynić się do wydłużenia czasu przeżycia pacjentów i poprawy jakości życia w tym okresie. W trakcie testów stosowano różne preparaty m.in. pochodną hematoporfiryny, temoporfimę oraz ALA (Agostinis, 2011).

Terapia fotodynamiczna znalazła także zastosowanie w leczeniu pewnych schorzeń nieonkologicznych, takich jak miażdżyca i reumatoidalne zapalenie stawów. Jednym z zatwierdzonych zastosowań jest wspomniane już wcześniej leczenie związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej (AMD) (Stewart, 1998). Prowadzone są badania związane z zastosowaniem PDT w miejscowym leczeniu zakażeń bakteryjnych. Udowodniono skuteczność PDT przeciwko szczepom bakterii wykazującym oporność wielolekową (Hamblin, 2004). PDT z błękitem metylowym została niedawno zatwierdzona w Kanadzie w leczeniu paradontozy. Inne trwające testy kliniczne obejmują zastosowanie PDT do sterylizacji przewlekłych zainfekowanych ran np. owrzodzeń cukrzycowych. Testuje się także możliwość zastosowania PDT do leczenia przeciwgrzybicznego (Wilson, 2008).

Omawiając kliniczne zastosowania terapii fotodynamicznej należy wspomnieć o możliwości poprzedzenia jej diagnostyką fotodynamiczną (PDD), co jest powszechnie przyjętą procedurą. W PDD wykorzystywany jest efekt wzbudzania endogennych związków porfiryńowych (diagnostyka autofluorescencyjna LIF) oraz egzogennych fotouczulaczy (głównie ALA), co pozwala na ukazanie obszaru zmienionego nowotworowo na tle zdrowej tkanki oraz określenie granicy zmiany bez naruszenia ciągłości skóry. Zastosowanie kamer o wysokiej czułości umożliwi obrazowanie w czasie rzeczywistym zjawisk fluorescencyjnych oraz wykonywanie pomiarów natężenia fluorescencji z jednoczesną analizą spektralną (Mazur, 2010).

W poniższej tabeli omówiono fotouczulacze zatwierdzone do użytku klinicznego oraz znajdujące się na etapie testów klinicznych wraz z ich zastosowaniami klinicznymi.

Tabela 5. Wybrane własności fotouczulaczy zatwierdzonych do leczenia schorzeń onkologicznych oraz będących w trakcie badań klinicznych (O'Connor, 2009)

Fotouczulacz	Photofrin	Tookad (WST09)	Foscan (mTHPC)	Purlytin (SnET ₂)	Lutrin	NPe6	Levulan	Metvix
Nazwa substancji czynnej	sól sodowa porfimeru	bakteriofeoforbid palladu	temoporfin	etiopurpuryna cyny	teksafiryna lutetu	chloryna c6	kwas 5-aminolewulinowy (ALA)	ester metylowy ALA
Absorpcja [nm]	630	763	652	664	732	664	635	635
Wewnątrzkomórkowa lokalizacja	aparat Golgiego, błona komórkowa	układ naczyniowy	ER, mitochondria	mitochondria, lizosomy	lizosomy	lizosomy, endosomy	mitochondria, cytoplazma, błony cytoplazmatyczne	mitochondria, cytoplazma, błony cytoplazmatyczne
Mechanizm niszczenia komórek nowotworowych	uszkodzenie naczyń, niedokrwienie guza, nekroza	uszkodzenie naczyń	uszkodzenia naczyń, bezpośrednie efekty cytotoksyczne	bezpśrednie efekty cytotoksyczne	bezpśrednie efekty cytotoksyczne	zapadanie naczyń, bezpśrednie efekty cytotoksyczne	bezpśrednie efekty cytotoksyczne	bezpśrednie efekty cytotoksyczne
Efekty uboczne	nadwrażliwość na światło, łagodne zaparcia	-	nadwrażliwość na światło	nadwrażliwość na światło	nadwrażliwość na światło (niewiełka)	-	-	-
Zatwierdzone klinicznie	TAK	NIE	TAK	NIE	NIE	TAK (JAPONIA)	TAK	TAK

III. CEL I ZAKRES PRACY

Jednym z kierunków rozwoju terapii fotodynamicznej są badania zmierzające do tworzenia nowych, skutecznie i selektywnie działających związków fotouczulających, których stosowanie jest jednocześnie bezpieczne dla pacjenta. Dużo uwagi poświęca się problemowi wybiórczego wychwytu fotouczulacza przez komórki nowotworowe i opracowywaniu strategii pozwalających na efektywny transport związków do komórek guza, przy równoczesnej zmniejszonej retencji w zdrowych tkankach. Jedną z takich metod może być przyłączenie do fotouczulacza podstawników, które w sposób szczególny i selektywny będą wychwytywane przez komórki guza np. fragmentów cukrów (Wojtyk, 2006), (Hamblin, 2008). Pozytywne doniesienia na temat zastosowania fotouczulaczy z fragmentami cukrów (Laville, 2003), (Obata, 2007), (Ballut, 2012), (Laville, 2006), (Chen, 2004), (Li, 2004) były motywacją do stworzenia serii zupełnie nowych związków fotouczulających z grupy chloryn. Celem naukowym pracy jest charakterystyka ich własności fizykochemicznych i biologicznych pod kątem potencjalnego zastosowania jako fotouczulacze w diagnostyce i terapii fotodynamicznej. Realizacja założonego celu możliwa jest dzięki wykonaniu szeregu badań fizycznych i biologicznych obejmujących:

1. Charakterystykę i porównanie własności absorpcyjnych i emisyjnych badanych pochodnych chloryny przy pomocy spektroskopii elektronowej UV-VIS.
2. Badanie absorpcji przejściowej oraz charakterystyka cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym.
3. Ocenę zdolności molekuł do generowania tlenu singletowego.
4. Badanie fotostabilności związków w warunkach prowadzonych eksperymentów biologicznych.
5. Badanie kinetyki wnikania fotouczulaczy do komórek na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych w celu wyznaczenia optymalnego czasu inkubacji komórek z roztworem fotouczulacza.
6. Ocenę toksyczności związków w ciemności oraz ich fototoksyczności *in vitro* w stosunku do wybranych linii komórkowych.
7. Ocenę zmian w morfologii komórek poddanych terapii.
8. Mikroskopową ocenę wewnątrzkomórkowej lokalizacji wybranych fotouczulaczy.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

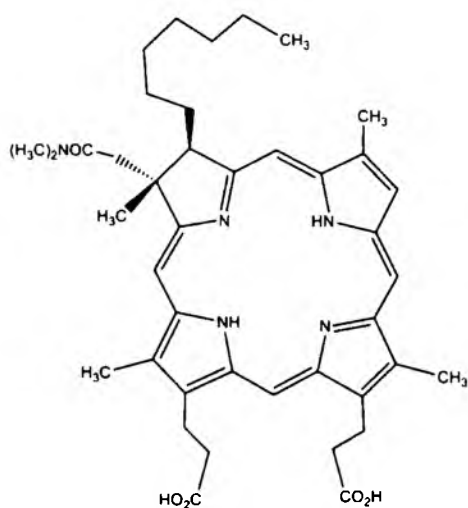
1. Badane związki

Przedmiotem badań były pochodne chloryny zaprojektowane i zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu w Bremen (Niemcy) przez zespół prof. Franza-Petera Montfortsa. Celem syntezy było stworzenie chloryn posiadających pożądane z punktu widzenia terapii fotodynamicznej właściwości biologiczne i fizykochemiczne, omówione szeroko w teoretycznej części pracy. Zastosowanie odpowiednich lipofilowych i hydrofilowych ugrupowań strukturalnych ma zapewniać amfifilowe właściwości chloryn oraz ich wybiórcze oddziaływanie na komórki nowotworowe za pośrednictwem przyłączonych reszt cukrowych.

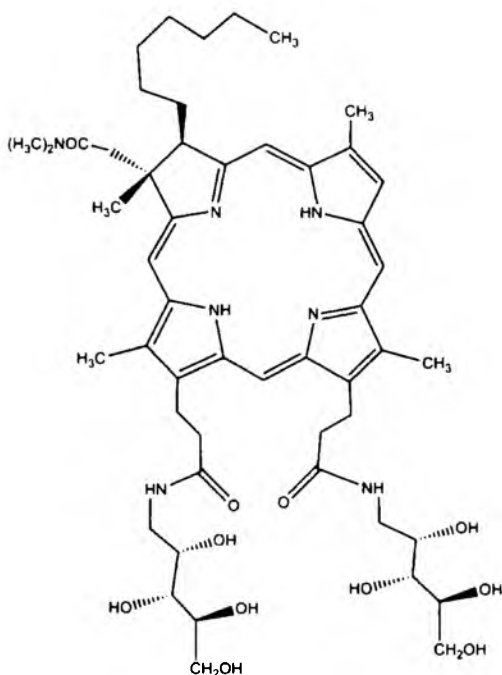
Cukry pełnią ważne funkcje biologiczne nie tylko jako źródło energii, ale również w procesach rozpoznawania molekularnego (np. infekcjach bakteryjnych i wirusowych, tworzeniu przerzutów nowotworowych, reakcjach zapalnych). Wchodząc w skład różnych glikoprotein, glikolipidów i innych glikokoniugatów, odgrywają kluczową rolę w wielu szlakach sygnałowych, procesach komunikacji międzykomórkowej oraz w transporcie celowanym (Sears, 1999). Glikolizacja czyli przyłączenie cukrów, nie tylko modyfikuje właściwości amfifilowe związków ale również pozwala na ich specyficzne oddziaływanie z powierzchnią komórek guza (Laville, 2006), (Vo-Dinh, 2003), (Obata, 2007), (Ballut, 2012). Związane jest to z nadekspresją wiążących cukier receptorów lektynowych przez niektóre typy nowotworów złośliwych (Laville, 2006), (Hama, 2006), (Wojtyk, 2006). Ich obecność umożliwia wybiórcze oddziaływanie pomiędzy cząsteczką fotouczulacza a komórką nowotworową, podobne do oddziaływania antygen-przeciwciało (Nyokong, 2012). Ponadto, cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest zwiększony wychwyt glukozy oraz wzmożona glikoliza (Chen, 2004), (Krześlak, 2010). Wszystko to sprawia, że przyłączenie fragmentów cukrów do cząsteczki fotouczulacza rozważane jest jako jedna ze strategii pozwalających na selektywny transport związków do komórek guza (Laville, 2006), (Wojtyk, 2006), (Hamblin, 2008).

Badane związki można podzielić na dwie grupy. W pierwszej z nich podstawowym fotouczulaczem jest amfifilowa pochodna dikarboksyłowa opisywana symbolem chl-2. Charakterystycznym elementem budowy chemicznej związków w tej grupie jest lipofilowy łańcuch n-heptyłowy przyłączony w pozycji 3 pierścienia. Dwa pozostałe związki to cukrowe pochodne chl-2 o symbolach chl-*a* i chl-*b*, które wśród

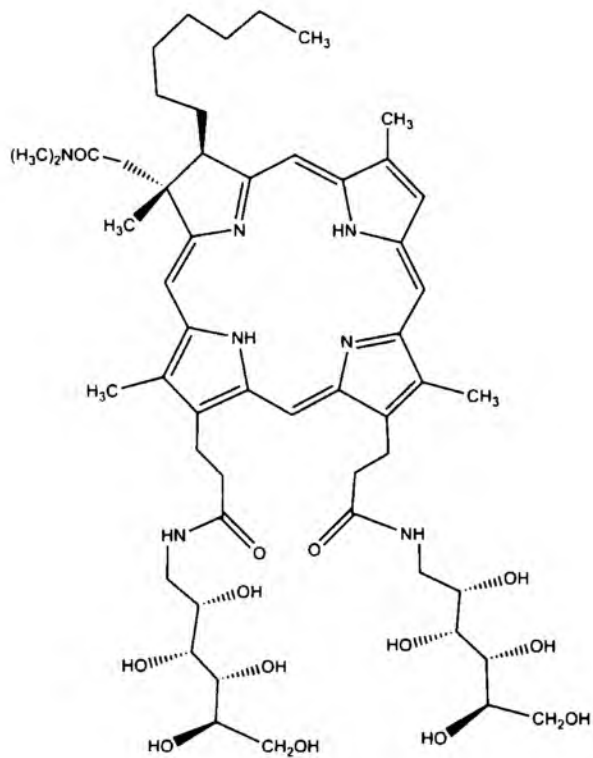
badanych związków charakteryzują się najlepszą rozpuszczalnością w wodzie. Drugą grupę fotouczulaczy stanowią pochodne chloryny e6. Zalicza się do nich monometylowy ester chloryny e6, opisywany symbolem chl-e, oraz jego cukrowe pochodne o symbolach chl-c i chl-d. Struktury chemiczne badanych fotouczulaczy przedstawiono na rysunkach 11 ÷ 16.



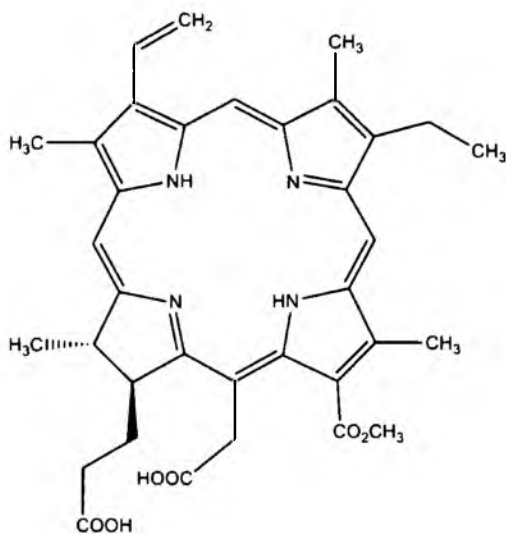
Rysunek 11. Struktura chemiczna chl-2 ($C_{41}H_{53}N_5O_5$ $M = 695,89$ g/mol)



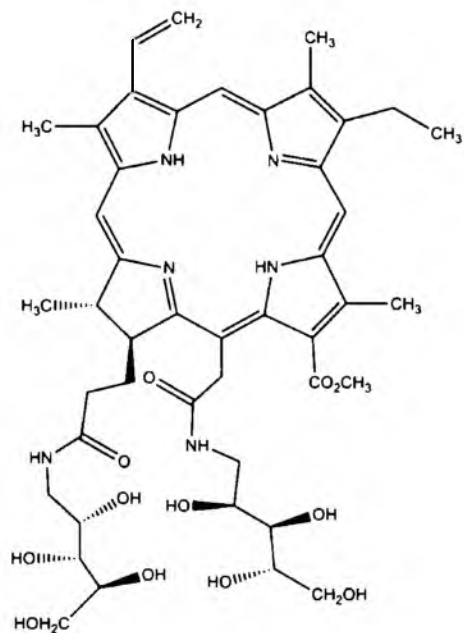
Rysunek 12. Struktura chemiczna chl-a ($C_{51}H_{75}N_7O_{11}$ $M = 962,18$ g/mol)



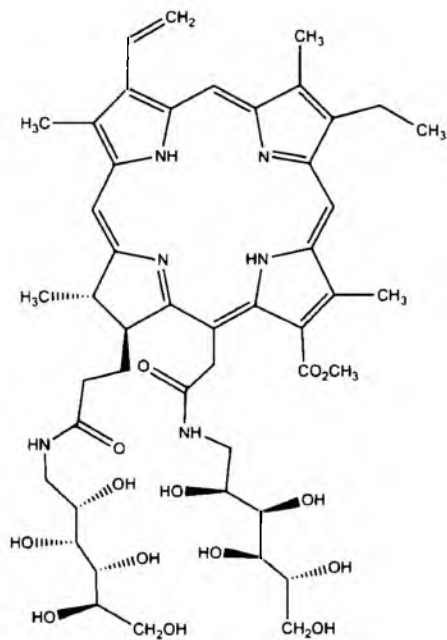
Rysunek 13. Struktura chemiczna chl-*b* ($C_{53}H_{79}N_7O_{13}$ $M = 1022,23$ g/mol)



Rysunek 14. Struktura chemiczna chl-*e* ($C_{35}H_{38}N_4O_6$ $M = 610,70$ g/mol)



Rysunek 15. Struktura chemiczna chl-*c* (C₄₅H₆₀N₆O₁₂ M = 876,99 g/mol)



Rysunek 16. Struktura chemiczna chl-*d* (C₄₇H₆₄N₆O₁₄ M = 937,04 g/mol)

2. Badania fizyczne

2.1 Spektroskopia elektronowa UV-VIS

Spektroskopia elektronowa w zakresie nadfioletu (UV) oraz światła widzialnego (VIS) jest podstawowym narzędziem pozwalającym na charakterystykę nowych fotouczulaczy w stanie podstawowym i w stanie wzbudzonym. Zarejestrowane widma absorpcji oraz emisji dostarczają cennych informacji na temat budowy samych cząsteczek, ich geometrii oraz symetrii (Paszyc, 1992), (Simons, 1976). Analiza uzyskanych widm pozwala na poznanie mechanizmów procesów fotofizycznych zachodzących w tych cząsteczkach oraz poznanie procesów fotochemicznych mających swój początek w ich stanach wzbudzonych (Najbar, 2009).

2.1.1 Widma absorpcyjne

Absorpcja promieniowania związana jest z przechodzeniem elektronów na wyższe poziomy energetyczne (Paszyc, 1992). Miarą procesu absorpcji jest absorbancja. Można ją wyznaczyć w oparciu o prawo Lamberta-Beera. Dla roztworów badanej substancji oświetlanych równoległą wiązką promieniowania monochromatycznego prawo to ma następującą postać (Paszyc, 1992), (Zieliński, 1995):

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \epsilon cl$$

gdzie:

- I_0 – natężenie promieniowania padającego,
- I – natężenie promieniowania przepuszczonego,
- A – absorbancja,
- ϵ – molowy współczynnik absorpcji,
- c – stężenie substancji absorbującej,
- l – droga optyczna.

Dotyczy pomiarów absorpcji w zakresie długości fal, w którym wykorzystany rozpuszczalnik nie absorbuje (Najbar, 2009). Występujący we wzorze molowy współczynnik absorpcji jest wielkością charakterystyczną dla danego związku, zależną od długości fali oraz rodzaju stosowanego rozpuszczalnika (Zieliński, 1995).

Do pomiarów widm absorpcyjnych wykorzystano spektrofotometr U-2900 firmy Hitachi. Szerokopasmowa wiązka promieniowania generowana była przez lampę

deuterową oraz wolframową a następnie przy pomocy zwierciadeł kierowana na monochromator. Promieniowanie monochromatyczne rozdzielano przy pomocy półzwierciadła na promień próbki i promień odniesienia. Po przejściu przez kuetę z badaną próbką i kuetę próbki odniesienia oba promienie ulegały skupieniu za pomocą soczewek i kierowane były do detektora gdzie przekształcano je na sygnały elektryczne. W trakcie pomiarów przygotowano serię roztworów fotouczulaczy o stężeniach: $1 \cdot 10^{-4}$, $0,75 \cdot 10^{-4}$, $0,5 \cdot 10^{-4}$, $0,25 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $0,75 \cdot 10^{-5}$ oraz $0,5 \cdot 10^{-5}$ M. Widma absorpcji rejestrowano w temperaturze pokojowej w kuetach kwarcowych w zakresie spektralnym od 300 nm do 800 nm z krokiem 1 nm. Jako rozpuszczalnik zastosowano dimetylosulfotlenek (DMSO) lub bufor fosforanowy (PBS, pH = 7,4).

2.1.2 Widma fluorescencji

Analiza widm fluorescencji obejmowała zarówno analizę przebiegu uzyskanych widm, jak również analizę ilościową związaną z wyznaczeniem kwantowej wydajności fluorescencji. Cząsteczka emituje promieniowanie w procesie fluorescencji podczas promienistego przejścia z najniższego poziomu oscylacyjno-rotacyjnego stanu elektronowego S_1 na dowolny poziom oscylacyjno-rotacyjny stanu podstawowego S_0 (Twardowski, 1989). (Paszyc, 1992). Przejście do niższego stanu elektronowego ma charakter pionowy (zgodnie z regułą Franka Condon), zatem widmo fluorescencji ma strukturę oscylacyjną, która charakteryzuje stan podstawowy (Atkins, 2007). Pasma fluorescencji występują przy niższych częstościach od częstości promieniowania wzbudzającego, ponieważ przejście emisyjne zachodzi po przekazaniu części energii oscylacyjnej do otoczenia (Atkins, 2007). Widmo fluorescencji uzyskuje się mierząc rozkład natężenia fluorescencji przy ustalonej długości fali promieniowania wzbudzającego. Natomiast, jeżeli ustalimy długość fali przy której obserwować będziemy fluorescencję a pomiar wykonamy zmieniając długość fali promieniowania wzbudzającego to otrzymamy proporcjonalne do widma absorpcji widmo wzbudzenia (Twardowski, 1989).

Do pomiarów widm emisji i wzbudzenia wykorzystano spektrofluorymetr F-7000 firmy Hitachi. W trakcie pomiarów przygotowano serię roztworów fotouczulaczy o stężeniach od $0,5 \cdot 10^{-5}$ M. Widma fluorescencji rejestrowano w temperaturze pokojowej w kuetach kwarcowych w zakresie spektralnym od 500 nm do 800 nm z krokiem 1 nm. Natomiast widma ekscytacji mierzono w zakresie od 300

nm do 800 nm z krokiem 1 nm. Jako rozpuszczalnik zastosowano dimetylosulfotlenek (DMSO) lub bufor fosforanowy (PBS, pH = 7,4).

2.1.3 Kwantowa wydajność fluorescencji

Kolejnym etapem badań, związanym z rejestracją widm fluorescencji, było wyznaczenie kwantowej wydajności fluorescencji określającej prawdopodobieństwo, tego że zaabsorbowany kwant energii zostanie wyemitowany w postaci fotonu w procesie fluorescencji (Najbar, 2009). Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej kwantowa wydajność fluorescencji fotouczulacza nie może być zbyt wysoka aby nie ograniczać ilości energii przekazywanej na tlen, prowadzącej do powstania tlenu singletowego.

Do wyznaczenia kwantowej wydajności fluorescencji wykorzystano metodę porównawczą (Williams, 1983). Jako wzorzec zastosowano tetrafenylporfiryne (TPP, Sigma), której kwantowa wydajność fluorescencji w toluenie wynosi 0,11 (Monteiro, 2005). Serię roztworów badanych fotouczulaczy oraz wzorca przygotowano tak, aby wartość absorbancji przy długości fali promieniowania wzbudzającego mieściła się w zakresie od 0,1 do 0,02. Jako rozpuszczalnik wykorzystano etanol, natomiast związek referencyjny rozpuszczono w toluenie. Pomiarów wykonano w temperaturze pokojowej, w warunkach równowagi z otoczeniem. Widma fluorescencji rejestrowano przy pomocy spektrofluorymetru F-7000 firmy Hitachi, wzbudzając wszystkie roztwory promieniowaniem o długości fali 400 nm. Z zarejestrowanych widm wyznaczano intensywność integralną, zdefiniowaną jako wielkość powierzchni ograniczonej konturem zmierzonego widma i tłem. Następnie wykreślano zależność intensywności integralnej w funkcji absorbancji. Do uzyskanych punktów pomiarowych dopasowywano funkcje liniowe i korzystając z parametrów dopasowania wyznaczono wartość kwantowej wydajności fluorescencji według poniższego wzoru:

$$\Phi_f = \Phi_f^{ref} \cdot \frac{a}{a_{ref}} \cdot \frac{n^2}{n_{ref}^2}$$

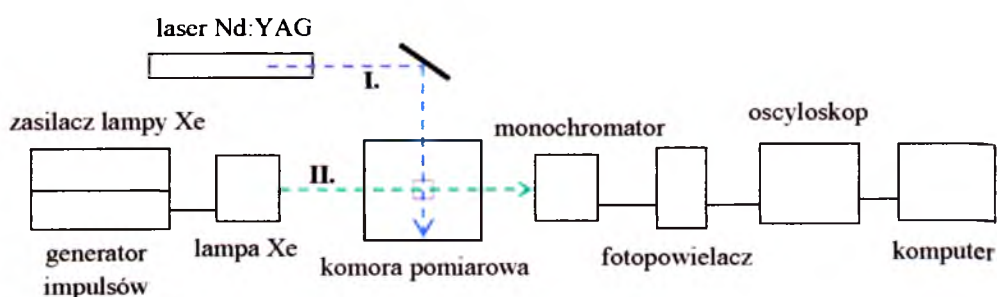
gdzie:

- Φ_f – kwantowa wydajność fluorescencji badanego związku (lub wzorca Φ_f^{ref}),
- a – współczynnik kierunkowy prostej ($y = ax + b$) odczytany dla badanego fotouczulacza (lub wzorca a_{ref}),
- n – współczynnik załamania światła rozpuszczalnika w którym przygotowano

roztwór badanej substancji (dla etanolu $n = 1,36$ (Grabolle, 2009)) lub roztwór wzorca (dla toluenu $n_{ref} = 1,50$ (Monteiro, 2005)).

2.2 Laserowa fotoliza błyskowa

Technika laserowej fotolizy błyskowej umożliwia badanie kinetyki i mechanizmów szybko zachodzących procesów. Ta impulsowa metoda znalazła zastosowanie w obserwacji i analizie różnego rodzaju procesów fotofizycznych i fotochemicznych, takich jak tworzenie i zanik stanów singletowych lub trypletowych cząsteczek, badanie absorpcji przejściowej oraz emisji promieniowania. Podstawą metody jest wzbudzenie badanego układu kilkunanosekundowym błyskiem promieniowania laserowego. W efekcie, w badanym układzie powstają krótko żyjące produkty przejściowe, takie jak stany wzbudzone, jony lub wolne rodniki, których detekcja polega na rejestrowaniu zmian absorpcji wzbudzonego układu. W tym celu stosuje się wiązkę światła generowaną podczas trwającego kilkaset mikrosekund rozbłysku lampy ksenonowej. Ta wiązka światła, często nazywaną analizującą, po przejściu przez próbkę i monochromator trafia do detektora przekształcającego zmiany w intensywności analizowanego światła na sygnały elektryczne, obserwowane na oscyloskopie lub ekranie komputera. Rejestrowane zmiany absorbancji można analizować w funkcji czasu lub w funkcji długości fali (Najbar, 2009), (Bensasson, 1993). Schemat blokowy spektrometru do laserowej fotolizy błyskowej przedstawiono na rysunku 17.



Rysunek 17. Schemat blokowy spektrometru do laserowej fotolizy błyskowej. I. – wiązka światła wzbudzającego generowana przez laser II. – wiązka analizująca

2.2.1 Wyznaczanie czasu życia molekuł w stanie trypletowym

Fotouczulacze wykorzystywane w terapii fotodynamicznej powinny charakteryzować się długim czasem życia w stanie trypletowym. Im dłużej cząsteczka fotouczulacza będzie znajdować się we wzbudzonym stanie trypletowym, tym większe prawdopodobieństwo tego, że energia wzbudzenia zostanie przekazana na tlen i powstanie wysoce reaktywny tlen singletowy.

Do wyznaczenia czasu życia badanych fotouczulaczy w stanie trypletowym wykorzystano spektrometr do laserowej fotolizy błyskowej LKS 60 (firmy Applied Photophysics). Wzbudzająca wiązka światła generowana była przez nanosekundowy laser neodymowy Nd:YAG (20 Hz Brilliant, Quantel) emitujący promieniowanie o długości fali 1064 nm, 532 nm, 355 nm i 266 nm. Energia impulsów wynosi odpowiednio 352 mJ, 160 mJ, 85 mJ i 42 mJ. Do wzbudzenia roztworów badanych fotouczulaczy wykorzystywano trzecią harmoniczną promieniowania generowanego przez laser ($\lambda = 355$ nm). Czas trwania impulsu wzbudzającego wynosił 3 - 4 ns. Roztwory fotouczulaczy przygotowano w etanolu tak, aby wartość absorbancji przy długości fali promieniowania wzbudzającego wynosiła 0,2 (przy pomiarach spektralnych $A = 0,1$). Wiązka analizująca generowana była przez lampę ksenonową (Osram 150W/CR OFR). Zmiany absorbancji rejestrowano przy pomocy fotopowielacza R928 (zakres 200 nm ÷ 850 nm). Pomiarzy wykonano w temperaturze pokojowej, w kuwetach kwarcowych. Podstawa czasowa oscyloskopu (Infiniium DSO9064A, 600 MHz, Agilent Technologies) wynosiła 100 ns/dz lub 1 μ s/dz, w zależności od warunków pomiaru. Napięcie na fotopowielaczu dobierano tak, aby dla poszczególnych długości fali uzyskiwany był sygnał o amplitudzie 300 mV.

Pierwszy etap badań obejmował pomiary spektralne związane z rejestracją widm absorpcji przejściowej, których celem było określenie przy jakiej długości fali obserwowane jest pasmo absorpcji tryplet-tryplet. W kolejnym etapie rejestrowano krzywe kinetycznego zaniku stanu trypletowego fotouczulaczy. Do ich detekcji zastosowano długość fali odczytaną z uprzednio zarejestrowanego widma, czyli około 450 nm. Pomiar powtarzano kilkakrotnie, uśredniając każdy pojedynczy sygnał dziesięciokrotnie. Krzywe kinetycznego zaniku stanu trypletowego rejestrowano w warunkach równowagi z otoczeniem (określane jako warunki tlenowe) oraz w warunkach zbliżonych do beztlenowych, uzyskanych poprzez 40 minutowe nasycanie roztworów argonem.

2.2.2 Wyznaczenie kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego

Do wyznaczenia kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} przez badane pochodne chloryny wykorzystano metodę porównawczą u podstaw której leży detekcja fosforescencji tlenu singletowego, którą obserwuje się zwykle przy ok. 1270 nm (Bensasson, 1993). Aby uzyskać możliwość rejestrowania promieniowania emitowanego przez badane roztwory konieczna była modyfikacja spektrometru LKS 60. Podczas pomiarów roztwór fotouczulacza wzbudzany był trzecią harmoniczną promieniowania generowanego przez laser Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm). Promieniowanie emitowane przez próbkę po przejściu przez dodatkowy filtr i monochromator (siatka dyfrakcyjna 600/mm) trafiało do detektora NIR Hamamatsu H10330A-45 (zakres 950 nm ÷ 1400 nm) schłodzonego do temperatury -60°C . Kolejne elementy do których docierał sygnał to oscyloskop i komputer.

Aby określić długość fali przy której obserwowana była maksymalna emisja tlenu singletowego zmierzono widmo fosforescencji tlenu singletowego w zakresie od 1220 nm do 1320 nm z krokiem co 1 nm. Następnie, dla odczytanej z widma długości fali ($\lambda = 1271$ nm) dokonano rejestracji krzywych kinetycznego zaniku fosforescencji tlenu singletowego. Pomiary wykonano dla różnych energii impulsu wzbudzającego. Ponieważ wykorzystywana metoda jest pomiarem porównawczym, w analogiczny sposób zmierzono związek referencyjny - fenalenon (Sigma). Roztwory badanych chloryn oraz związku referencyjnego przygotowano w etanolu tak, aby wartość absorbancji przy długości fali promieniowania wzbudzającego ($\lambda = 355$ nm) wynosiła 0,25. Literaturowa wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego dla fenalenonu w etanolu wynosi 0,95 (Schmidt, 1994). Do zarejestrowanych krzywych kinetycznych dopasowano funkcje eksponencjalne pierwszego rzędu i po ich ekstrapolacji do czasu $t = 0$ odczytano wartość początkowej intensywności emisji I_0 . Następnie wykreślano zależność początkowej intensywności emisji w funkcji względnej energii lasera. Do uzyskanych punktów pomiarowych dopasowano funkcje liniowe i korzystając z parametrów dopasowania wyznaczono wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} według poniższego wzoru (Wilkinson, 1993), (Nyokong, 2012):

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta ref} \cdot \frac{a}{a_{ref}}$$

gdzie:

Φ_{Δ} – kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego badanego związku (lub wzorca $\Phi_{\Delta ref}$)

a – współczynnik kierunkowy prostej ($y = ax + b$) odczytany dla badanej próbki (lub wzorca a_{ref})

2.3 Badanie fotostabilności

Większość fotouczulaczy wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej pod wpływem światła ulega degradacji (Hongying, 1999), (Rotomskis, 1997).

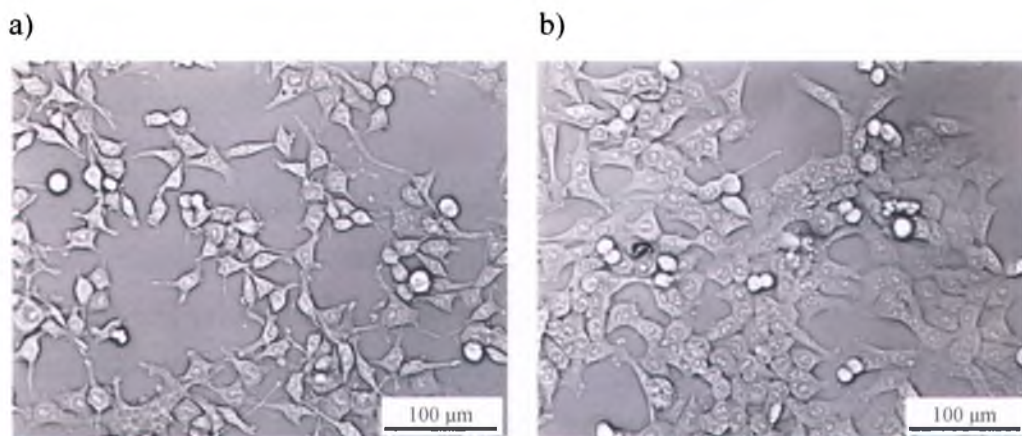
Aby sprawdzić fotostabilność badanych pochodnych chloryny w warunkach prowadzonych eksperymentów biologicznych zmierzono ich widma absorpcji przed i po naświetleniu światłem czerwonym o różnych dawkach. Do pomiarów widm wykorzystano spektrofotometr U-2900 firmy Hitachi. Roztwory fotouczulaczy o stężeniu 20 μM przygotowano, w zależności od związku, w buforze fosforanowym lub DMSO. Do ich naświetlania zastosowano lampę halogenową firmy Optel, którą wyposażono w filtr optyczny odcinający promieniowanie o długości fali krótszej od 630 nm. To samo źródło światła wykorzystywano podczas badania fototoksyczności pochodnych chlorynowych. Roztwory naświetlano przez różny czas (od 2 do 10 minut), co odpowiadało dawkom od 4,56 J/cm^2 do 20,52 J/cm^2 . Pomiar przeprowadzono w temperaturze pokojowej, mieszając roztwory w trakcie naświetlania przy pomocy mieszadła magnetycznego. Z zarejestrowanych widm odczytywano wartość absorbancji dla ostatniego pasma Q przed (A_0) i po naświetleniu (A). Obliczony stosunek absorbancji wyrażony w procentach traktowano jako miarę fotostabilności związków.

3. Badania biologiczne

3.1 Komórki nowotworowe i warunki hodowli

Badania przeprowadzono na komórkach ludzkiego gruczolaka okrężnicy linii hct116. Badania cytotoksyczności i fototoksyczności wykonano dodatkowo na komórkach linii hct116 p53^{-/-}, co pozwoliło na określenie wpływu białka p53 na przeżywalność komórek poddanych terapii. Obie linie pozyskano z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów (Gliwicki Oddział Centrum Onkologii). Komórki hodowano w plastikowych butelkach o powierzchni 75cm² (Nunc), wykorzystując pożywkę podstawową Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (medium DMEM F12, Sigma) z dodatkiem 12% surowicy płodów wołowych (FBS,

ang. foetal bovine serum, Gibco) oraz antybiotyków (gentamycyna, Polfa). Komórki pasażowano regularnie, co 3 do 4 dni, wykorzystując w tym celu 0,25% roztwór trypsyny (Trypsyna EDTA, Immuniq). Butelki hodowlane przechowywano w inkubatorze (Biolab 190, Angelantoni) w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i wilgotności 80%.



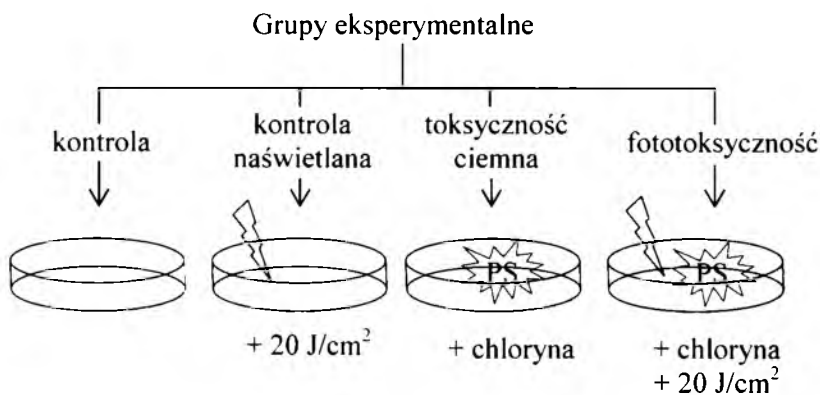
Rysunek 18. Mikroskopowe zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 (a) oraz hct116 p53^{-/-} (b)

3.2 Cytotoksyczność i fototoksyczność

Celem badania było wyznaczenie cytotoksyczności związków w ciemności (tzw. toksyczność ciemna) oraz określenie ich fototoksyczności po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi fotouczulaczami w różnych stężeniach i naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²). Aby określić jaki wpływ na przeżywalność komórek ma supresor kancerogenezy, białko p53, wykonano badania na komórkach gruczolaka okrężnicy typu dzikiego (hct116), oraz z nieaktywnym białkiem p53 (hct116 p53^{-/-}).

Podczas eksperymentu komórki odklejano od podłoża hodowlanego za pomocą 0,25% roztworu trypsyny (Trypsyna EDTA, Immuniq). Po odwirowaniu (1200 rpm, 5 min) i zliczeniu w komorze Bürkera, komórki wysiewano na szalkach Petriego o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 300 000 komórek/płytkę. Następnie płytki umieszczano w inkubatorze w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂, wilgotność 80%). Po ok. 24 godzinach, gdy komórki znajdowały się w wykładniczej fazie wzrostu, medium hodowlane zastępowano roztworem badanego fotouczulacza. Od momentu przygotowania i podania fotouczulacza wszystkie czynności wykonywane były przy ograniczonym dostępie światła. Roztwory fotouczulaczy przygotowywano rozpuszczając odważoną ilość związku w niewielkiej ilości buforu PBS (pH=7,4, bufor

fosforanowy pozbawiony jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , Immuniq) (chl-*a* i chl-*b*) lub DMSO (chl-*c*, chl-*d*, chl-*e*, chl-2). Otrzymany roztwór wyjściowy filtrowano (filtry CORNING 0,20 μm) a następnie rozcieńczano medium hodowlanym, tak by uzyskać pożądane stężenia końcowe (0,5 μM ÷ 5 μM). Rozcieńczenia przygotowywano tak, aby zawartość DMSO w roztworach końcowych nie przekraczała 0,3%. Inkubacja z roztworem fotouczulacza trwała 3,5 godziny (czas wyznaczono eksperymentalnie). Po upływie wymaganego czasu, roztwór fotouczulacza usuwano, a płytki przepłukiwano buforem PBS. Dalsze postępowanie uzależnione było od przynależności do danej grupy eksperymentalnej.



Rysunek 19. Schematyczne przedstawienie grup eksperymentalnych uwzględnionych w badaniach biologicznych

- I. Płytki przeznaczone do badania toksyczności ciemnej uzupełniano medium hodowlanym i po 24 h (standardowe warunki) przeżywalność komórek oceniono **testem MTS**.
- II. Na płytki przeznaczone do naświetlania dodawano 1 mL medium DMEM bez czerwieni fenolowej i przystępowano do ich naświetlania. W tym celu wykorzystano lampę halogenową firmy Optel, składającą się z czterech równolegle pracujących oświetlaczy halogenowych (250 W). Przy pomocy światłowodu światło kierowane było na szalkę Petriego umieszczoną na statywie w odległości 2 cm od zakończenia światłowodu, gdzie zamontowano filtr optyczny odcinający fale o długości krótszej od 630 nm. Wiązka światła padała centralnie na dno szalki ustawione pod kątem prostym do jej osi pionowej. Czas naświetlania wynosił 9 minut. Obliczona dawka promieniowana wynosiła

20 J/cm². Po zakończeniu naświetlenia medium bez czerwieni zastępowano medium hodowlanym a płytki umieszczano w cieplarni w standardowych warunkach. Przeżywalność komórek oceniano po 24 godzinach **testem MTS** lub wykonywanym od razu po naświetleniu **testem klonogenności**.



Rysunek 20. Lampa halogenowa wykorzystywana do naświetlania

III. Dodatkowo podczas każdego eksperymentu uwzględniano płytki kontrolne, nie traktowane żadnym czynnikiem oraz płytki stanowiące kontrolę naświetlaną, pozwalającą ocenić wpływ samego światła na proliferację komórek.

3.3 Ocena przeżywalności komórek testem MTS

Test MTS jest kolorymetryczną metodą pozwalającą ocenić przeżywalność komórek w oparciu o aktywność enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej. Podstawą metody jest zjawisko redukcji soli błękitu tetrazolowego (MTS) do barwnego formazanu, rozpuszczalnego w medium hodowlanym. Ponieważ opisana reakcja może zachodzić jedynie w mitochondriach żywych komórek, oznaczana na podstawie pomiaru absorbancji ilość formazanu jest proporcjonalna do liczby funkcjonalnych komórek.

Test MTS przeprowadzany był zgodnie z protokołem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (firmy Promega). Po 24 godzinnym okresie inkubacji z płytek Petriego usuwano medium hodowlane i na każdą z nich wkraplano 700 µl medium DMEM bez czerwieni fenolowej i 140µl odczynnika MTS. Po około 15 minutowej inkubacji, podczas której zachodziły wymagane reakcje chemiczne, zawartość z płytek przenoszono na płytki 96-dołkowe (po 120 µl/dołek). Kolejnym etapem był spektrofotometryczny pomiar absorbancji (przy 490 nm) czytnikiem płytek wielodołkowych Synergy (BioTek Instruments). Frakcję przeżywającą wyznaczano

w odniesieniu do grup kontrolnych, nie traktowanym żadnym czynnikiem, zgodnie z zależnością:

$$SF = \frac{A}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100\%$$

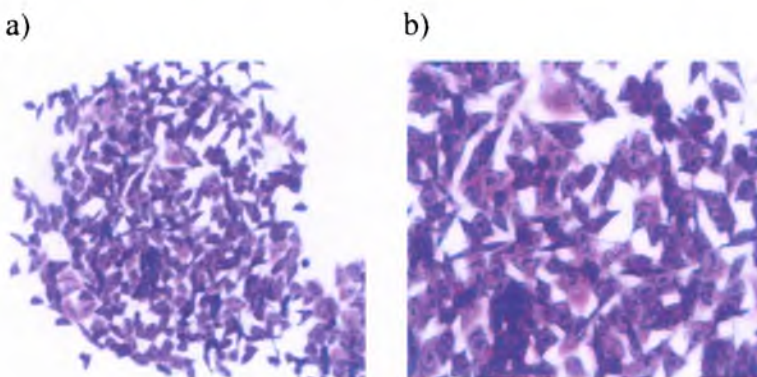
gdzie:

- SF – frakcja przeżywająca (ang. *survival fraction*)
 A – odczytana wartość absorbancji
 A_{kontrola} – wartość absorbancji odczytana dla grupy kontrolnej

3.4 Ocena przeżywalności komórek testem klonogenności

Test klonogenności pozwala ocenić długofalowe skutki stosowanej terapii. Jest doskonałą metodą pozwalającą potwierdzić wyniki uzyskane testem MTS i wskazać, czy komórki uznane w teście MTS za żywe, po czasie dłuższym niż 24 godziny nie weszły na drogę śmierci komórkowej lub też, czy wykryte wówczas uszkodzenia, nie zostały w późniejszym czasie naprawione.

Podstawą testu klonogenności jest zdolność żywych komórek do tworzenia kolonii potomnych. Pod pojęciem kolonia rozumie się skupisko składające się przynajmniej z 50 komórek (co odpowiada 6 - 7 podziałom komórkowym). Przykładowy obraz komórek linii hct116 tworzących kolonie komórek klonogennych pokazano na rysunku.



Rysunek 21. Mikroskopowy obraz komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 tworzących kolonię potomną. a) powiększenie 100x b) powiększenie 400x

Po zakończeniu procedury naświetlania, komórki odklejano od podłoża hodowlanego za pomocą 0,25% roztworu trypsyny (1 mL). Po zwirowaniu (1200 rpm, 5 min) i zliczeniu w komorze Bürkera komórki wysiewano w 5 mL medium

hodowlanego na płytkach hodowlanych o średnicy 6 cm (Nunc). Ilość wysianych komórek była uzależniona od oczekiwanego efektu terapeutycznego. Następnie płytki przez 9 dni inkubowano w standardowych warunkach. Po tym czasie te z komórek, które przeżyły terapię i zachowały zdolność do proliferacji, dawały widoczne gołym okiem kolonie potomne. Otrzymane kolonie po utrwaleniu 96% roztworem alkoholu etylowego i wybarwieniu 0,1% roztworem fioletu krystalicznego, były zliczane przy pomocy mikroskopu świetlnego. Dla grup kontrolnych (nie traktowanych żadnym czynnikiem) wyznaczano wydajność posiewu PE (ang. *plating efficiency*) jako stosunek liczby zliczonych kolonii do liczby wysianych komórek. Następnie wyznaczono przeżywalność komórek SF (ang. *survival fraction*) korzystając z zależności:

$$SF = \frac{\text{liczba zliczonych kolonii}}{\text{ilość posianych komórek} \cdot PE} \cdot 100\%$$

3.5 Badanie kinetyki wnikania fotouczulacza do komórek

W celu określenia czasu po którym ilość fotouczulacza w komórce jest maksymalna wykonano spektrofotometryczny pomiar lizatów komórkowych. Podczas eksperymentu komórki wysiewano na płytkach 96-dołkowych (Nunc) w ilości 9 000/dołek. Po upływie ok. 24 godzin, gdy komórki znajdowały się w wykładniczej fazie wzrostu, z płytek usuwano medium hodowlane a na dołki wkraplano 200 μ L roztworu fotouczulacza. Następnie komórki inkubowano (standardowe warunki) z roztworem fotouczulacza przez 1, 2, 3, 4, 5, 6 godzin. Po zakończeniu inkubacji roztwór fotouczulacza usuwano i każdy dołek przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS. Kolejny etap polegał na dodaniu do każdego dołka 10 μ L czynnika permeabilizującego błonę Tritonu-X-100 oraz 90 μ L buforu lizującego zawierającego DMSO oraz alkohol etylowy (96%) zmieszane w stosunku 1:3 i uzupełnione dodatkowo 1% Tritonu-X-100. Po 10 minutowej inkubacji i wymieszaniu zawartości dołków płytki zwirowano (2000 rpm, 10 minut), a supernatant przeniesiono na płytki 96-dołkowe przeznaczone do pomiarów fluorescencji. Analiza polegała na rejestracji widm fluorescencji uzyskanych lizatów. Dodatkowo rejestrowano trójwymiarowe wykresy wzbudzenie - emisja. Do pomiarów wykorzystano spektrofluorymetr F-7000 FL (Hitachi) wyposażony w przystawkę do analizy płytek 96-dołkowych. Długość fali wzbudzenia odpowiadała paśmie Soretta danego fotouczulacza. Wszystkie czynności od momentu przygotowania roztworu fotouczulacza i jego aplikacji wykonywane były w warunkach

ograniczonego dostępu światła. Z zarejestrowanych widm odczytywano maksymalną wartość intensywności fluorescencji. Wykreślając zależność maksimum intensywności fluorescencji od czasu inkubacji z fotouczulaczem możliwe było stwierdzenie po jakim czasie ilość fotouczulacza zgromadzonego we wnętrzu komórki jest maksymalna.

3.6 Mikroskopowe badanie cech morfologicznych komórek po terapii

Do oceny zmian w morfologii komórek poddanych działaniu badanych fotouczulaczy i światła wykorzystano mikroskopię świetlną oraz mikroskopię elektronową.

W tym celu komórki linii hct116 traktowano w sposób identyczny jak podczas badania fototoksyczności (rozdział 3.2). Przejyciową ocenę morfologii komórek przeprowadzono przy pomocy mikroskopu świetlnego po 6 oraz po 24 godzinach od zakończenia naświetlania. Wykorzystano odwrócony mikroskop optyczny IX81 firmy Olympus z kamerą cyfrową, wyposażony w komorę przejyciową, zapewniającą komórkom warunki optymalne do wzrostu w trakcie obserwacji (kontrola temperatury i stężenia CO₂). Do akwizycji obrazów wykorzystano oprogramowanie Cell[^]R (Olympus). Analizę ograniczono do komórek eksponowanych na działanie badanego fotouczulacza lub związku referencyjnego (temoporfiny) i światła oraz komórek kontrolnych nie traktowanych żadnym czynnikiem.

Dodatkowo podjęto próbę obserwacji komórek przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego Joel 7600F wyposażonego w przystawkę „cryo-SEM” do pomiaru próbek biologicznych. W tym celu komórki linii hct116 wysiewano w ilości 60 000/dołek na płytkach 24 dołkowych (firmy Nunc), w których wcześniej umieszczono szkiełka nakrywkowe Thermanox[®] (Nunc). Po około 18 godzinach medium hodowlane zastępowano medium z roztworem fotouczulacza (o stężeniu 2,5 μM). Po 3,5-godzinnej inkubacji komórki naświetlano, w sposób analogiczny jak przy badaniu fototoksyczności. Po 24 godzinach komórki utrwalano i odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego. Bezpośrednio przed obserwacją szkiełka z komórkami zamrażano w ciekłym azocie i następnie umieszczano je w komorze preparacyjnej przystawki „cryo-SEM”. Po usunięciu lodu z powierzchni próbki i naporowaniu cienkiej warstwy platyny (ok. 5 nm) zamrożoną próbkę transportowano do komory mikroskopu. Obserwację przeprowadzono w temperaturze -130°C przy napięciu przyspieszającym od 2 kV do 15 kV. Analiza mikroskopowa obejmowała komórki

poddane działaniu fotouczulacza i światła oraz komórki kontrolne poddane jedynie działaniu światła (tzw. kontrola naświetlana).

3.7 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa

Aby ocenić wewnątrzkomórkową lokalizację fotouczulaczy, komórki linii hct116 wysiewano na 8-komorowych szkiełkach hodowlanych (Lab-Tek™ Chambered Coverglass, Nunc) w ilości 38 000 komórek/dołek. Po około 18 godzinach medium hodowlane zastępowano roztworem fotouczulacza (2,5 μM) i komórki inkubowano przez kolejne 2 godziny. Po zakończeniu inkubacji dołki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS i dodawano roztwór odpowiedniego barwnika. W ostatnich latach odkryto szereg fluoroforów, które mogą specyficznie barwić określone struktury wewnątrzkomórkowe, pozwalając na wizualizację ich położenia w komórce. Barwniki te swobodnie przenikają przez nienaruszone błony biologiczne, co pozwala na ich zastosowanie do tzw. „przeżyciowego” barwienia komórek. Listę wykorzystanych barwników fluorescencyjnych oraz warunki barwienia przedstawiono w tabeli 6. Po upływie wymaganego czasu inkubacji, który wynosił od 30 minut do 1 godziny, dołki przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS i uzupełniono medium DMEM bez czerwieni fenolowej. Analizę mikroskopową rozpoczynano od razu, ograniczając się do oceny lokalizacji subkomórkowej fotouczulacza dla którego zaobserwowano najsilniejszy efekt fotodynamiczny, czyli chl-c. Komórki obserwowano „przeżyciowo” z zastosowaniem kontrastu fazowego oraz w technice fluorescencji przy pomocy mikroskopu odwróconego IX81 firmy Olympus.

Tabela 6. Opis wykorzystanych barwników fluorescencyjnych (Promega)

Rodzaj barwnika wybarwiane organella	Stężenie barwnika (czas inkubacji)	Długość fali wzbudzenia / emisji [nm]	Opis
MitoTracker mitochondria	100 nM (30 min)	490 / 516	Nie wykazuje fluorescencji w wodnym środowisku. Emisja promieniowania zachodzi jedynie w środowisku lipidowym charakterystycznym dla mitochondriów.
LysoTracker lizosomy	5 μM (60 min)	465 / 535	Sklada się z fluoroforu przyłączonego do słabej, częściowo uprotonowanej zasady. Dzięki temu może swobodnie przenikać przez błony i gromadzić się w sferycznych organellach o niskim wewnętrznym pH, jakimi są lizosomy.

ER Tracker ER – siateczka śródpłazmatyczna	1 μ M (60 min)	504 / 511	Składa się z zielonego barwnika fluorescencyjnego BODIPY [®] TR oraz glibenklamidu, który jest lekiem przeciwcukrzycowym wiążącym się specyficznie z receptorami sulfonilomocznika na ATP-zależnych kanałach potasowych obecnych na ER.
Hoechst jądro komórkowe	4 μ g/mL (30 min)	350 / 461	Należy do rodziny barwników fluorescencyjnych, bis-benzimidazoli, wybarwiających DNA na zasadzie interkalacji.

3.8. Analiza statystyczna

Analizie statystycznej poddano wyniki testu MTS oceniające przeżywalność komórek linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} poddanych 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny w różnych stężeniach w ciemności (badanie cytotoksyczności) oraz po naświetleniu światłem czerwonym o dawce 20 J/cm² (badanie fototoksyczności). Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich z sześciu niezależnych eksperymentów dla komórek linii hct116 lub trzech niezależnych eksperymentów w przypadku komórek z nieaktywnym białkiem p53. Każdy z eksperymentów obejmował 6 punktów pomiarowych. Błąd pomiaru wyznaczono ze wzoru na odchylenie standardowe. Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, USA). Analiza statystyczna miała na celu:

- przy badaniu cytotoksyczności zbadanie istotności statystycznej różnic w przeżywalności komórek inkubowanych z daną pochodną chloryny w określonym stężeniu, a grupą kontrolną,
- przy badaniu efektu fotodynamicznego określenie istotności statystycznej różnic w przeżywalności komórek o różnym statusie białka p53.

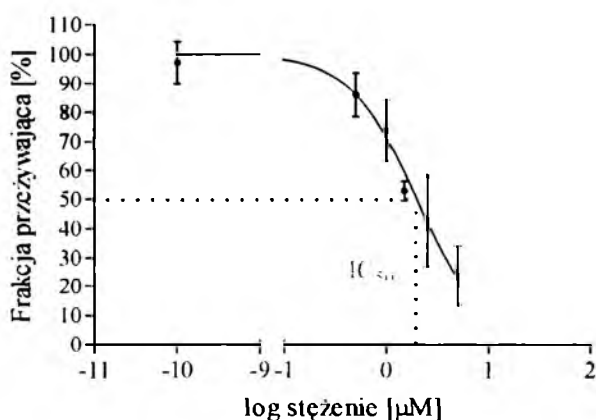
Normalność rozkładów badanych zmiennych oceniano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Do wykrycia istotności różnic pomiędzy porównywanymi wartościami średnimi zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitney'a. Dla każdej porównywanej pary zmiennych wyznaczono poziom prawdopodobieństwa p. Gdy wartość ta była mniejsza

od 0,05 stwierdzano, iż analizowane różnice są istotne statystycznie. Dodatkowo zastosowano następujące oznaczenia poziomu istotności statystycznej:

Tabela 7. Wyjaśnienie oznaczeń (*, **, ***, ****) zastosowanych w prezentowanych w pracy wykresach słupkowych. Ilość gwiazdek oznacza poziom istotności statystycznej zgodnie z danymi zamieszczonymi w tabeli.

Wartość prawdopodobieństwa p	Znaczenie	Oznaczenie
< 0,0001	istotny statystycznie	****
od 0,0001 do 0,001		***
od 0,001 do 0,01		**
od 0,01 do 0,05		*
> 0,05	nie jest statystycznie istotny	brak

Do wyznaczenia parametru IC_{50} (\pm błąd pomiaru) wykorzystano również pakiet oprogramowania GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, USA). W tym celu do uzyskanych punktów doświadczalnych dopasowano krzywe, wykorzystując metodę regresji nieliniowej (stałe nachylenie), tak jak pokazano na rysunku 22. Zastosowano jedno z dostępnych w pakiecie równań dawka-reakcja najlepiej obrazujące zależność zahamowania wzrostu komórek (wyrażonego jako procent w stosunku do kontroli) od logarytmu stężenia badanego związku.



Rysunek 22. Metoda wyznaczania parametru IC_{50} przy pomocy pakietu GraphPad Prism v.5.0 zastosowana dla jednej z badanych chloryn

V. OTRZYMANE WYNIKI I DYSKUSJA

1. Badania fizyczne

1.1 Widma absorpcyjne

Analizując strukturę widm absorpcyjnych roztworów badanych fotouczulaczy możliwe jest zidentyfikowanie stanów elektronowych cząsteczek oraz sprawdzenie, czy związek posiada własności odpowiednie z punktu widzenia terapii fotodynamicznej. Własności absorpcyjne związków, których struktura opiera się na pierścieniu porfiryńowym, zostały szeroko omówione w literaturze (Bonnett, 2000), (Gouterman, 1961). Widma te powstają w wyniku przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$. Charakteryzuje je obecność intensywnego pasma przy około 400 nm, nazywanego pasmem Soreta oraz czterech szerokich pasm w zakresie widzialnych, nazywanych pasmami Q. Pasma Soreta jest wynikiem przejścia elektronowego ze stanu podstawowego S_0 do wzbudzonego stanu singletowego S_2 ($S_0 \rightarrow S_2$), natomiast pasma Q odpowiadają przejściu $S_0 \rightarrow S_1$ (Josefsen, 2008). Widma chloryn wykazują pewne różnice w stosunku do widm porfiryń, wynikające z redukcji wiązania podwójnego w jednym z czterech pierścieni pirolowych i zmiany położenia elektronów zdelokalizowanych π w pierścieniu aromatycznym. Pasma Q fotouczulaczy z grupy chloryn są przesunięte w kierunku fal dłuższych (efekt batochromowy) i charakteryzują się wyższą wartością molowych współczynników absorpcji ϵ (Bonnett, 2000), (Wainwright, 2009).

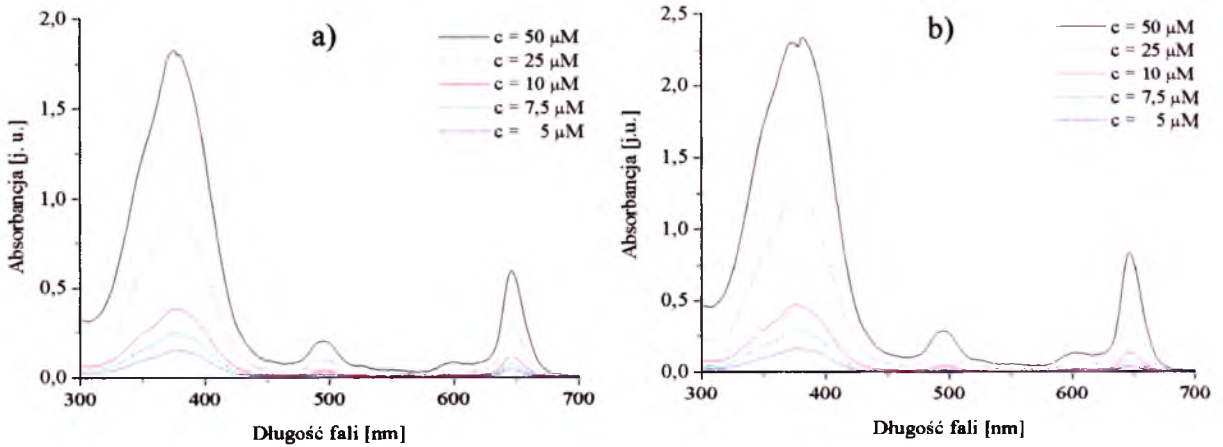
Widma absorpcji roztworów badanych fotouczulaczy w buforze fosforanowym (PBS, pH = 7,4) lub dimetylosulfotlenku (DMSO) przedstawiono na wykresach 1 - 2. Na podstawie wartości absorbancji, odczytanych z zarejestrowanych widm, wyznaczono wartości molowych współczynników absorpcji, korzystając z przekształconego prawa Lamberta-Beera:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l}$$

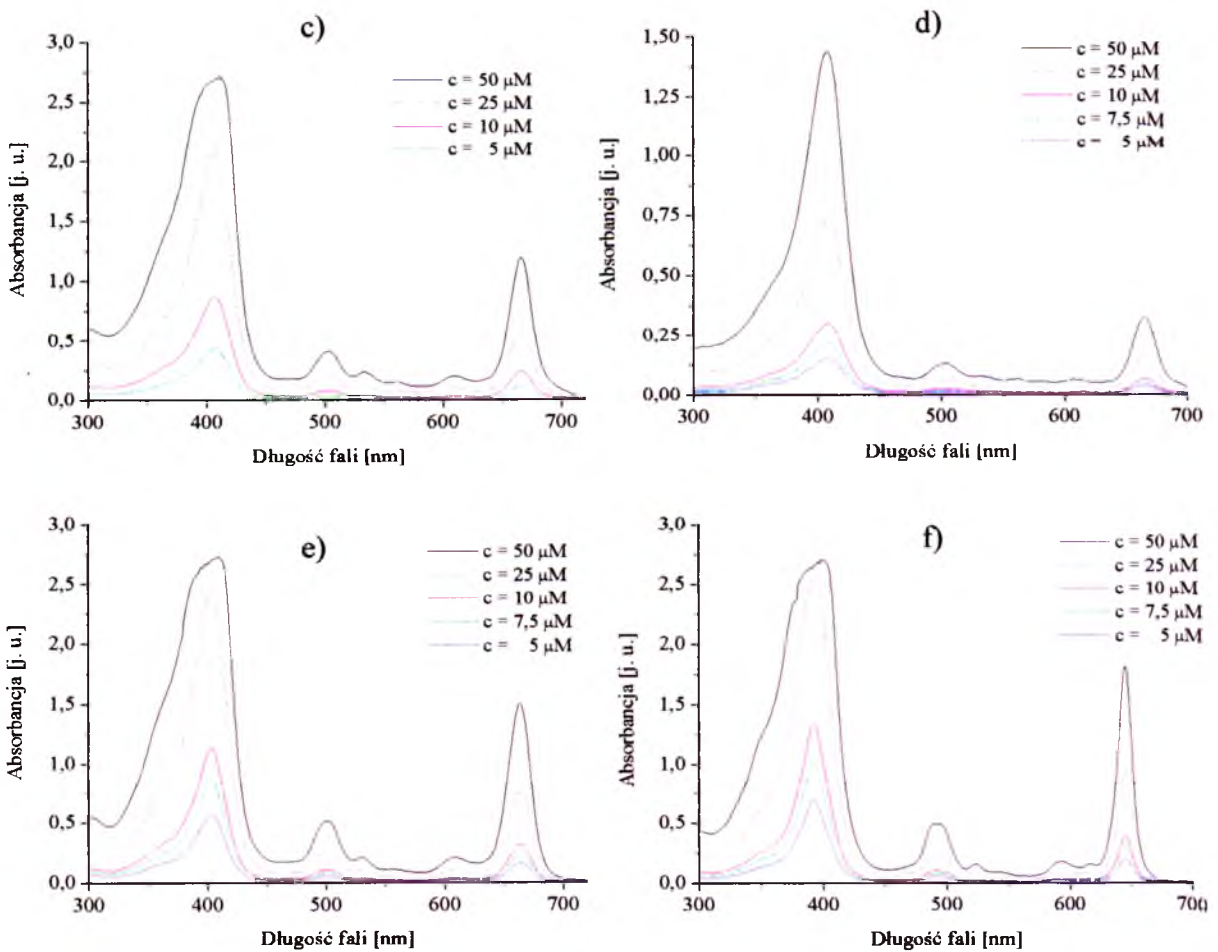
gdzie:

- ϵ - molowy współczynnik absorpcji [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$],
- A - absorbancja,
- c - stężenie substancji absorbującej [M],
- l - droga optyczna [cm].

Położenie pasm absorpcji λ oraz wyznaczone wartości molowych współczynników absorpcji ϵ przedstawiono w tabeli 8 - 9.



Wykres 1. Widma absorpcji serii roztworów chl-a (a) oraz chl-b (b) w PBS



Wykres 2. Widma absorpcji serii roztworów chl-c (c), chl-d (d), chl-e (e) oraz chl-2 (f) w DMSO

Tabela 8. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* oraz chl-2 w DMSO.

Nazwa fotouczulacza	Położenie pasm absorpcji λ [nm] Molowe współczynniki absorpcji ϵ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]					
	Soret	Q	Q	Q	Q	Q
chl- <i>c</i>	406,5	503	533	560,5	609	666
	$8,72 \cdot 10^4$	$8,23 \cdot 10^3$	$4,77 \cdot 10^3$	$3,06 \cdot 10^3$	$4,02 \cdot 10^3$	$2,31 \cdot 10^4$
chl- <i>d</i>	408	503	535	561	607	665,5
	$2,91 \cdot 10^4$	$2,75 \cdot 10^3$	$1,61 \cdot 10^3$	$1,39 \cdot 10^3$	$1,31 \cdot 10^3$	$6,78 \cdot 10^3$
chl- <i>e</i>	403	501	530	560	608	663,5
	$1,13 \cdot 10^5$	$1,02 \cdot 10^4$	$4,17 \cdot 10^3$	$2,16 \cdot 10^3$	$4,09 \cdot 10^3$	$2,69 \cdot 10^4$
chl-2	392	490	523	593	616	645
	$1,34 \cdot 10^5$	$9,98 \cdot 10^4$	$3,13 \cdot 10^4$	$3,51 \cdot 10^4$	$3,12 \cdot 10^4$	$2,87 \cdot 10^5$

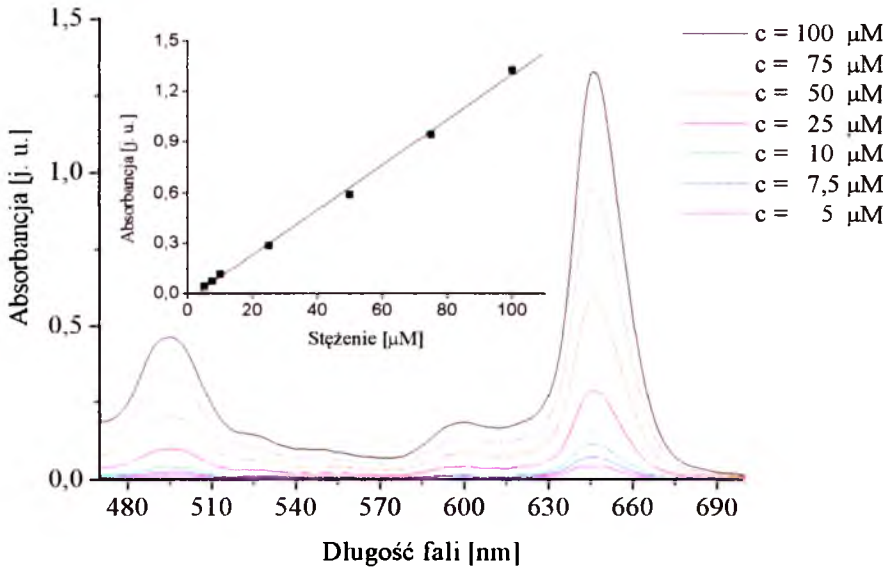
Tabela 9. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl-*a* i chl-*b* w PBS.

Nazwa fotouczulacza	Położenie pasm absorpcji λ [nm] Molowe współczynniki absorpcji ϵ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]				
	Soret	Q	Q	Q	Q
chl- <i>a</i>	376	495	526	600	646
	$3,74 \cdot 10^4$	$4,61 \cdot 10^3$	$1,43 \cdot 10^3$	$1,85 \cdot 10^3$	$1,33 \cdot 10^4$
chl- <i>b</i>	377	495	526	602,5	646,5
	$5,16 \cdot 10^4$	$6,36 \cdot 10^3$	$1,87 \cdot 10^3$	$2,96 \cdot 10^3$	$1,83 \cdot 10^4$

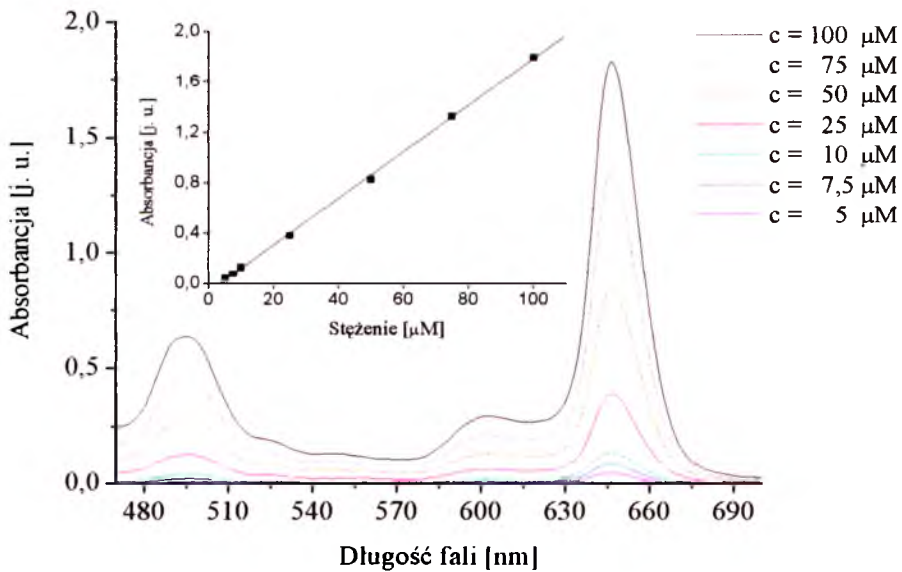
Elektronowe widma absorpcji badanych pochodnych chloryny posiadają pasmo Soreta w zakresie od 300 nm do 450 nm. W przypadku roztworów przygotowanych w dimetylosulfotlenku maksimum tego pasma występuje przy ok. 400 nm (w zależności od związku od 392 nm do 408 nm), natomiast dla roztworów fotouczulaczy w buforze fosforanowym jego maksimum jest przesunięte w kierunku fal krótszych (około 376 nm). Pasma Q występują w zakresie od 450 nm do 700 nm. Na widmach roztworów chloryn przygotowanych w dimetylosulfotlenku można zaobserwować pięć pasm Q, natomiast dla roztworów w buforze fosforanowym widoczne są cztery pasma Q. Aby zapewnić skuteczność terapeutyczną fotouczulacze muszą wykazywać absorpcję w zakresie od 600 nm do 850 nm (Josefsen, 2008), (Plaetzer, 2009). Zatem wszystkie badane pochodne chloryny posiadają pasma absorpcji w tym zakresie.

Z punktu widzenia aplikacji w terapii fotodynamicznej najistotniejsze są właściwości ostatniego pasma Q fotouczulacza. Ważne jest, aby pasmo to było jak najbardziej przesunięte w kierunku fal dłuższych i charakteryzowało się możliwie wysoką wartością molowego współczynnika absorpcji. Spośród badanych fotouczulaczy pochodne chloryny e6 tj. chl-*c*, chl-*d* i chl-*e* posiadają ostatnie pasma Q najbardziej przesunięte w kierunku dalekiej czerwieni/bliskiej podczerwieni. Ich położenie wynosi odpowiednio 666 nm, 665,5 nm oraz 663,5 nm. Jednocześnie odpowiadające im wartości molowych współczynników absorpcji są rzędu 10^4 . Wśród wymienionych fotouczulaczy najkorzystniejsze wydają się właściwości absorpcyjne chl-*e*, dla której przy długości fali $\lambda = 663,5$ nm molowy współczynnik absorpcji wynosi $\varepsilon = 2,69 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Spośród wszystkich fotouczulaczy najwyższą wartość molowego współczynnika absorpcji ostatniego pasma Q zaobserwowano dla chl-2 ($\varepsilon = 2,87 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ przy $\lambda = 645$ nm). Również chl-2 charakteryzuje się największą wartością molowego współczynnika absorpcji dla pasma Soreta, co jest korzystne z punktu widzenia diagnostyki fotodynamicznej. Dla wszystkich zarejestrowanych widm absorpcji można zaobserwować charakterystyczną zależność pomiędzy wartościami molowych współczynników absorpcji poszczególnych pasm Q. Pierwsze i ostatnie pasmo Q wykazują większą intensywność od pozostałych, przy czym intensywność ostatniego pasma Q jest największa. Taka zależność pomiędzy wartościami molowych współczynników absorpcji jest typowa dla związków z rodziny chloryn (Bonnett, 2000).

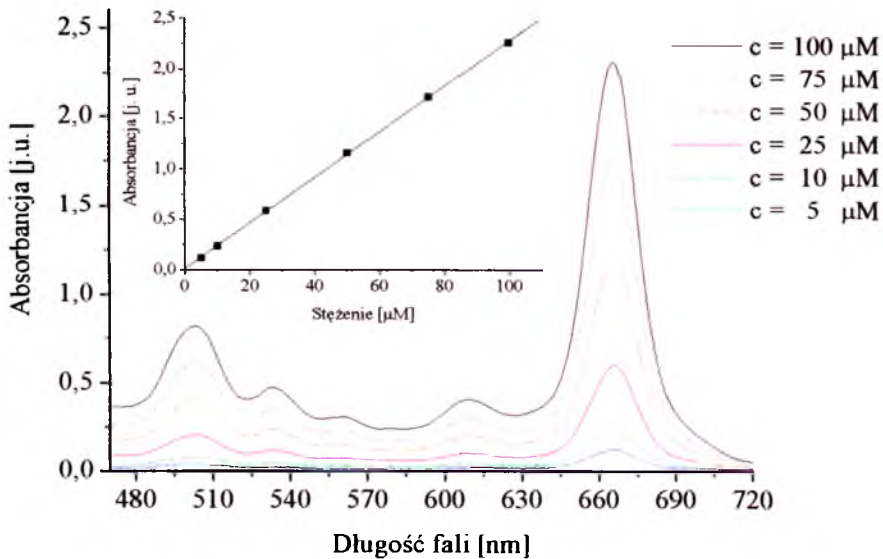
Aby zbadać własności agregacyjne badanych fotouczulaczy ze zmierzonych widm odczytano wartości absorbancji dla ostatniego pasma Q i wykreślono ich zależność od stężenia roztworu. Zjawisko agregacji niekorzystnie wpływa na własności fizykochemiczne fotouczulaczy, skracając czas życia oraz kwantową wydajność stanu trypletowego i prowadząc w efekcie do obniżenia kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego (Plaetzer, 2009). Otrzymane zależności $A = f(c)$ miały charakter liniowy. Przedstawiono je na wykresach 3 – 8.



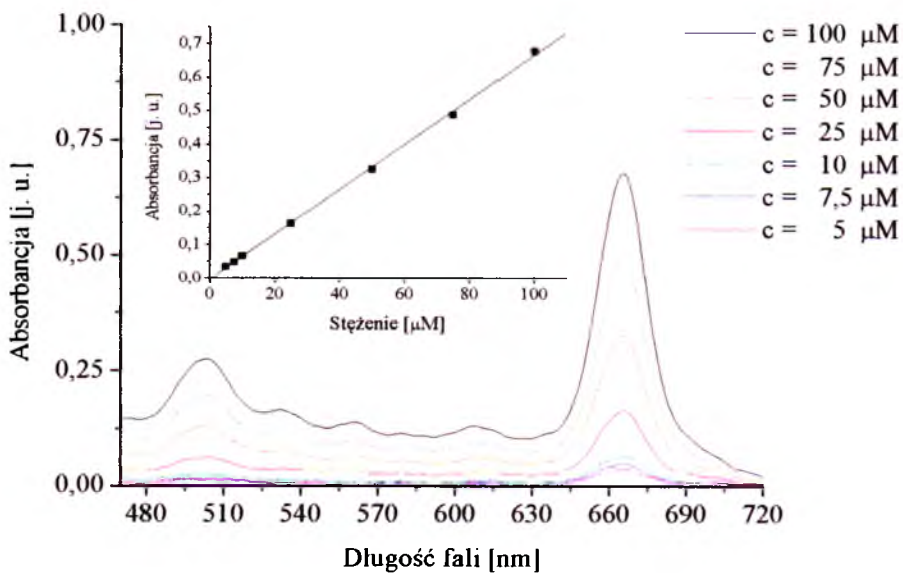
Wykres 3. Graficzna zależność absorpcji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-a w buforze fosforanowym. Wartość absorpcji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 646 \text{ nm}$).



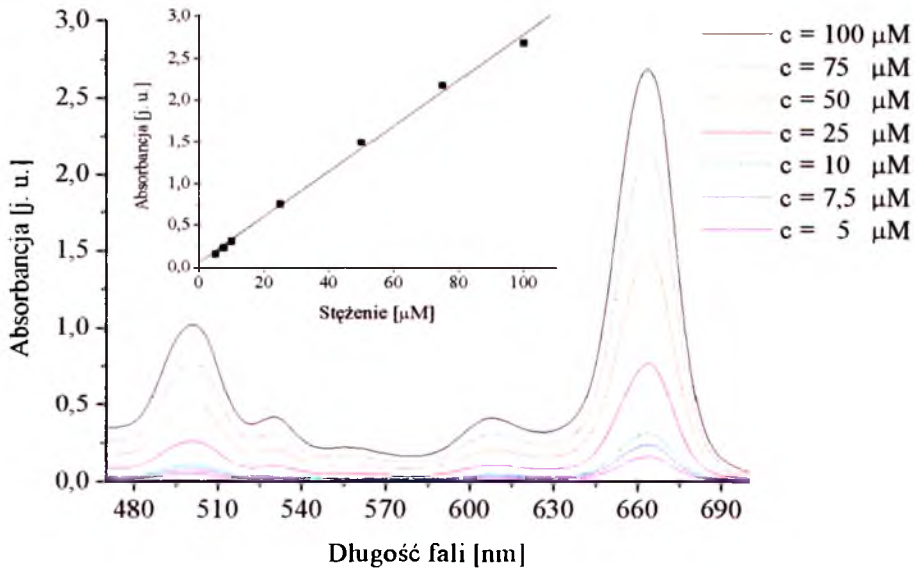
Wykres 4. Graficzna zależność absorpcji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-b w buforze fosforanowym. Wartość absorpcji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 646 \text{ nm}$).



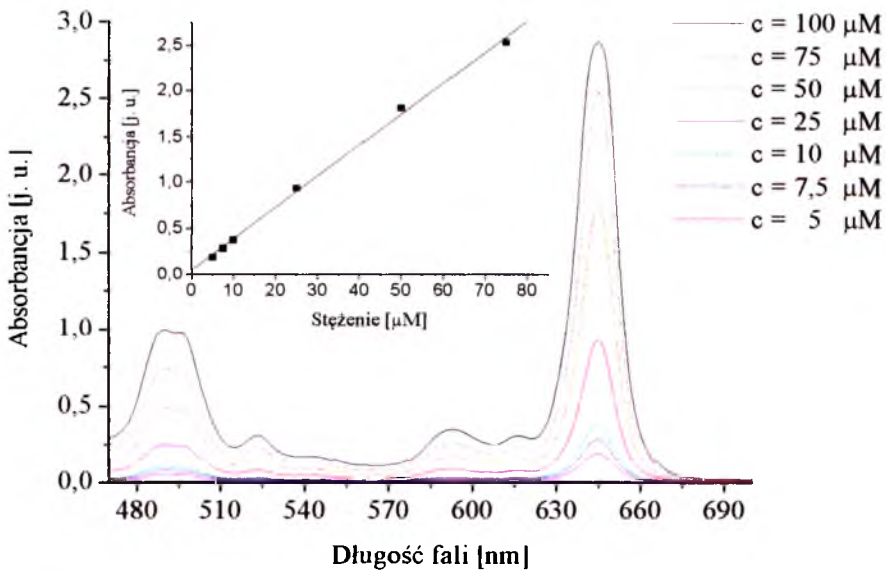
Wykres 5. Graficzna zależność absorpcji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-*c* w DMSO. Wartość absorpcji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 666$ nm).



Wykres 6. Graficzna zależność absorpcji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-*d* w DMSO. Wartość absorpcji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 666$ nm).

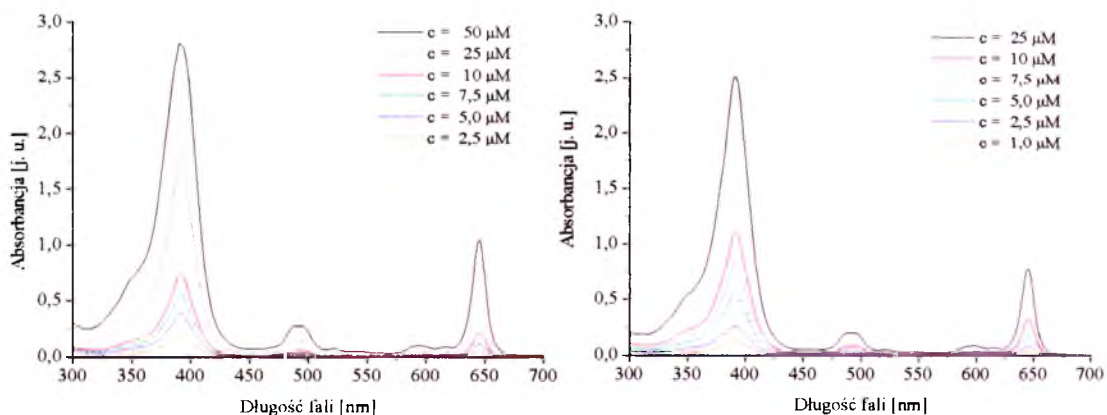


Wykres 7. Graficzna zależność absorbancji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-e w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 664$ nm).



Wykres 8. Graficzna zależność absorbancji od stężenia $A = f(c)$ wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-2 w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 645$ nm).

Zaobserwowana liniowość wskazuje na brak zjawiska agregacji w badanych roztworach. W ten sposób nie można jednak wykluczyć, że agregaty powstały już w pierwszym, najbardziej stężonym roztworze i w trakcie kolejnych rozcieńczeń nie uległy rozpuszczeniu. Aby sprawdzić, czy w badanych roztworach mamy do czynienia z formami monomerycznymi wykorzystano także niejonowy surfaktant, eter polimeru glikolu polietylenowego (PEG) i p-t-oktylofenolu, Triton-X-100. Dodanie do roztworu niewielkiej ilości tej powierzchniowo czynnej substancji sprzyja monomeryzacji molekuł. W przypadku chl-*a* i chl-*b* zaobserwowano zmiany w postaci przesunięcia pasm absorpcji oraz wzrostu ich wysokości. Dodatkowe pasmo pojawiło się przy $\lambda = 616$ nm. Otrzymane widma absorpcji oraz wyznaczone na ich podstawie właściwości absorpcyjne roztworów chl-*a* i chl-*b* w buforze fosforanowym po dodaniu niewielkiej ilości Tritonu-X-100 przedstawiono poniżej.



Wykres 9. Widma absorpcji serii roztworów chl-*a* i chl-*b* w buforze fosforanowym po dodaniu niewielkiej ilości Tritonu-X-100.

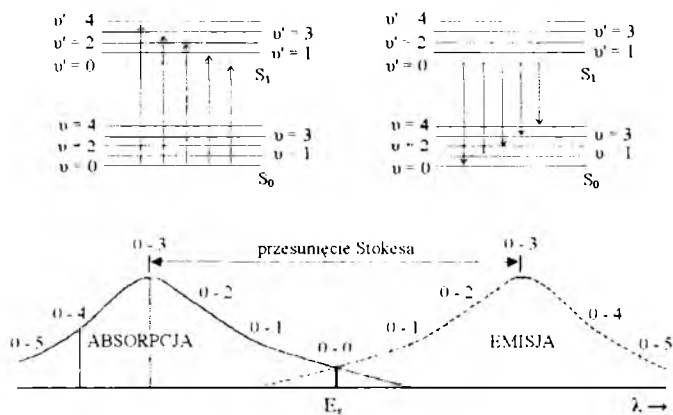
Tabela 10. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl-*a* i chl-*b* w PBS z dodatkiem Tritonu-X-100.

Nazwa fotouczulacza	Położenie pasm absorpcji λ [nm] Molowe współczynniki absorpcji ϵ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]					
	Soret	Q	Q	Q	Q	Q
chl- <i>a</i>	391	489	522	594	616	645
	$7,62 \cdot 10^4$	$5,78 \cdot 10^3$	$1,45 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^3$	$1,65 \cdot 10^3$	$2,20 \cdot 10^4$
chl- <i>b</i>	391	489	522	597	616	645
	$1,08 \cdot 10^5$	$8,31 \cdot 10^3$	$1,98 \cdot 10^3$	$3,47 \cdot 10^3$	$2,56 \cdot 10^3$	$3,23 \cdot 10^4$

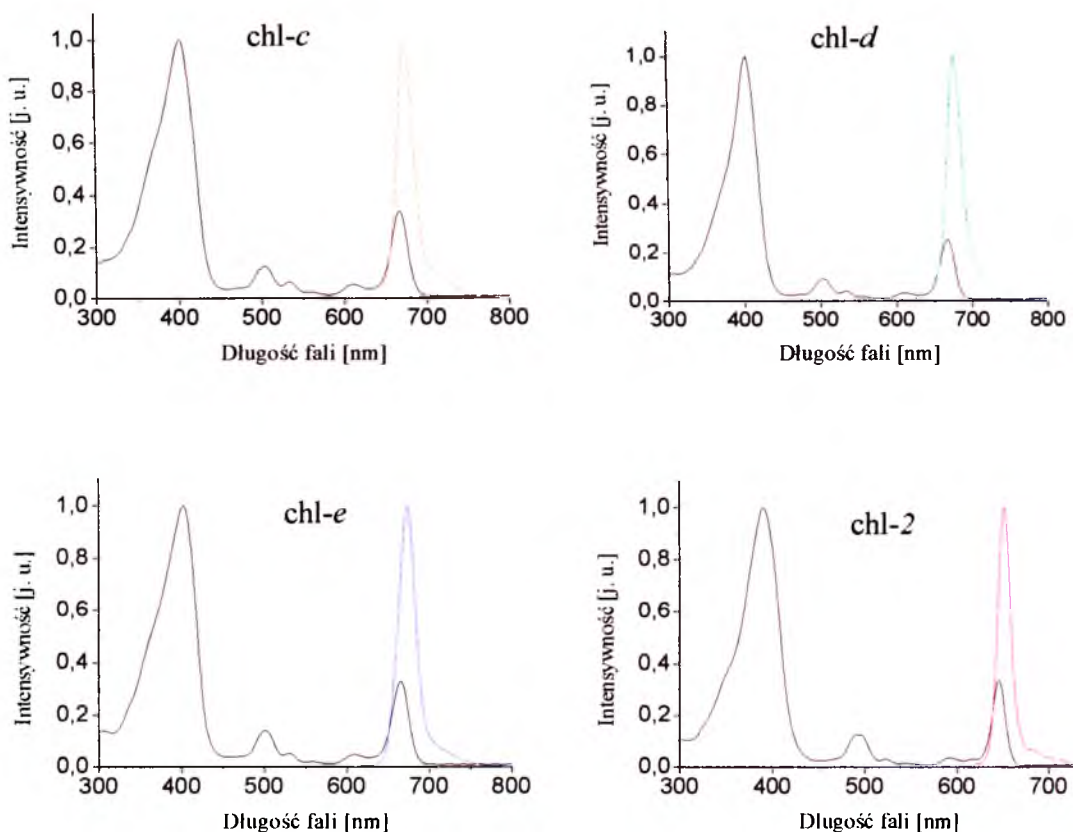
1.2 Własności emisyjne

Aby poznać właściwości emisyjne badanych fotouczulaczy zmierzono ich widma fluorescencji a w dalszym etapie wyznaczono kwantowe wydajności fluorescencji. Wykres 10 przedstawia znormalizowane widma wzbudzenia oraz widma fluorescencji roztworów fotouczulaczy w DMSO zmierzone w temperaturze pokojowej. Obserwowana zgodność zarejestrowanych widm wzbudzenia z prezentowanymi wcześniej widmami absorpcji, świadczy o czystości chemicznej badanych roztworów. Otrzymane widma fluorescencji charakteryzują się obecnością pojedynczego pasma emisji z maksimum przy długości fali 674 nm (dla chl-*c* i chl-*d*) lub 673 nm (chl-*e*). W przypadku chl-2, pochodnej dikarboksyłowej posiadającej łańcuch n-heptyłowy, maksimum emisji przesuwa się w kierunku fal krótszych i jest obserwowane przy $\lambda_{\max} = 650$ nm.

Różnicę położenia maksimum pasma emisji względem maksimum pasma absorpcji o najniższej energii nazywa się przesunięciem Stokesa. Im większa wartość tego przesunięcia, tym większa energia reorganizacji wewnętrznej związanej ze zmianą geometrii cząsteczki podczas przejścia elektronowego (Najbar, 2009). Wyznaczone wartości przesunięcia Stokesa, przedstawione w tabeli 11, świadczą o podobnej geometrii cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym. Dodatkowo w tabeli 11 zamieszczono wartości energii pierwszego stanu singletowego S_1 fotouczulaczy wyznaczone na podstawie przecięcia ostatniego pasma widma absorpcji z widmem emisji (rysunek 23).



Rysunek 23. Schemat poziomów energetycznych oraz widm absorpcji i emisji. Na rysunku zaznaczono w jaki sposób wyznaczono przesunięcie Stokesa oraz energię stanu singletowego S_1 fotouczulacza - E_s .



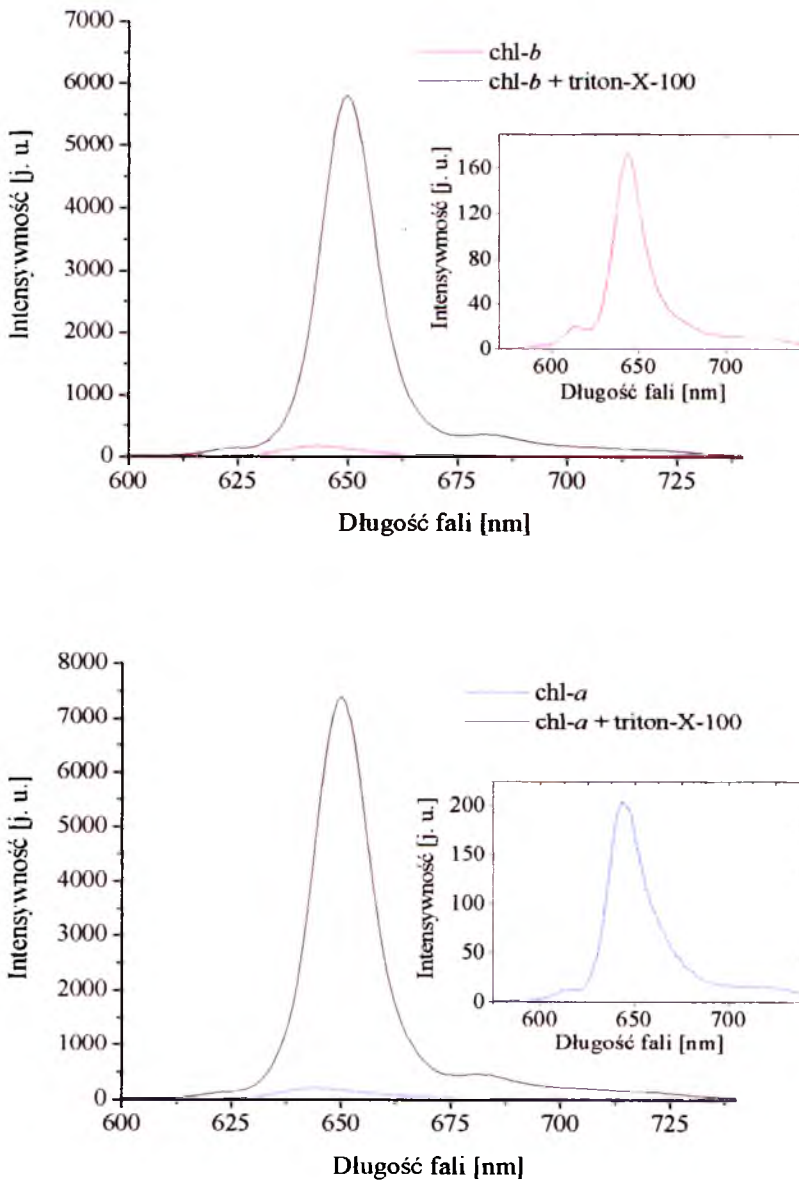
Wykres 10. Znormalizowane widma wzbudzenia i fluorescencji roztworów chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* oraz chl-2 w DMSO.

Tabela 11. Maksimum widma fluorescencji λ_{\max} , wartość przesunięcia Stokesa oraz energia stanu singletowego wyznaczone dla roztworów chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* i chl-2 w DMSO.

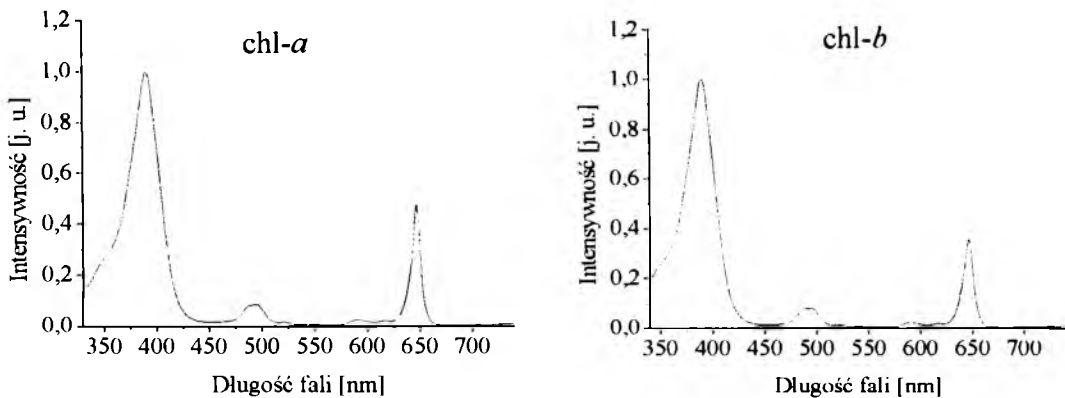
Nazwa związku	Położenie maksimum emisji λ_{\max} [nm]	Przesunięcie Stokesa [nm]	Energia stanu singletowego E_s [kJ · M ⁻¹]
chl- <i>c</i>	674	8,0	182
chl- <i>d</i>	674	8,5	184
chl- <i>e</i>	673	9,5	184
chl-2	650	5,0	188

Dla roztworów fotouczulaczy chl-*a* i chl-*b* w buforze fosforanowym zaobserwowano słabą emisję fluorescencji. Po dodaniu Tritonu-X-100 intensywność fluorescencji znacząco wzrosła, dzięki monomeryzacji powstałych w PBS agregatów cząsteczek fotouczulacza (wykres 11). Widma fluorescencji roztworów fotouczulaczy chl-*a* i chl-*b* w PBS z dodatkiem Tritonu-X-100 charakteryzują się obecnością

pojedynczego pasma emisji z maksimum emisji przy $\lambda_{\max} = 650$ nm. Dla obu fotouczulaczy wartość przesunięcia Stokesa wynosiła 5 nm, natomiast energia stanu singletowego $E_s = 188 \text{ kJ} \cdot \text{M}^{-1}$.



Wykres 11. Porównanie widm fluorescencji roztworów chl-*a* i chl-*b* w buforze fosforanowym przed i po dodaniu Tritonu-X-100.



Wykres 12. Znormalizowane widma wzbudzenia i fluorescencji roztworów chl-*a* i chl-*b* w PBS z dodatkiem Tritonu-X-100.

Amfifilowe związki, posiadające w swej strukturze hydrofilowe (polarne) i lipofilowe (niepolarne) obszary znajdujące się na przeciwległych bokach cząsteczki charakteryzuje tendencja do agregacji w roztworach wodnych. Uważa się, że zagregowane fotouczulacze są mniej aktywne fotochemicznie ze względu na silną bezpromienistą dezaktywację stanów wzbudzonych, co skraca czas życia fotouczulacza w stanie trypletowym, istotnym w trakcie reakcji fotochemicznych. Nie jest jednak wykluczone, że w środowisku komórkowym podczas przechodzenia przez błony biologiczne, fotouczulacz może powrócić do aktywnej fotochemicznie formy monomerycznej. Kelbauskas i Dietel badali agregację fotouczulaczy, w tym pochodnych chloryny e6, do których przyłączono łańcuchy alkilowe o różnej długości. Lipofilowość tych związków zwiększała się wraz ze wzrostem długości podstawionych łańcuchów. Stwierdzono, że wszystkie badane fotouczulacze ulegały agregacji w roztworach wodnych. Autorzy pokazali, że mimo to związki skutecznie wnikały do wnętrza komórek, najprawdopodobniej na drodze endocytozy. Ich monomeryzacja we wnętrzu komórek silnie zależała od stopnia lipofilowości fotouczulacza - im bardziej lipofilowy był związek, tym stopień jego monomeryzacji we wnętrzu komórek była mniejszy (Kelbauskas, 2002). Agregacja fotouczulaczy zależy od różnych czynników, rodzaju rozpuszczalnika, stężenia próbki, temperatury, rodzaju oddziaływań ze strukturami biologicznymi (Uchoa, 2011). Jednym ze sposobów ograniczenia agregacji jest zastosowanie emulsji lub polimerowych preparatów (Rossetti, 2011), (Rodriguez, 2003). Przykładem może być fotouczulacz o nazwie Fotolon, będący kompleksem chloryny e6 i polimeru PVP. Isakau i wsp. w swych badaniach potwierdzili, że

zastosowany polimer zapobiega agregacji fotouczulacza przy niższym pH, czym potencjalnie może zwiększać aktywność preparatu (Isakau, 2008). Aby skutecznie kontrolować agregację w środowisku wewnątrzkomórkowym wykorzystuje się fotouczulacze, których budowa chemiczna uniemożliwia tworzenie agregatów. W tym celu stosuje się duże, nieporęczne podstawniki, które mają przeszkadzać sterycznie i zapobiegać oddziaływaniom między pierścieniami. Uchoa i wsp. zaproponowali chloryny podstawione maleimidami. Ta osiowo podstawiona grupa organiczna i stosunkowo mały rdzeń związku tworzące kształt litery „L” całkowicie uniemożliwiają tworzenie agregatów, nawet w wysokich stężeniach fotouczulacza. W przypadku pochodnych ftalocyjanin lub naftalocyjanin aby ochronić je przed agregacją często stosuje się grupę tert-butyłową (Uchoa, 2011). Zupełnie innym rozwiązaniem jest zastosowanie różnego rodzaju nośników np. liposomów lub nanocząsteczek, które pozwolą na utrzymanie fotouczulacza w stanie monomerycznym.

Aby sprawdzić, czy badane fotouczulacze nie agregują w środowisku wewnątrzkomórkowym należałoby przeprowadzić rozdzielcze w czasie pomiary fluorescencji np. przy pomocy rozdzielczej w czasie mikroskopii fluorescencyjnej. Analiza kinetyki zaniku fluorescencji pozwoliłaby na rozróżnienie form zagregowanych od monomerycznych, które charakteryzują się większą kwantową wydajnością fluorescencji. Czasy życia fluorescencji agregatów, ze względu na silne bezpromieniste wygaszanie najniższego stanu wzbudzonego fotouczulacza, będą dużo krótsze niż przy braku agregacji.

1.3 Kwantowa wydajność fluorescencji

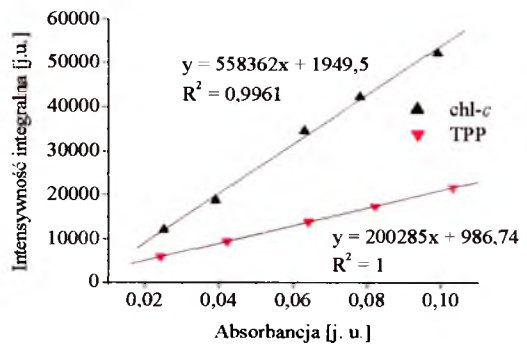
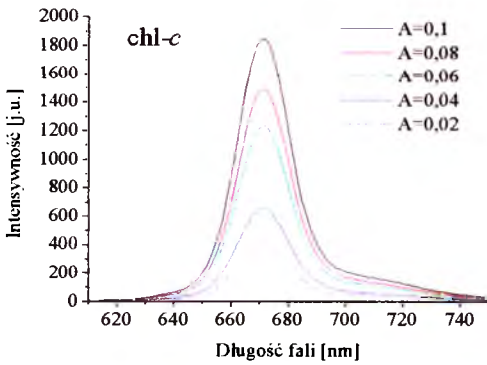
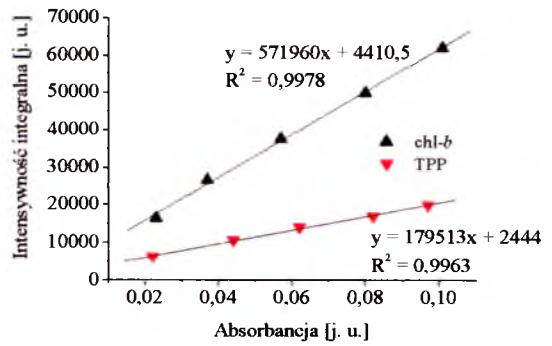
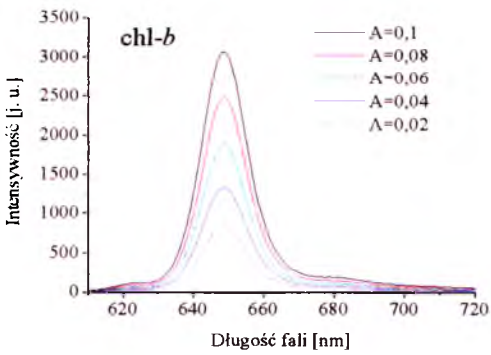
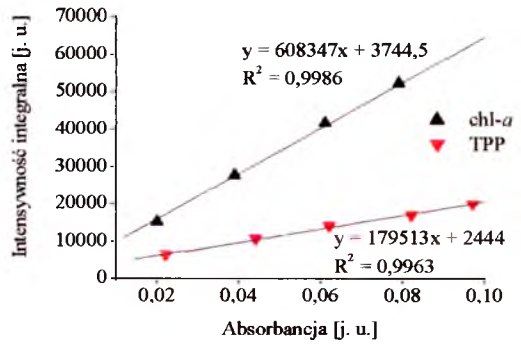
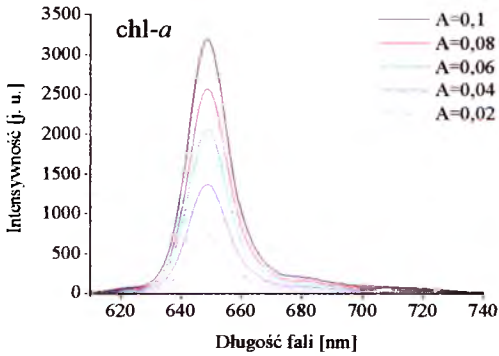
Kolejnym etapem badań było wyznaczenie kwantowej wydajności fluorescencji dla roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu. Parametr ten decyduje o użyteczności związków w diagnostyce fotodynamicznej, polegającej na uwidocznieniu zmiany nowotworowej poprzez wzbudzenie fluorescencji fotouczulacza zgromadzonego w tkance nowotworowej. Fotouczulacze nie powinny charakteryzować się wysoką kwantową wydajnością fluorescencji, ponieważ zbyt wydajny proces emisji promieniowania ogranicza ilość energii przekazywanej na wytworzenie tlenu singletowego i tym samym wpływa na skuteczność terapeutyczną związku (wynika to z następującej zależności $\Phi_f + \Phi_T \leq 1$).

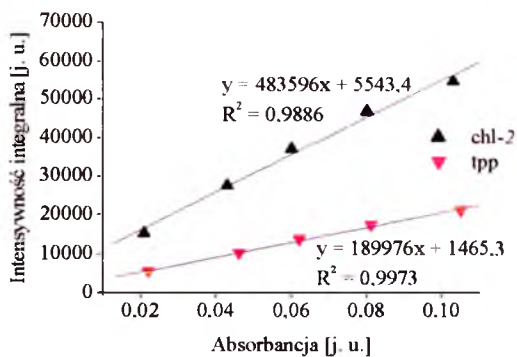
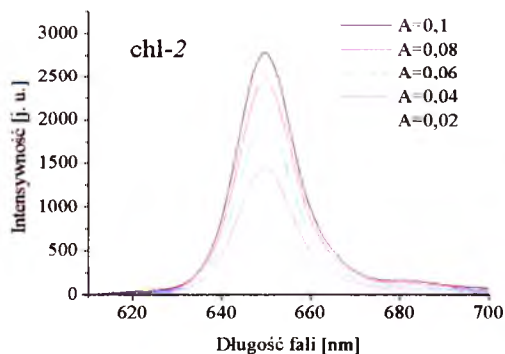
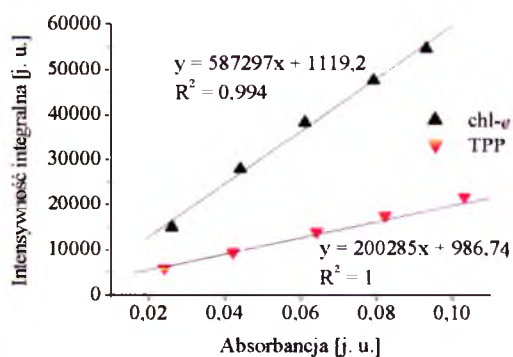
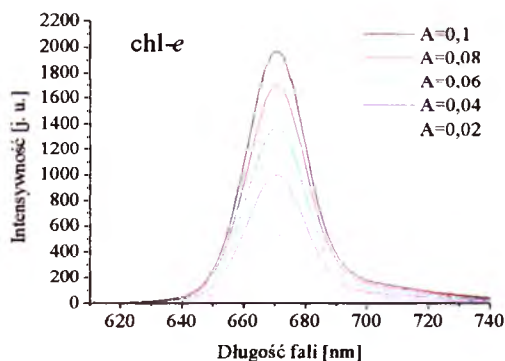
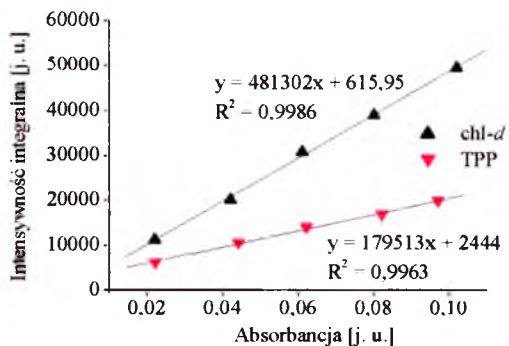
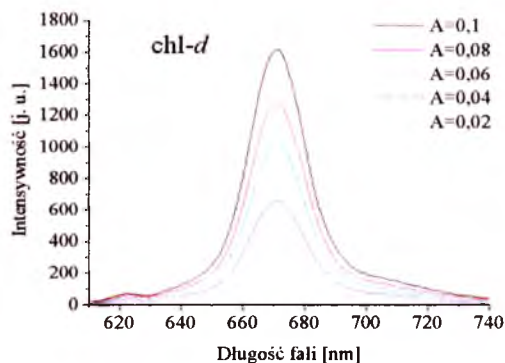
Kwantową wydajność fluorescencji wyznaczono metodą porównawczą, zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 2.1.3. Jako wzorzec zastosowano tetrafenylporfiryne (TPP). Na wykresie 16 przedstawiono zarejestrowane widma fluorescencji serii roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu oraz liniowe zależności integralnej intensywności emisji od wartości absorbancji odczytanej dla długości fali promieniowania wzbudzającego ($\lambda = 400$ nm), które posłużyły do wyznaczenia kwantowych wydajności fluorescencji badanych fotouczulaczy. Otrzymane wartości Φ_f przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Wartości kwantowej wydajności fluorescencji Φ_f wyznaczone dla roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu w stosunku do TPP

Nazwa związku	Maksimum emisji fluorescencji λ_{\max} [nm]	Kwantowa wydajność fluorescencji Φ_f
chl- <i>a</i>	649	0,31
chl- <i>b</i>	649	0,29
chl- <i>c</i>	672	0,25
chl- <i>d</i>	672	0,24
chl- <i>e</i>	672	0,27
chl-2	650	0,23

Wszystkie proponowane fotouczulacze charakteryzowały się umiarkowanymi wartościami kwantowej wydajności fluorescencji, które mieściły się w zakresie $0,23 \div 0,31$. Pozwala to na ich potencjalne wykorzystanie w diagnostyce fotodynamicznej. Jednocześnie uzyskany wynik nie wyklucza wydajnego generowania tlenu singletowego i/lub wolnych rodników przez badane związki.

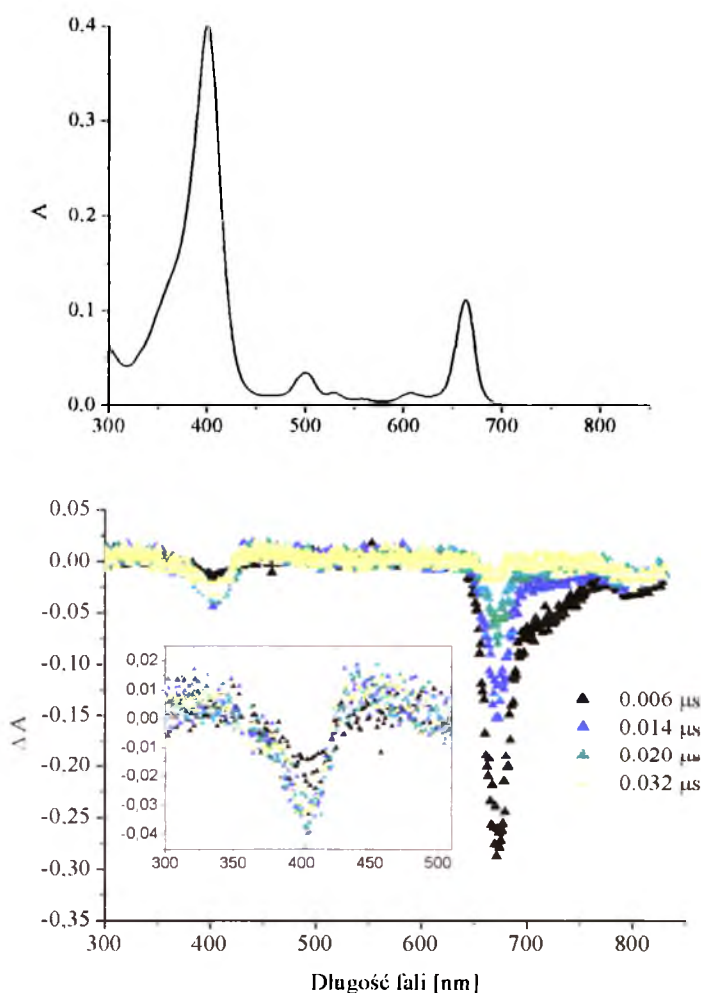




Wykres 13. Widma fluorescencji serii roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu (długość fali wzbudzenia $\lambda = 400$ nm) oraz wyznaczone na ich podstawie zależności intensywności integralnej od wartości absorancji

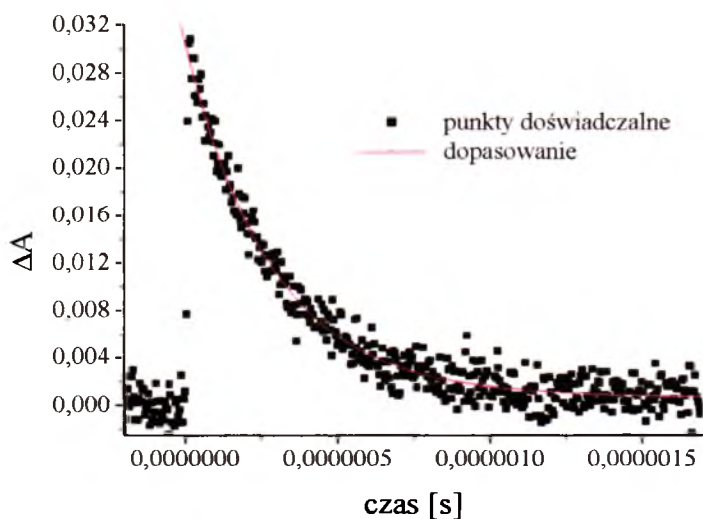
1.4 Wyznaczanie czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym

Zdolność fotouczulacza do generowania tlenu singletowego zależy od własności ich stanu trypletowego (m. in. energii oraz czasu życia). Aby wyznaczyć średni czas życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym wykorzystano technikę laserowej fotolizy błyskowej. Pomiary rozpoczęto od zarejestrowania widm, w celu określenia długości fali przy której obserwowana jest absorpcja między stanami trypletowymi. Na wykresie 14 przedstawiono widmo absorpcji przejściowej jednej z badanych pochodnych chloryny. Wszystkie badane związki posiadały podobne widma, charakteryzujące się obecnością pasma absorpcji tryplet-tryplet przy ok. 450 nm oraz obecnością ujemnych obszarów związanych z przejściami między stanami singletowym fotouczulacza.



Wykres 14. Widmo absorpcji UV-VIS oraz widmo absorpcji przejściowej tryplet-tryplet roztworu chl-e w etanolu zarejestrowane po różnych czasach od zadziałania wzbudzającego impulsu laserowego ($\lambda = 355$ nm).

W kolejnym etapie badań wykonano pomiary średniego czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym. Przykładową krzywą kinetycznego zaniku stanu trypletowego zarejestrowaną w warunkach tlenowych (za takie uznano warunki równowagi z otoczeniem) przedstawiono na wykresie 15. Krzywa ta ilustruje zachodzący po wzbudzeniu proces zmniejszania się populacji cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym.



Wykres 15. Przykładowa krzywa kinetycznego zaniku stanu trypletowego zmierzona dla roztworu chl-*a* w etanolu w warunkach tlenowych. Próbkę wzbudzono promieniowaniem o długości fali 355 nm. Długość fali detekcji wynosiła 450 nm. Zapis kinetyczny został uśredniony z 10 pomiarów.

Można zaobserwować, że zanik ma charakter wykładniczy i może być opisany równaniem kinetycznym dla reakcji pierwszego rzędu. Produkty przejściowe obserwowane przy pomocy techniki laserowej fotolizy błyskowej to najczęściej stany wzbudzone lub wolne rodniki. Gdy obserwowane krzywe kinetyczne przebiegają według kinetyki pierwszego rzędu to wskazują na stany wzbudzone, natomiast kinetyka reakcji rzędu drugiego zwykle wskazuje na wolne rodniki, choć obserwowanych jest wiele wyjątków od powyższej reguły (Bensasson, 1993). Średni czas życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym τ_T wyznaczono z parametrów dopasowania, jako odwrotność stałej szybkości reakcji charakteryzującej badany proces:

$$y = a \cdot \exp(-kx) + c$$

$$\tau_T = \frac{1}{k}$$

Badając kinetykę wygaszania stanu trypletowego w obecności tlenu o znanym stężeniu oraz kinetykę zaniku w warunkach beztlenowych możliwe jest wyznaczenie stałej wygaszania z kinetycznej zależności Sterna-Volmera (Najbar, 2009):

$$k_q = \left(\frac{1}{\tau_T} - \frac{1}{\tau_{T(N_2)}} \right) \cdot \frac{1}{[O_2]}$$

gdzie:

- k_q - stała wygaszania przez tlen molekularny [$M^{-1} \cdot s^{-1}$],
- τ_T - średni czas życia w stanie trypletowym w układzie zawierającym tlen [s],
- $\tau_{T(N_2)}$ - średni czas życia stanu trypletowego w układzie pozbawionym tlenu [s],
- $[O_2]$ - stężenie tlenu w układzie przed jego usunięciem [M].

Stężenie tlenu molekularnego w wykorzystanym rozpuszczalniku (etanol, 20°C) wynosi $[O_2] = 1,8 \cdot 10^{-3}$ M (Silva, 2010). Wartości średniego czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym dla badanych fotouczulaczy przedstawiono w tabeli 13. Można zaobserwować, że czasy życia stanu trypletowego zmierzone w warunkach tlenowych i po odtlenowaniu roztworów znacznie się różnią, co potwierdza udział tlenu w badanym procesie, jako aktywnego wygaszacza stanu trypletowego. Proces wygaszania stanu trypletowego przez tlen ma charakter dynamiczny i zachodzi w procesie zderzania wzbudzonej cząsteczki z cząsteczką tlenu (Najbar, 2009).

Oprócz badanych pochodnych chloryny w trakcie pomiarów wyznaczono czas życia w stanie trypletowym dla tetrafenyloporfiryny (TPP), której własności zostały dokładnie omówione w literaturze. Wyznaczony czas życia w warunkach tlenowych $\tau_T = 0,36 \mu s$ pokrywa się z danymi literaturowymi. Silva i in. uzyskali identyczny wynik dla roztworu TPP w etanolu. Natomiast po odtlenowaniu roztworu, autorzy uzyskali wynik o rząd wielkości większy tj. $\tau_{T(N_2)} = 43 \mu s$ i podobne różnice dotyczyły stałej wygaszania (Silva, 2010). Obserwowane rozbieżności wytłumaczyć można nieuszczelnnością układu dedykowanego odtlenowywaniu roztworów, który w przyszłości wymagałby dopracowania. Dla badanych pochodnych chloryny uzyskane wartości średniego czasu życia w stanie trypletowym w obecności tlenu, w warunkach równowagi z otoczeniem mieściły się w zakresie od 0,23 μs do 0,31 μs , a po odtlenowaniu były rzędu mikrosekund (1,01 μs ÷ 2,09 μs). Najdłuższy czas życia τ_T

w warunkach tlenowych charakteryzował chl-*b*, natomiast po odtlenowaniu chl-*e*. Uzyskane wyniki można porównać do literaturowych wartości charakteryzujących chlorynę e6. Czas życia chloryny e6 w etanolu w obecności tlenu wynosi 0,29 μs (Zenkevich, 1996), a zatem jest zbliżony do wartości uzyskanych dla badanych fotouczulaczy. Isakau i in. określili własności chloryny e6 w wodnym roztworze. W zależności od pH oszacowali, że czas życia fotouczulacza w stanie trypletowym w obecności tlenu wynosi od 1,8 do 2,1 μs , a po odtlenowaniu wzrasta do około 200 μs (Isakau, 2008). Natomiast Mennenga i in. wyznaczyli, że czas życia nasyconego argonem roztworu chloryny e6 w etanolu nie jest dłuższy od 30 μs , natomiast w buforze fosforanowym wzrasta do 100 μs (Mennenga, 2006), (Zhang, 2009).

Tabela 13. Wartości średniego czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym w warunkach tlenowych oraz zbliżonych do beztlenowych dla roztworów badanych fotouczulaczy i TPP w etanolu. W tabeli przedstawiono także wartości stałej wygaszania stanu trypletowego przez tlen molekularny wyznaczonej z równania Sterna-Volmera.

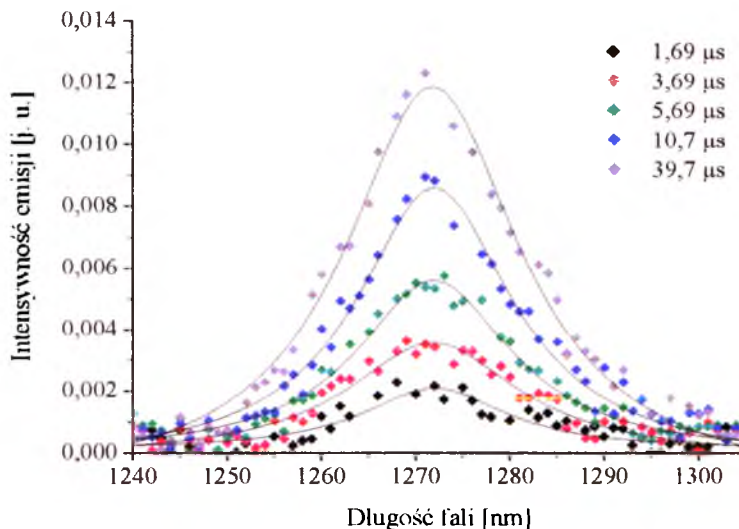
fotouczulacz	warunki tlenowe τ_T [μs]	warunki zbliżone do beztlenowych $\tau_{T(N_2)}$ [μs]	stała wygaszania k_q [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
TPP	$0,36 \pm 0,01$	$3,25 \pm 4,76$	$1,19 \cdot 10^8$
chl- <i>a</i>	$0,28 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,11$	$1,41 \cdot 10^8$
chl- <i>b</i>	$0,31 \pm 0,01$	$1,77 \pm 0,64$	$1,28 \cdot 10^8$
chl- <i>c</i>	$0,27 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$	$1,34 \cdot 10^8$
chl- <i>d</i>	$0,24 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,07$	$1,50 \cdot 10^8$
chl- <i>e</i>	$0,23 \pm 0,01$	$2,09 \pm 0,29$	$1,88 \cdot 10^8$
chl-2	$0,25 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,05$	$1,47 \cdot 10^8$

1.5 Kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego

Bardzo ważnym etapem charakterystyki potencjalnych fotouczulaczy jest określenie ich kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego Φ_Δ . W tym celu wykorzystano porównawczą metodę pomiarową opartą na rejestracji fosforescencji tlenu singletowego przy różnych energiach promieniowania wzbudzającego. Czas życia tlenu singletowego w etanolu jest relatywnie długi i wynosi 15,2 μs , co sprzyja detekcji jego fosforescencji (Silva, 2010). Metoda porównawcza wymaga zastosowania wzorca

o znanej wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego. W tym celu wykorzystano fenalenon, dla którego w etanolu $\Phi_{\Delta} = 0,95$ (Schmidt, 1994).

Aby określić długość fali przy której następuje maksymalna emisja, zmierzono widma fosforescencji tlenu singletowego. Przykładowe widmo przedstawiono na wykresie 16. Maksimum emisji fosforescencji zaobserwowano przy $\lambda = 1271$ nm.



Wykres 16. Widma fosforescencji tlenu singletowego dla roztworu związku referencyjnego (fenalenonu) w etanolu zarejestrowane po różnych czasach od zadziałania laserowego impulsu wzbudzającego ($\lambda = 355$ nm).

Kolejnym etapem badań była rejestracja krzywych kinetycznych obrazujących zanik fosforescencji tlenu singletowego przy różnych energiach impulsu wzbudzającego. Przykładową krzywą kinetyczną przedstawiono na wykresie 26. Do uzyskanych punktów pomiarowych dopasowywano funkcje eksponencjalne i po ekstrapolacji do $t = 0$ odczytywano początkową intensywność emisji I_0 . Wykreślone zależności początkowej intensywności emisji od względnej energii impulsu wzbudzającego dla wszystkich badanych fotouczulaczy przedstawiono na wykresach 18 - 23. Do uzyskanych punktów doświadczalnych dopasowano funkcje $y = ax + b$ ograniczając dopasowanie do liniowego zakresu wykreślonej zależności. Obserwowana nieliniowość przy wyższych energiach promieniowania wzbudzającego związana jest najprawdopodobniej z wyczerpaniem cząsteczek w stanie podstawowym (Dąbrowski, 2009). Z parametrów dopasowania, zgodnie z opisem z rozdziału 2.2.2, wyznaczono wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego. Otrzymane wyniki

przedstawiono w tabeli 14. W celu walidacji metody pomiaru dodatkowo zmierzono roztwór tetrafenylporfiryny (TPP) w toluenie. Właściwości TPP są dobrze poznane i dokładnie omówione w literaturze. Wyznaczona wartość kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego, obliczona w stosunku do fenalenonu, wynosiła 0,66. Otrzymany wynik był zgodny z wartością cytowaną przez Redmonda ($\Phi_{\Delta} = 0,68$ (Redmond, 1999)). Również wyznaczony czas życia tlenu singletowego w toluenie - 30,6 μs był zgodny z wartościami literaturowymi (Bensasson, 1993).

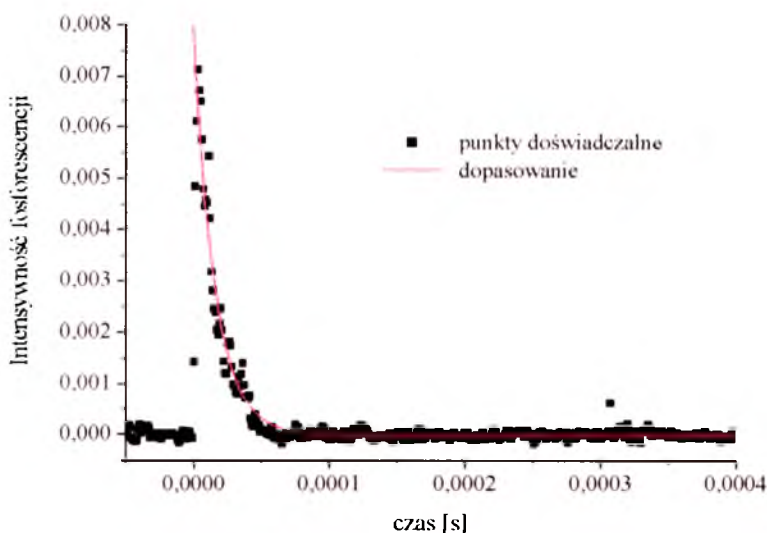
Tabela 14. Wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego badanych pochodnych chloryny wyznaczone w etanolu w stosunku do fenalenonu

fotouczulacz	kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego Φ_{Δ}
chl- <i>a</i>	0,66
chl- <i>b</i>	0,73
chl- <i>c</i>	0,63
chl- <i>d</i>	0,56
chl- <i>e</i>	0,66
chl-2	0,64

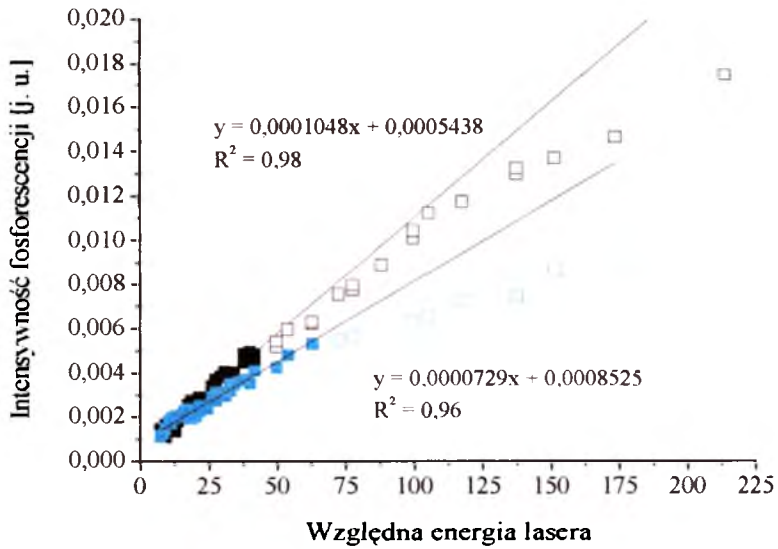
Wszystkie badane fotouczulacze charakteryzowały się stosunkowo wysokimi kwantowymi wydajnościami generowania tlenu singletowego przekraczającymi 50%. Najwyższą wartość ($\Phi_{\Delta} = 0,73$) uzyskano dla chl-*b*, natomiast najniższą ($\Phi_{\Delta} = 0,56$) dla chl-*d*. Zmierzone wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego spełniały następującą zależność chl-*b* > chl-*a* i chl-*e* > chl-2 > chl-*c* > chl-*d*.

Fotouczulacze wykorzystywane obecnie w terapii fotodynamicznej posiadają kwantowe wydajności generowania tlenu singletowego z zakresu 0,3 ÷ 0,8 (Lang, 2004). Proponowane chloryny generują tlen singletowy z wydajnością porównywalną do chloryny e6, która w etanolu posiada kwantową wydajność generowania tlenu singletowego równą 0,65 (Zenkevich, 1996), (Redmond, 1999). Parkhats i wsp. zbadali zdolność do produkowania tlenu singletowego przez chlorynę e6 w buforze fosforanowym i porównali ją do wyników uzyskanych dla kompleksu chloryny e6 z polimerem PVP. Autorzy wykazali, że wraz ze spadkiem wartości pH (od pH = 8,5 do pH = 6,3) kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego chloryny e6 zmniejszała się od $\Phi_{\Delta} = 0,67$ do $\Phi_{\Delta} = 0,50$. Zastosowanie polimeru PVP, który sprzyja monomeryzacji, zwiększyło kwantową wydajność generowania tlenu singletowego.

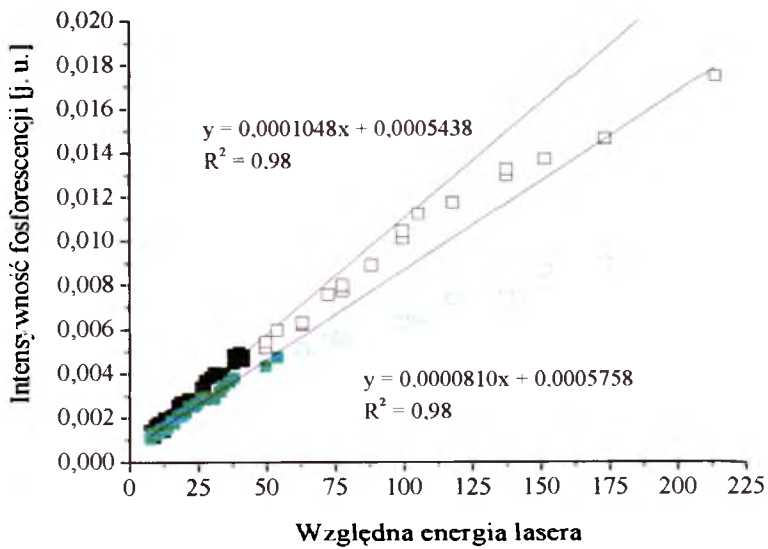
Autorzy zaobserwowali, że przy $\text{pH} = 6,3$ wartość Φ_{Δ} wzrastała do 0,72 (Parkhats, 2009). Oprócz agregacji wiele innych czynników decyduje o wydajności procesu generowania tlenu singletowego. Zaliczamy do nich rodzaj stosowanego rozpuszczalnika, własności stanu trypletowego fotouczulacza, w tym jego energię i czas życia, wydajność procesu transferu energii między wzbudzonym fotouczulaczem, a cząsteczką tlenu (Nyokong, 2012). Również rodzaj przyłączonych podstawników, obecność centralnie podstawionych jonów metali lub osiowo podstawionych ligandów wpływa na wydajność z jaką fotouczulacze generują tlen singletowy. Dla proponowanych chloryn nie zaobserwowano wyraźnego wpływu przyłączonych reszt cukrowych na wartość Φ_{Δ} . W przypadku związków posiadających łańcuch n-heptylowy, pochodne cukrowe wydajniej generowały tlen singletowy. Natomiast w przypadku pochodnych chloryny e6, było odwrotnie i to chl-e charakteryzowała się wyższą wartością Φ_{Δ} niż jej cukrowe pochodne. Taki sam wniosek wyciągnął ze swych badań Bautista-Sanchez i wsp., którzy porównywali własności fotofizyczne temoporfiny (m-THPC) i jej glukozowych pochodnych. Autorzy zaobserwowali, że zastosowane podstawniki cukrowe nie wpływają na zmianę właściwości fotofizycznych temoporfiny, takich jak czas życia stanu trypletowego lub kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego (Bautista-Sanchez, 2005), (Senge, 2012).



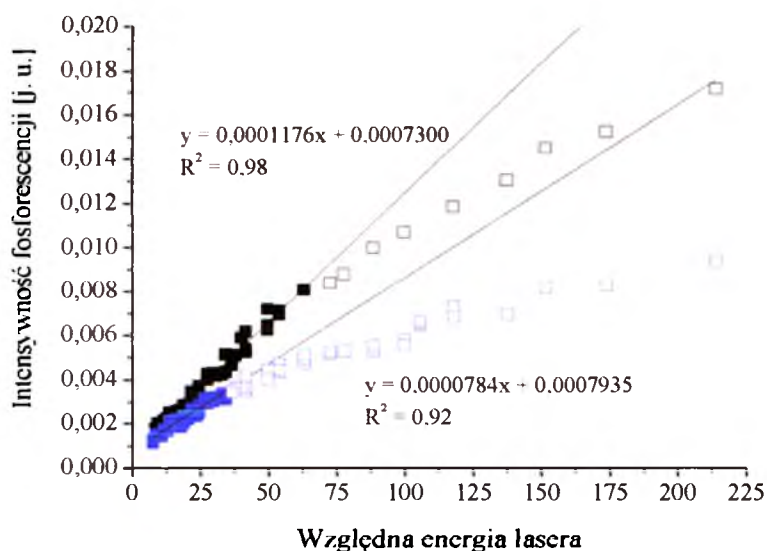
Wykres 17. Przykładowa krzywa kinetyczna obrazująca zanik fosforescencji tlenu singletowego zarejestrowana w temperaturze pokojowej dla roztworu chl-2 w etanolu. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm. Detekcja przy $\lambda = 1271$ nm.



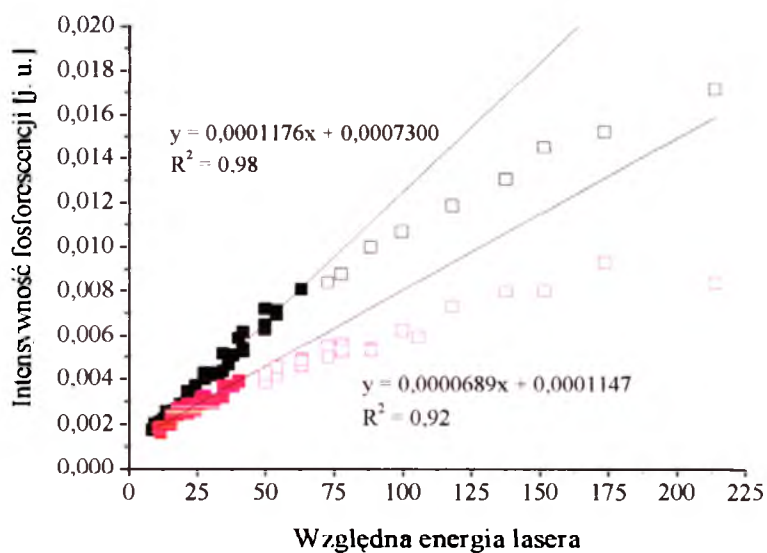
Wykres 18. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-*a* (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.



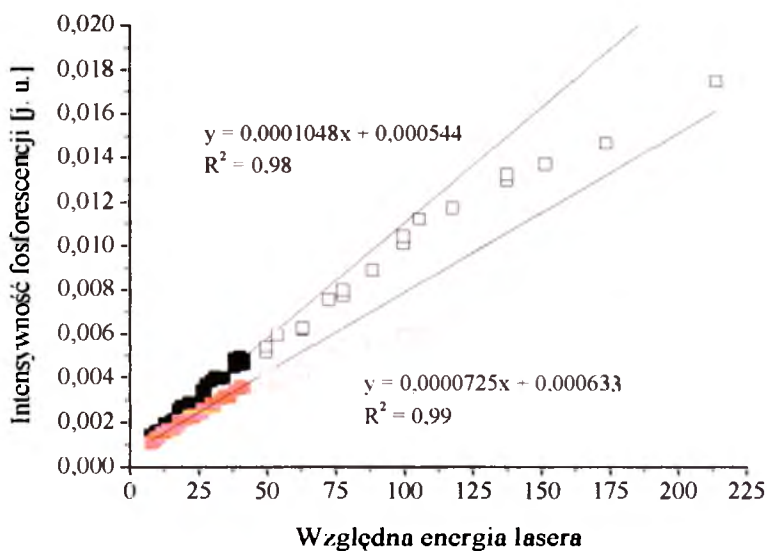
Wykres 19. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-*b* (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.



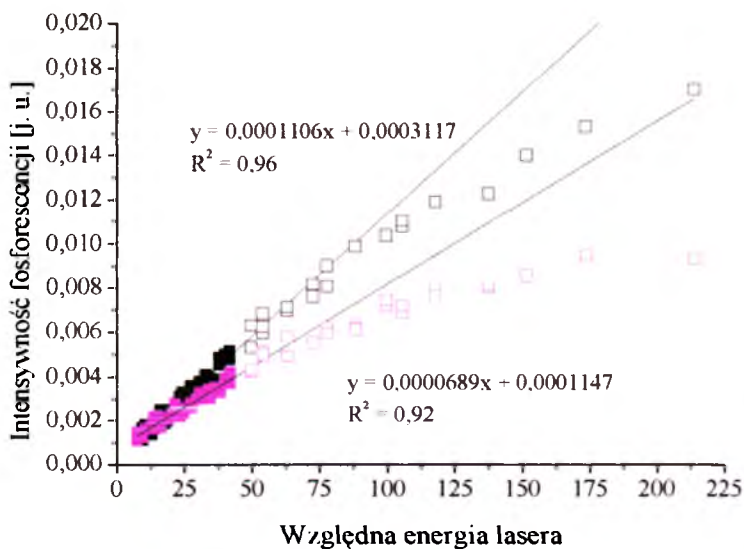
Wykres 20. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-c (■/) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.



Wykres 21. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-d (■/) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.



Wykres 22. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-e (/) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.

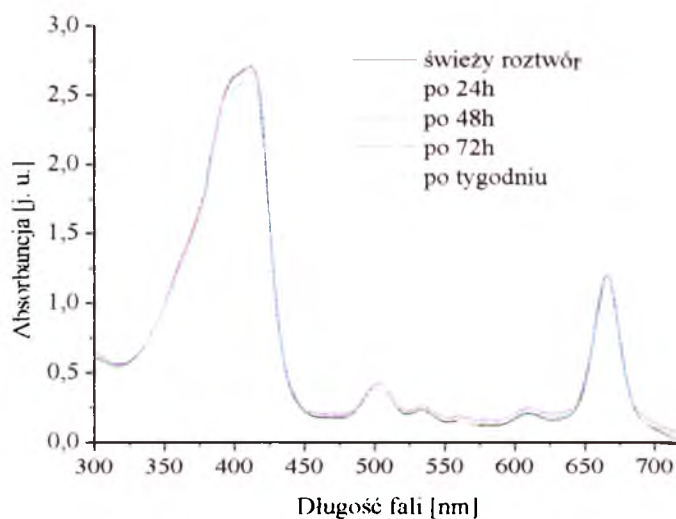


Wykres 23. Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-2 (■/) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.

1.6 Fotostabilność fotouczulaczy

Większość fotouczulaczy wykorzystywanych w terapii fotodynamicznej pod wpływem światła ulega degradacji. Wiedza na temat procesów fotochemicznych zachodzących w trakcie naświetlania jest istotna, ponieważ przekłada się na skuteczność terapeutyczną potencjalnego leku. Nie bez znaczenia jest wpływ procesu fotowybielenia na dozymetrię kliniczną i dobór optymalnego stężenia fotouczulacza i dawki światła (Hongying, 1999), (Rotomskis, 1997). Samo zjawisko fotowybielenia może mieć zarówno pozytywny, jak i negatywny charakter. Z jednej strony, gdy proces ten zachodzi zbyt szybko to uniemożliwia kompletne zniszczenie guza. Z drugiej strony powoduje redukcję ilości fotouczulacza w otaczających nowotwór zdrowych tkankach, skracając czas nadwrażliwości tych tkanek na światło (Hongying, 1999), (Das, 2005).

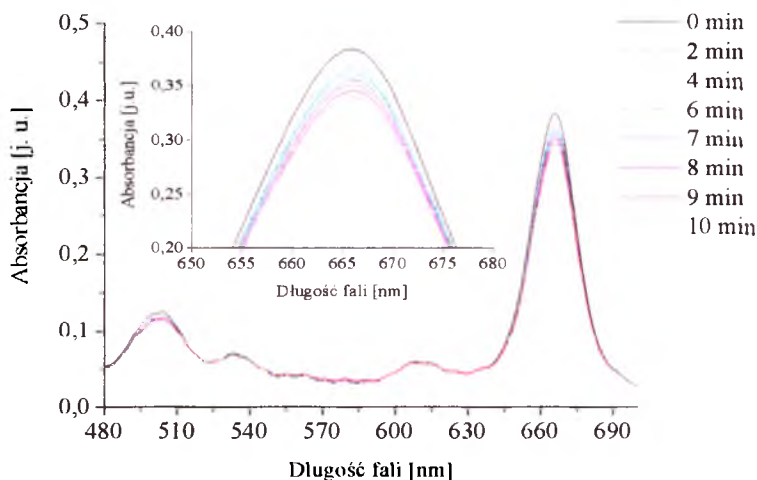
Potencjalny fotouczulacz powinien charakteryzować się stabilnością w ciemności oraz podczas naświetlania. Na wykresie 24 pokazano widma absorpcji jednej z badanych chloryn zarejestrowane po różnym czasie od przygotowania roztworu, gdy roztwór przechowywany był w ciemności. Jedyne nieznaczne zmiany w widmie, w postaci zmniejszonej intensywności pasm zaobserwowano po tygodniu od przygotowania roztworu.



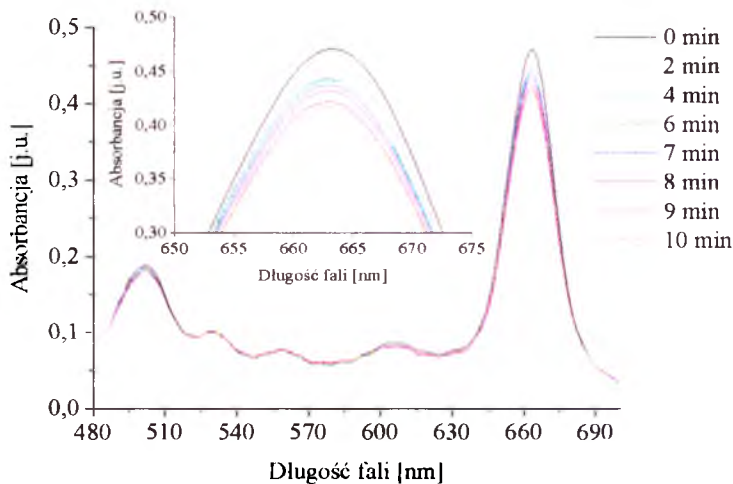
Wykres 24. Badanie stabilności roztworu chl-c w DMSO ($c = 50 \mu\text{M}$) w ciemności. Widma absorpcji zmierzono dla świeżego roztworu oraz po 24 h, 48 h, 72 h oraz po tygodniu od przygotowania roztworu.

Aby sprawdzić fotostabilność proponowanych chloryn w warunkach prowadzonych eksperymentów biologicznych, przeprowadzono pomiar widm absorpcji

roztworów fotouczulaczy przed i po naświetleniu światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową o różnych dawkach. Szczególną uwagę poświęcono pomiarom przy dawce 20 J/cm^2 , którą stosowano podczas badania fototoksyczności pochodnych chloryny. Stosunek absorbancji odczytanej dla ostatniego pasma Q po naświetleniu do wartości sprzed naświetlenia, wyrażony w procentach, uznano za miarę fotostabilności związków. Na wykresach 25 - 28 przedstawiono przykładowe widma absorpcji zarejestrowane po różnym czasie naświetlenia roztworów badanych fotouczulaczy.

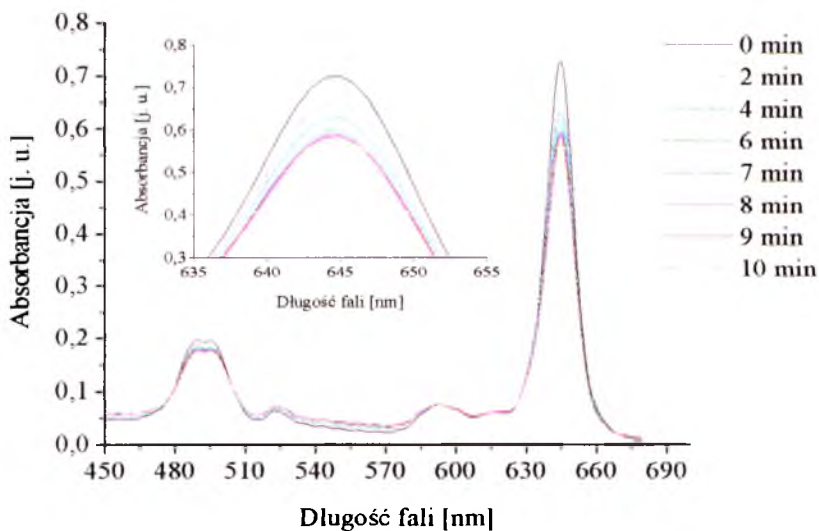


Wykres 25. Widmo absorpcji roztworu chl-c w DMSO ($c = 20 \mu\text{M}$) zarejestrowane po różnych czasach naświetlenia światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).

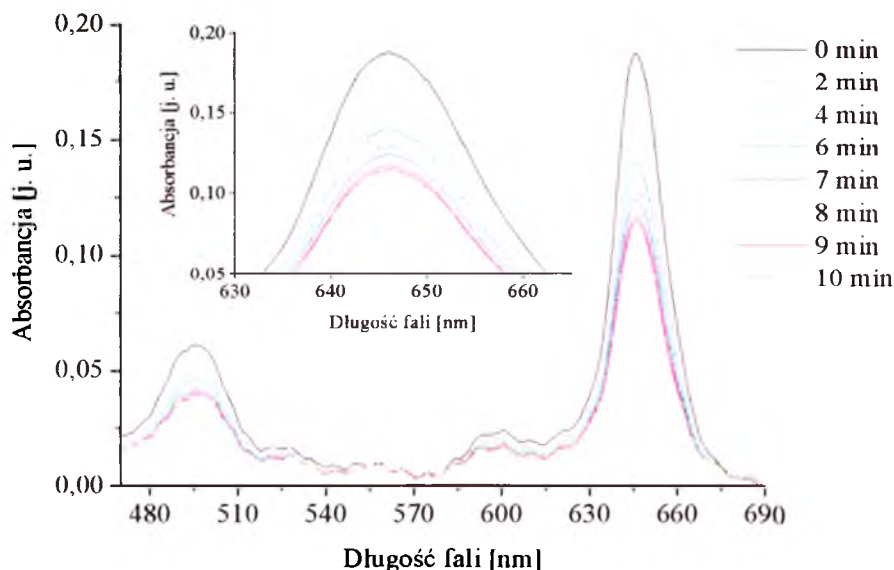


Wykres 26. Widmo absorpcji roztworu chl-e ($c = 20 \mu\text{M}$) w DMSO zarejestrowane po różnych czasach naświetlenia światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).

Pod wpływem światła może dojść do zmian w strukturze chemicznej fotouczulaczy, które uwidaczniają się w postaci zmian intensywności pasm absorpcji i/lub emisji (fotomodifikacja) lub zaniku pasm, w konsekwencji rozpadu cząsteczki fotouczulacza podczas naświetlania (właściwe fotowycielenie). W przypadku badanych fotouczulaczy można zaobserwować, że zmiany w widmie absorpcji wywołane naświetleniem obejmowały jedynie zmianę intensywności pasm. Nie zaobserwowano natomiast zaniku pasm istniejących przed naświetleniem, czy też pojawienia się nowych wskazujących na powstanie fotoproduktów. Dla większości chloryn tj. chl-*b*, chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* zmiany kształtu widma po naświetleniu były nieznaczne. W warunkach eksperymentów biologicznych (tj. dla dawki 20 J/cm^2) spadek intensywności ostatniego pasma Q nie przekraczał 12%. Natomiast dla dwóch związków chl-2 i chl-*a* (wykres 25 - 26) spadek intensywności był znaczny i wynosił odpowiednio 20% i 40%. Szczegółową analizę zmian intensywności ostatniego pasma Q po naświetleniu różnymi dawkami promieniowania przedstawiono w tabeli 15.



Wykres 27. Widmo absorpcji roztworu chl-2 w DMSO ($c = 20 \mu\text{M}$) zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).



Wykres 28. Widmo absorpcji roztworu chl-*a* ($c = 20 \mu\text{M}$) w buforze fosforanowym zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).

Tabela 15. Stosunek wartości absorbancji odczytanej dla ostatniego pasma Q po (A) i przed (A_0) naświetleniem roztworów pochodnych chloryny różnymi dawkami promieniowania generowanego przez lampę halogenową z filtrem górnoprzepustowym 630 nm.

Czas naświetlania [min]	Dawka [J/cm^2]	Stosunek wartości absorbancji A / A_0 [%]					
		chl- <i>a</i> (PBS)	chl- <i>b</i> (PBS)	chl- <i>c</i> (DMSO)	chl- <i>d</i> (DMSO)	chl- <i>e</i> (DMSO)	chl-2 (DMSO)
2	4,56	82,93	98,88	96,22	99,25	96,82	91,49
4	9,12	74,40	97,48	94,94	98,25	94,06	86,55
6	13,68	68,53	94,96	93,94	97,37	93,74	82,70
7	15,96	66,13	94,12	92,42	95,24	92,78	81,47
8	18,24	62,40	93,42	91,53	94,49	91,61	80,78
9	20,52	61,33	92,16	89,99	92,73	89,49	80,51
10	22,80	60,27	91,32	88,34	91,73	88,43	78,93

Zagadnienie fotowybielenia jest nieodłącznym elementem terapii fotodynamicznej dotyczącym większości fotouczulaczy. Mechanizmy procesu

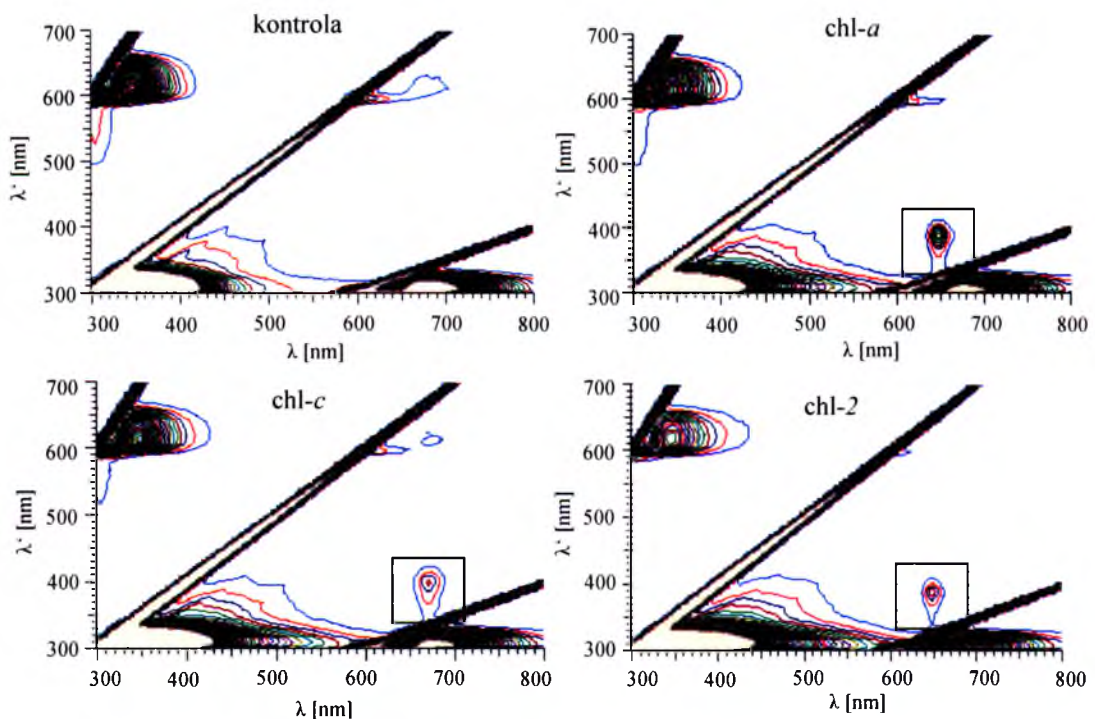
fotowysybielenia nie są proste do wyjaśnienia i zależą od wielu czynników, w tym struktury chemicznej fotouczulaczy i środowiska w którym odbywa się naświetenianie (Nyokong, 2012). Ze względu na złożoność problemu, na podstawie badania właściwości roztworów trudno przewidzieć zachowanie fotouczulaczy w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, że proces agregacji odgrywa znaczącą rolę w procesie fotowysybielenia. Zaobserwowano, że formy zagregowane są bardziej odporne na fotowysybielenie. Obecność surfaktantów, sprzyjających monomeryzacji, będzie zatem sprzyjać zjawisku fotowysybielenia. Dodatkowo wiele fotouczulaczy ulega fotodegradacji znacznie szybciej w obecności białek (Tønnesen, 1996). Das i wsp. badali fotodegradację chloryny p6 w różnych środowiskach. Wykryli, że szybkość fotowysybielenia roztworu chloryny w buforze fosforanowym lub emulsji liposomowej jest porównywalna, natomiast w medium z dodatkiem 10% surowicy FBS proces ten zachodzi trzykrotnie szybciej, a w przypadku medium z dodatkiem 1% surowicy FCS szybkość wzrasta dwukrotnie (Das, 2005). Prace związane z badaniem kinetyki procesów fotowysybielenia potwierdziły kluczową rolę tlenu w tym procesie. Okazuje się, że w warunkach beztlenowych proces fotowysybielenia zachodzi mniej wydajnie. Hajdur i wsp. badali fotowysybielenie temoporfiny (mTHPC) w wodnym roztworze zawierającym 10% surowicy FCS z dodatkiem wygaszaczy tlenu singletowego tj. DABCO lub histydyny. Zaobserwowali ich wpływ zarówno na proces fotodegradacji jak i tworzenia fotoproduktów. Wykazali, że w warunkach beztlenowych proces fotowysybielenia zachodzi 50% mniej wydajnie niż w obecności tlenu. Ponadto, obecność wygaszaczy spowodowała spadek wydajności procesu fotowysybielenia o 25% w przypadku DABCO oraz o 35% w przypadku histydyny (Hadjur, 1998).

2. Badania biologiczne

2.1 Badanie kinetyki wnikania fotouczulacza do komórek

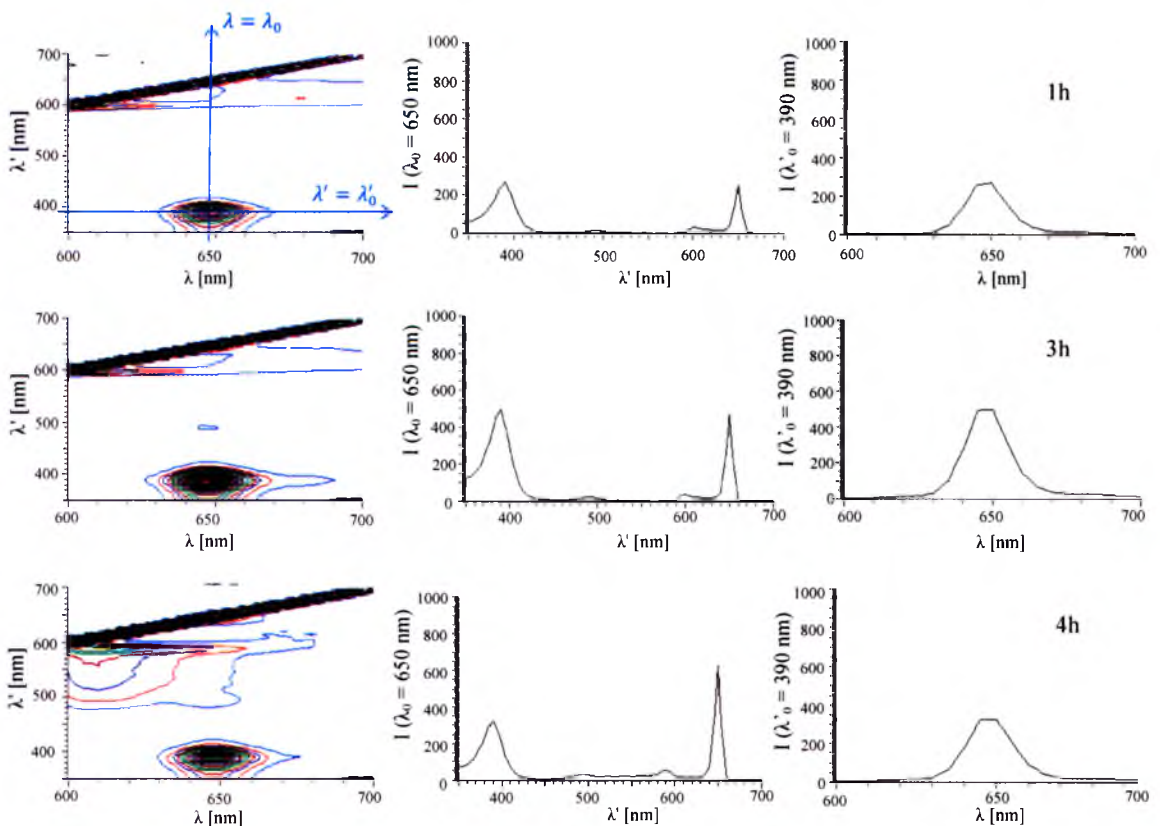
Aby potwierdzić obecność fotouczulacza we wnętrzu komórek oraz wyznaczyć optymalny czas inkubacji przeprowadzono spektrofotometryczny pomiar lizatów komórkowych. Podczas badań komórki linii hct116 inkubowano z badanymi pochodnymi chloryny przez różny czas (od 1,5 do 6 godzin). Następnie komórki lizowano, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.4 a otrzymane lizaty analizowano spektrofotometrycznie.

W pierwszym etapie pomiarów rejestrowano trójwymiarowe wykresy wzbudzenie - emisja obrazujące natężenie luminescencji próbki przy wszystkich możliwych kombinacjach długości fali promieniowania wzbudzającego i emitowanego (wykres 29). Na ich podstawie można było jednoznacznie stwierdzić, czy po danym czasie we wnętrzu komórki zgromadził się fotouczulacz.



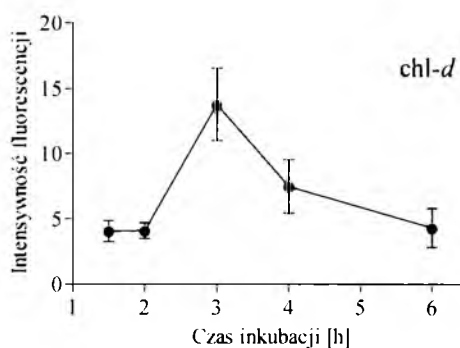
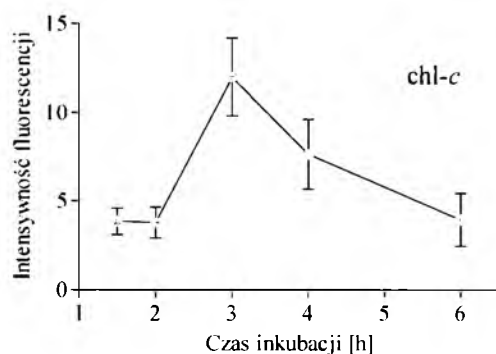
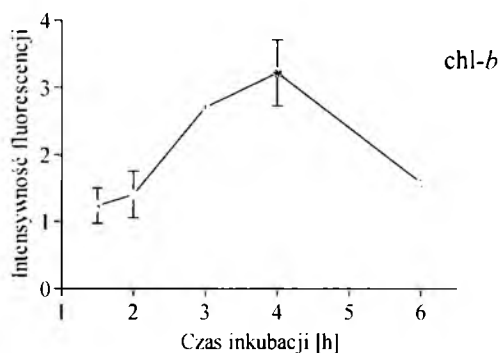
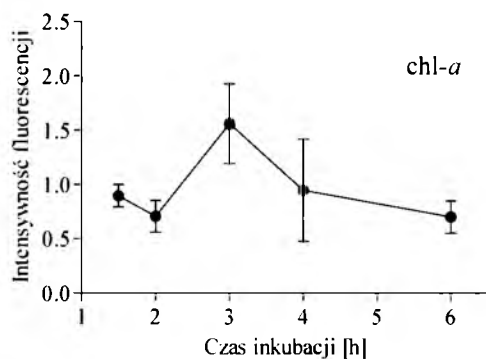
Wykres 29. Trójwymiarowe wykresy wzbudzenie - emisja roztworów uzyskanych w wyniku lizy komórek kontrolnych (nie traktowanych żadnym czynnikiem) oraz komórek poddanych 3-godzinnej inkubacji z roztworami badanych pochodnych chloryny. Dla grup inkubowanych z fotouczulaczem przy ok. $\lambda = 650$ nm widoczny jest pik wskazujący na obecność fotouczulacza w otrzymanym lizacie (zaznaczono kwadratem). λ - długość fali emisji; λ' - długość fali wzbudzenia

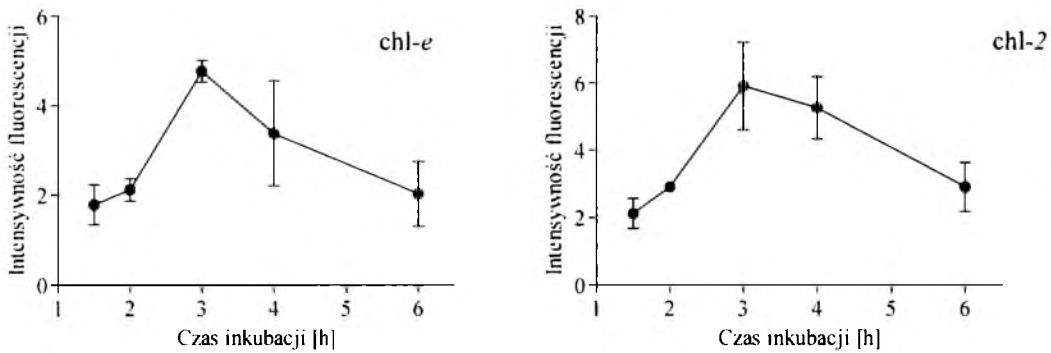
Na powyższych wykresach całkowita wiedza o pomiarach spektralnych zawarta jest w kształcie powierzchni $I = I(\lambda, \lambda')$, gdzie λ opisuje długości fal promieniowania emitowanego, a λ' odpowiada długościom fal promieniowania wzbudzającego. Przecięcie powierzchni takiego wykresu płaszczyzną $\lambda' = \lambda'_0$ odpowiada widmu emisji otrzymanemu po wzbudzeniu światłem o długości fali λ'_0 . Natomiast przekrój płaszczyzną $\lambda = \lambda_0$ odpowiada widmu wzbudzenia uzyskanemu w wyniku rejestracji luminescencji o długości fali λ_0 (Twardowski, 1989). Na wykresie 30 zaprezentowano fragmenty zarejestrowanych trójwymiarowych widm wzbudzenie - emisja oraz widma powstałe w wyniku ich przecięcia płaszczyznami $\lambda' = 390$ nm oraz $\lambda = 650$ nm. Już wstępna analiza otrzymanych widm pozwala zauważyć, że widmo emisji uzyskane dla lizatu po 3-godzinnej inkubacji z fotouczulaczem charakteryzuje się największą intensywnością, co może wskazywać, że po takim czasie stężenie fotouczulacza we wnętrzu komórki będzie maksymalne.



Wykres 30. Fragmenty trójwymiarowych widm wzbudzenie - emisja roztworów otrzymanych w wyniku lizy komórek inkubowanych z chl b przez różny czas (po lewej) oraz widma powstałe w wyniku ich przecięcia płaszczyznami $\lambda = 650$ nm (w środku) oraz $\lambda' = 390$ nm (po prawej). λ - długość fali emisji; λ' - długość fali wzbudzenia.

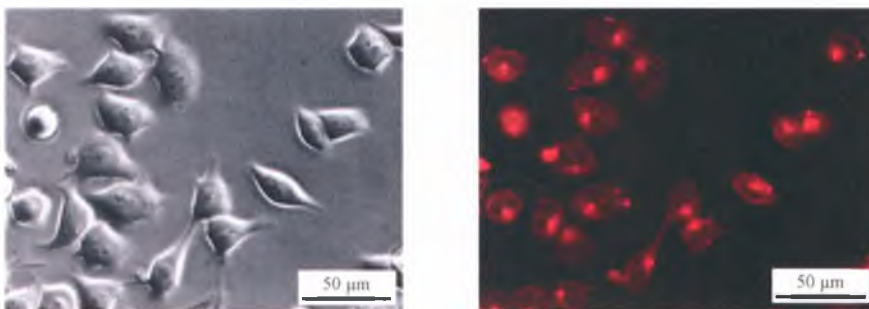
Dalszy etap analizy miał na celu dokładne określenie po jakim czasie inkubacji komórek z roztworem fotouczulacza, jego ilość we wnętrzu komórek była maksymalna. Pomiar ten polegał na zarejestrowaniu widm fluorescencji poszczególnych lizatów po wzbudzeniu światłem o długości fali odpowiadającej pasmu Soreta danego fotouczulacza. Z zarejestrowanych widm odczytano maksymalną intensywność fluorescencji, co pozwoliło na wykreślenie zależności maksymalnej intensywności fluorescencji od czasu inkubacji. Otrzymane krzywe przedstawiono na wykresie 31. Analizując ich przebieg można stwierdzić, że optymalny czas inkubacji badanych fotouczulaczy z komórkami, w zależności od związku, wynosi pomiędzy trzy a cztery godziny. Dla części badanych chloryn po trzech godzinach na wykresie widoczne jest wyraźne maksimum. Dla pozostałych różnica w stężeniu związku gromadzonego w komórkach po trzech lub czterech godzinach nie jest tak wyraźna, natomiast dla chl-*b* wynik wskazuje na większe stężenie fotouczulacza w komórkach po 4-godzinnej inkubacji. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów ustalono 3,5-godzinny czas inkubacji za optymalny podczas badania efektu fotodynamicznego.





Wykres 31. Zależność akumulacji badanych pochodnych chloryny w komórkach linii hct116 od czasu inkubacji wyznaczona na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru lizatów komórkowych. Każdy punkt na wykresie reprezentuje wartość średnią z ośmiu punktów pomiarowych. Błąd wyznaczono ze wzoru na odchylenie standardowe.

Dodatkowo obecność fotouczulacza we wnętrzu komórek potwierdzono przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Poniżej przedstawiono zdjęcie komórek linii hct116 po 3,5-godzinnej inkubacji z chl-c, na którym widoczna jest fluorescencja pochodząca od zgromadzonego w komórkach fotouczulacza.



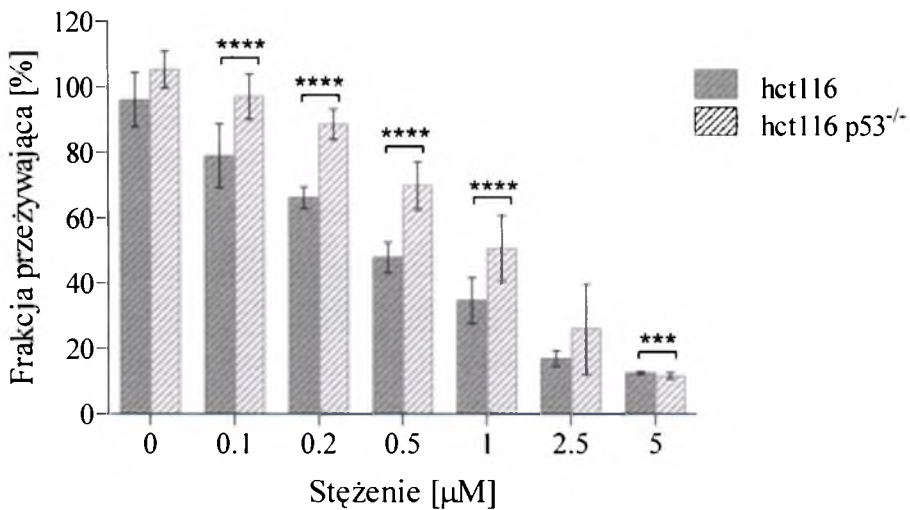
Rysunek 24. Fluorescencja pochodząca od zgromadzonej w komórkach chl-c zarejestrowana po 3,5-godzinnej inkubacji komórek linii hct116 z fotouczulaczem (po prawej) oraz zdjęcie komórek wykonane w technice kontrastu fazowego (po lewej).

2.2 Badanie cytotoksyczności i fototoksyczności

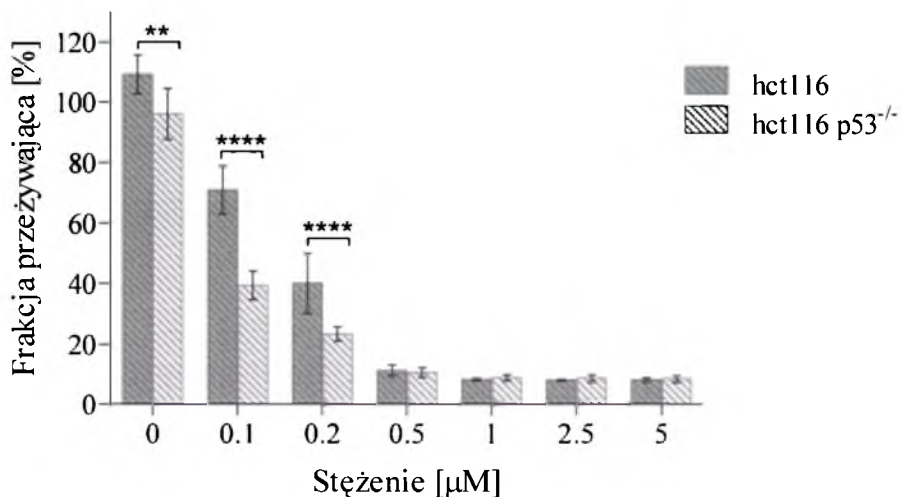
Celem przeprowadzonych eksperymentów było sprawdzenie cytotoksyczności badanych pochodnych chloryny w stosunku do komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 oraz linii hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej inkubacji z komórkami w ciemności (tzw. toksyczność ciemna) oraz ich fototoksyczności po 3,5-godzinnej inkubacji z komórkami, a następnie naświetleniu światłem czerwonym o dawce 20 J/cm².

Zbadano wpływ różnych stężeń (0,5 μM - 5 μM) na obserwowany efekt terapeutyczny. Zastosowany czas inkubacji dobrano eksperymentalnie (rozdział 2.1). Uzyskane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi dla związku referencyjnego - temoporfiny, substancji czynnej fotouczulacza o nazwie Foscan. Wyniki testu MTS dla związku referencyjnego przy 3,5-godzinnej inkubacji z komórkami (tak samo jak w eksperymentach z proponowanymi fotouczulaczami) oraz przy 24-godzinnej inkubacji (czas optymalny dla fotouczulacza Foscan) pokazano na wykresie 32.

a)

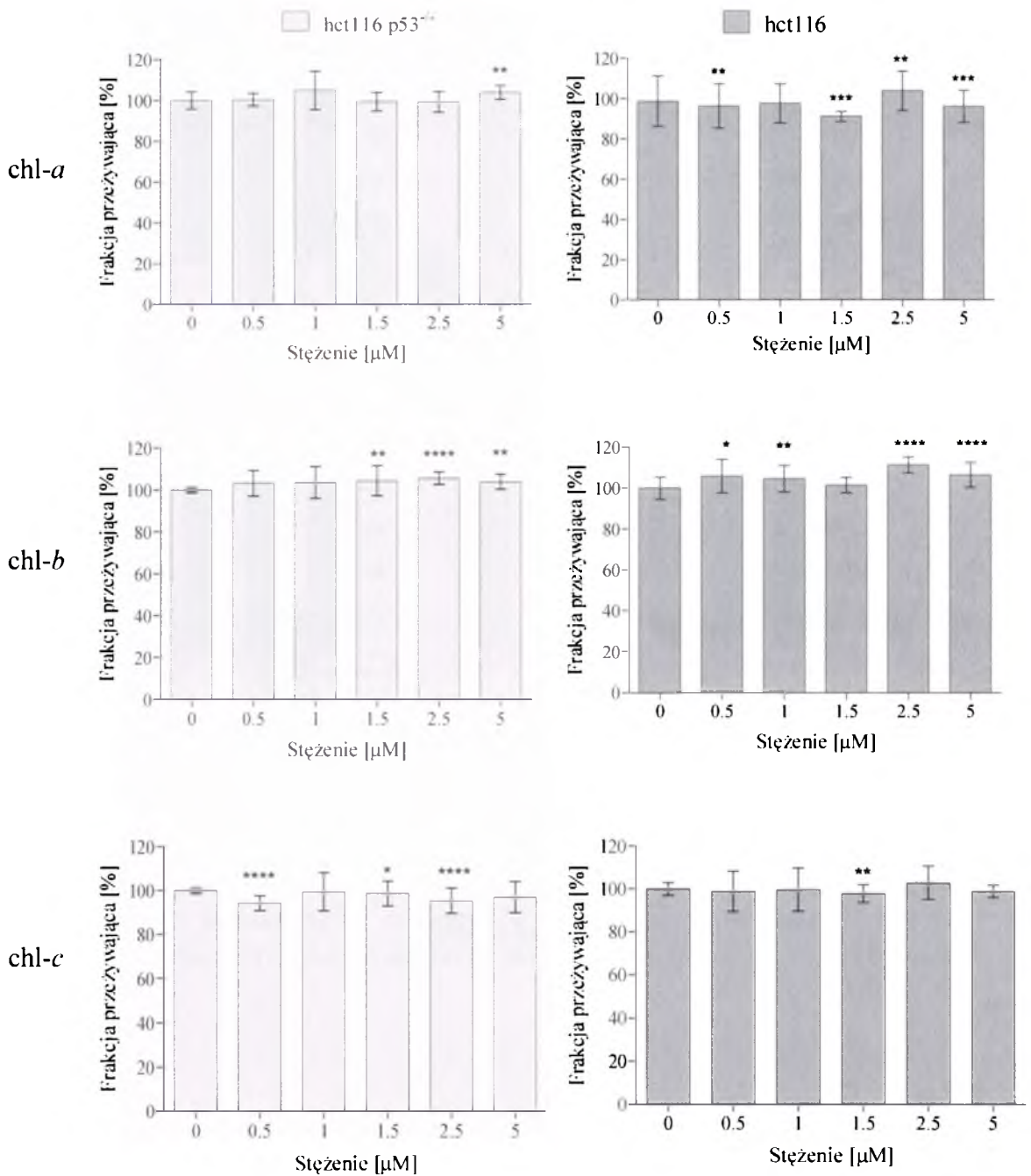


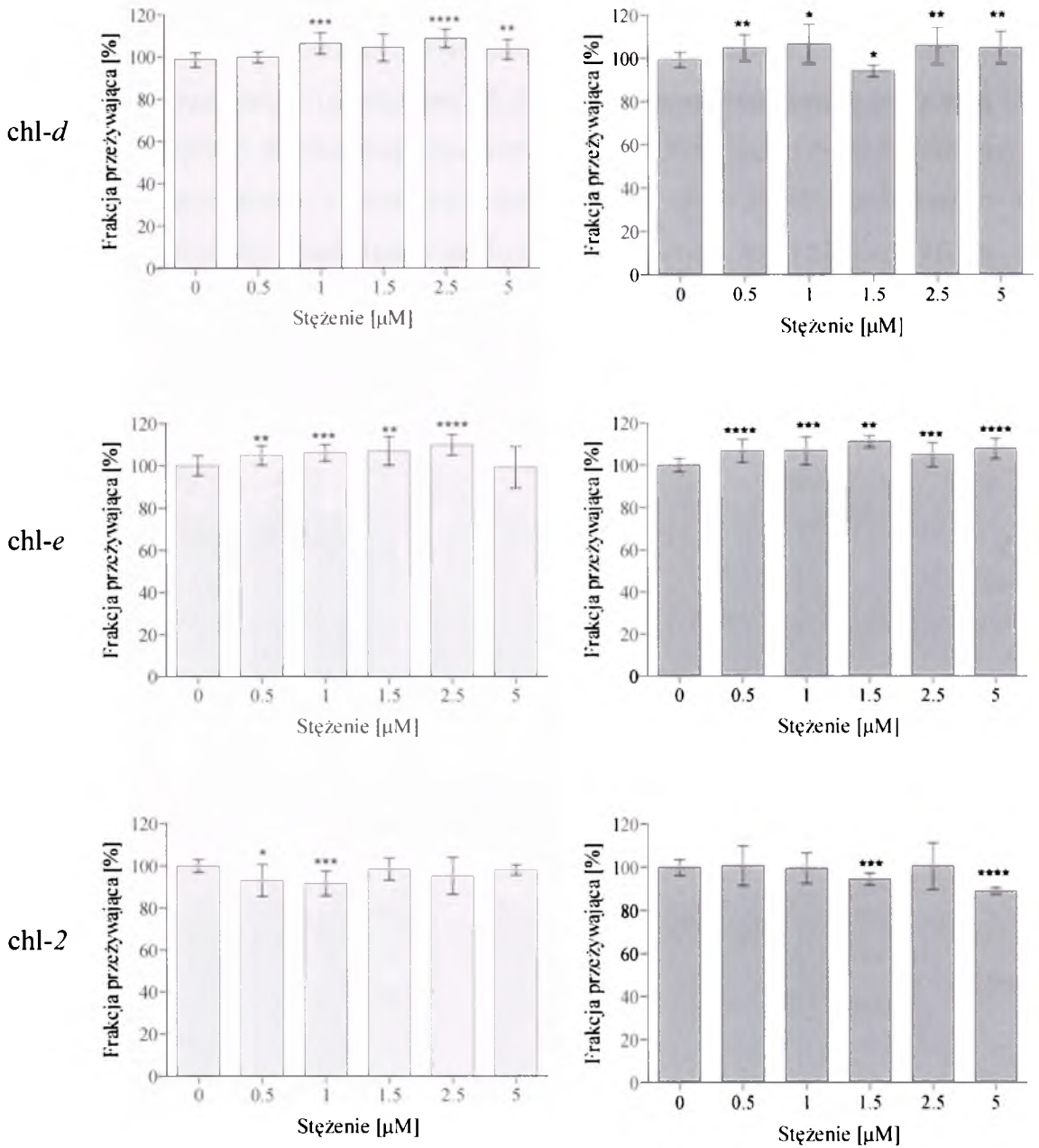
b)



Wykres 32. Wyniki testu MTS dla związku referencyjnego. Przeżywalność komórek linii ht116 oraz ht116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej (a) oraz 24-godzinnej (b) inkubacji z temoporfiną w różnych stężeniach (0,1 μM ÷ 5 μM) oraz naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych (dane nie prezentowane).

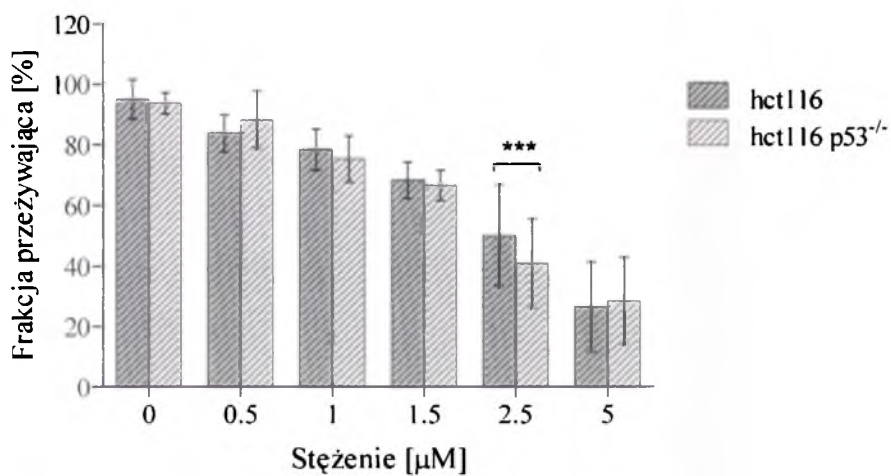
Idealny fotouczulacz powinien charakteryzować się brakiem negatywnego wpływu na proliferację komórek w ciemności, natomiast pod wpływem światła powinien skutecznie prowadzić do ich zniszczenia. Otrzymane wyniki oceny cytotoksyczności oraz fototoksyczności badanych pochodnych chloryny przedstawiono na wykresach 33 - 34. W badaniach tych przeżywalność komórek oceniano testem MTS po 24 godzinach od zakończenia procedury naświetlania lub w przypadku badań oceniających toksyczność ciemną po 24 godzinach od zakończenia inkubacji z fotouczulaczem.



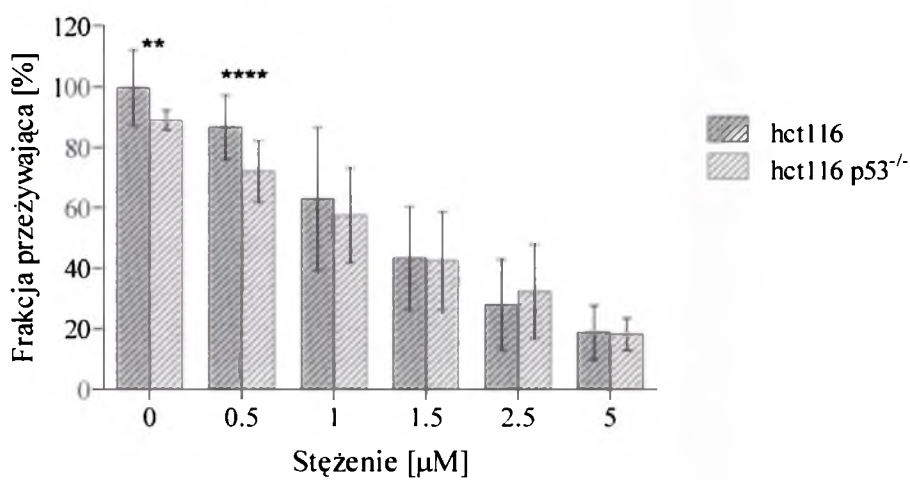


Wykres 33. Cytotoksyczność badanych pochodnych chloryny. Komórki linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} inkubowano z badanymi fotoczułaczami w różnych stężeniach (0,5 μM ÷ 5 μM) przez 3,5 godziny w ciemności. Przeżywalność komórek oceniono testem MTS w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych.

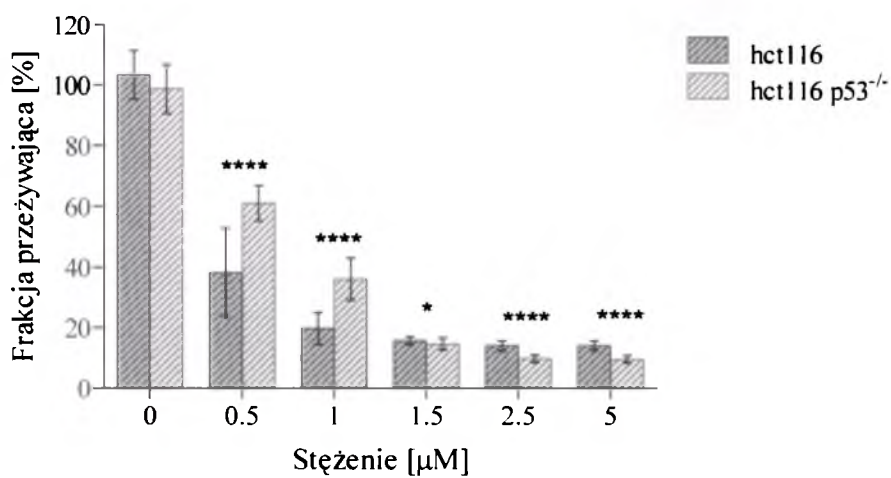
a)



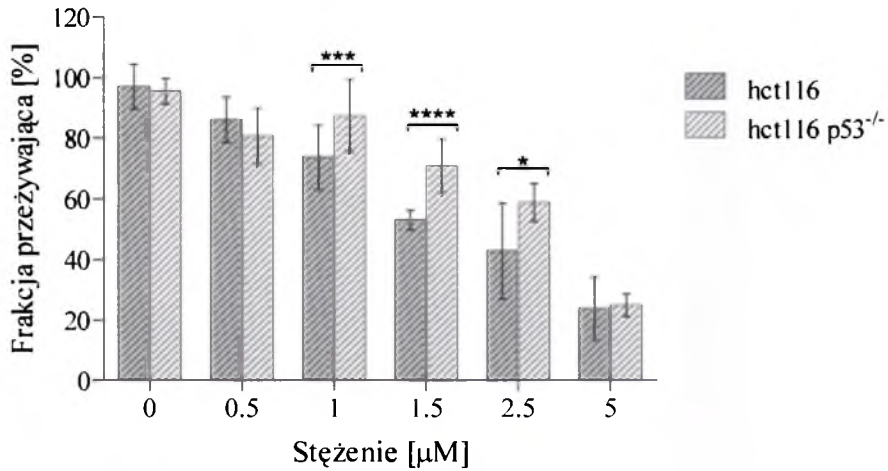
b)



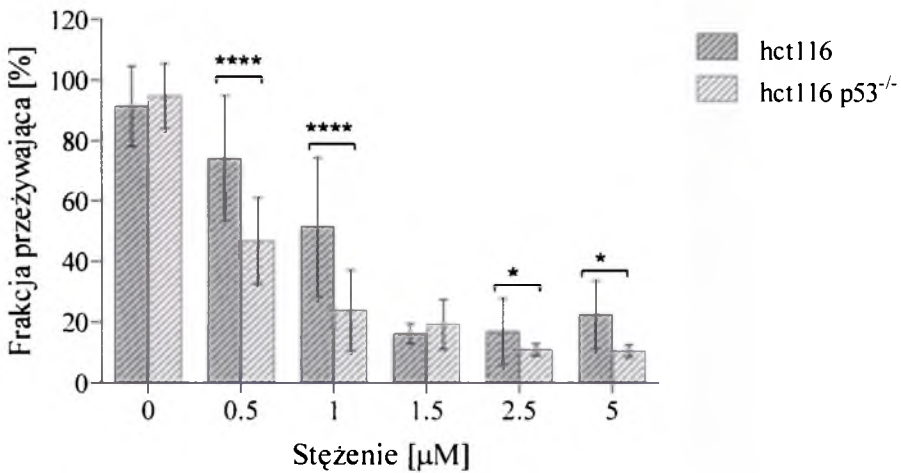
c)



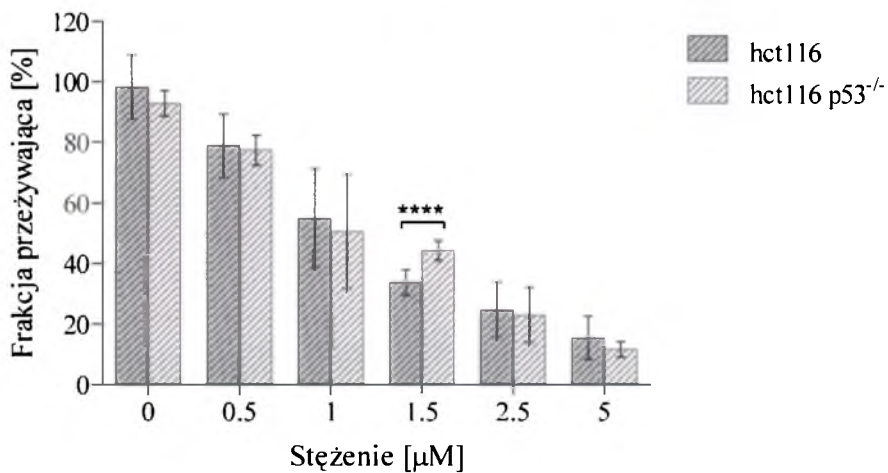
d)



e)



f)

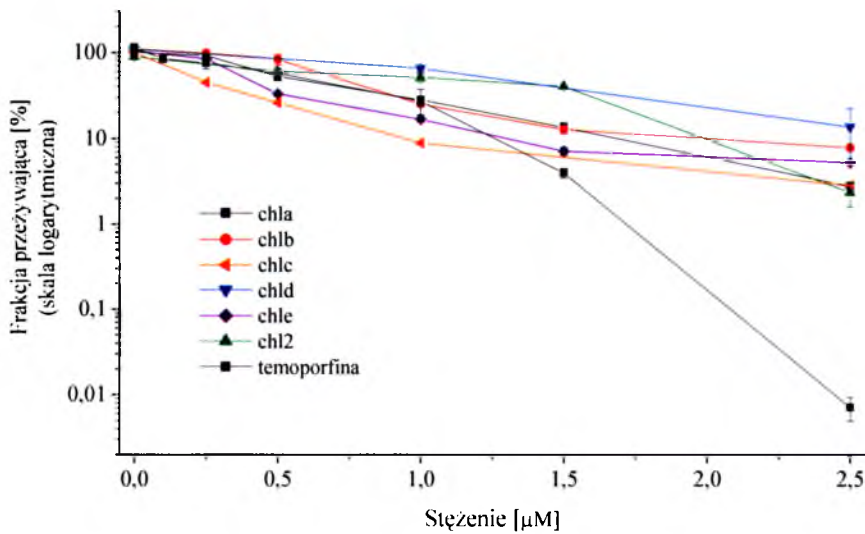


Wykres 34. Fototoksyczność badanych pochodnych chloryny: chl-a (a), chl-b (b), chl-c (c), chl-d (d), chl-e (e), chl-2 (f). Przeżywalność komórek linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny w różnych stężeniach (0,5 μM ÷ 5 μM) i naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) w odniesieniu do nicyzm nie traktowanych komórek kontrolnych (dane nie prezentowane).

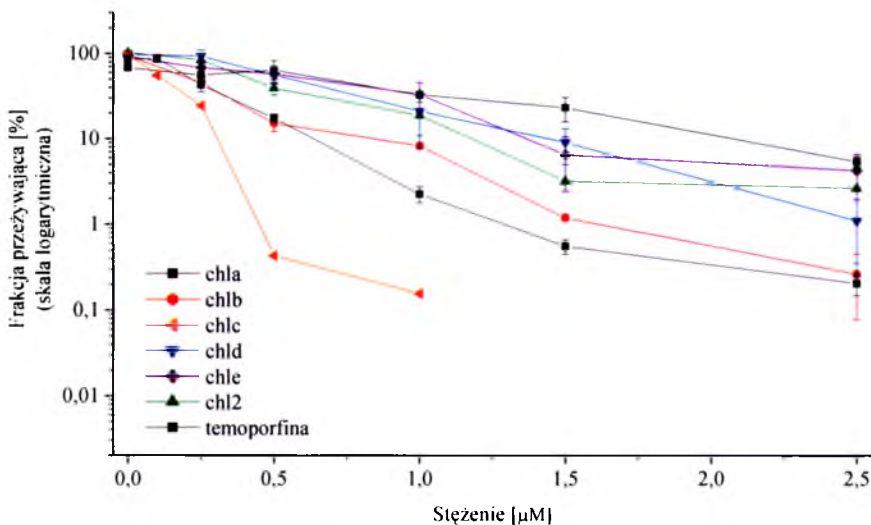
Na wykresie 33 można zaobserwować, że w uwzględnionym zakresie stężeń żadna z badanych pochodnych chloryny nie wykazywała toksycznego wpływu na komórki gruczolaka okrężnicy w ciemności. Natomiast po naświetleniu światłem czerwonym o dawce 20 J/cm^2 obserwowano spadek przeżywalności uzależniony od stężenia fotouczulacza.

Spośród badanych fotouczulaczy najsilniejszy efekt terapeutyczny zaobserwowano dla chl-*c*. W najwyższym uwzględnionym stężeniu, tj. $5 \mu\text{M}$, przeżywalność komórek spadała do 14,1% (hct116) oraz 9,5% (hct116 p53^{-/-}). Wysoką skutecznością terapeutyczną charakteryzowały się również chl-*e* oraz chl-2. W stężeniu $5 \mu\text{M}$ frakcja komórek przeżywających wynosiła dla chl-*e* 22,3% (hct116) i 10,4% (hct116 p53^{-/-}) oraz dla chl-2 14,3% (hct116) i 11,7% (hct116 p53^{-/-}). W przypadku chl-*b* podobną skuteczność działania zaobserwowano dla obu linii (SF = 18%). Słabszy efekt terapeutyczny zaobserwowano dla chl-*d*. W stężeniu $5 \mu\text{M}$ frakcja komórek przeżywających wynosiła 23,9% (hct116) oraz 25,0% (hct116 p53^{-/-}). Spośród wszystkich fotouczulaczy najmniej aktywna okazała się chl-*a*. W przypadku tego fotouczulacza przeżywalność komórek wynosiła 26,6% (hct116) oraz 28,5% (hct116 p53^{-/-}). Dla związku referencyjnego w stężeniu $5 \mu\text{M}$, w przypadku 3,5-godzinnej inkubacji (wykres 32 a), przeżywalność komórek wynosiła 12,5% (hct116) oraz 11,7% (hct116 p53^{-/-}). Obserwowany efekt terapeutyczny był więc porównywalny do wyniku uzyskanego dla chl-*c*.

Powyższe wyniki uzyskano przy pomocy testu MTS (rozdział 3.3), który informuje o żywotności komórek w oparciu o aktywność enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej. Wykonując go po 24 godzinach od zakończenia naświetlenia, uzyskuje się informacje o liczbie komórek z aktywnymi mitochondriami. Nie można jednak wykluczyć, że po czasie dłuższym od 24 godzin, wykryte uszkodzenia mogą zostać naprawione lub komórki uznane w teście za żywe mogą uruchomić mechanizmy prowadzące do ich śmierci. Aby to zweryfikować i jednoznacznie ocenić efekty terapii wykonano test klonogenności (rozdział 3.4). Jego wyniki oceniające przeżywalność komórek gruczolaka okrężnicy po 3,5-godzinnej inkubacji z pochodnymi chloryny oraz naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm^2) pokazano na wykresach 35 - 36. Na wykresie zaprezentowano również wyniki dla związku referencyjnego.



Wykres 35. Wyniki testu klonogenności. Przeżywalność komórek linii hct116 po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny oraz związkiem referencyjnym (temoporfiną) w stężeniach $0,25 \div 2,5 \mu\text{M}$ wyznaczona w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych.



Wykres 36. Wyniki testu klonogenności. Przeżywalność komórek linii hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny oraz związkiem referencyjnym (temoporfiną) w stężeniach $0,25 \div 2,5 \mu\text{M}$ wyznaczona w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych.

Na zaprezentowanych wykresach nie uwzględniono stężenia 5 μM , ponieważ pomimo wysiania wszystkich komórek poddawanych terapii, nie zaobserwowano wzrostu kolonii potomnych dla żadnej z badanych pochodnych chloryny, co świadczy o bardzo dużym uszkodzeniu komórek. Znaczącą różnicę w przeżywalności komórek linii *hct116* zaobserwowano dla badanych chloryn oraz związku referencyjnego w stężeniu 2,5 μM (wykres 35). Na taki wynik mogą mieć wpływ zmiany morfologiczne (bardzo silna wakuolizacja komórek) obserwowane praktycznie od razu po zakończeniu naświetlania dla komórek inkubowanych z proponowanymi chlorynami w stężeniu 2,5 μM . W efekcie których podczas zbierania i liczenia wiele komórek rozpadało się i tylko niewielka ich część była wysiewana na płytkach przeznaczonych do testu klonogenności. Efektów takich nie zaobserwowano dla związku referencyjnego. Komórki poddane działaniu temoporfiny i światła, były zliczane i wirowane bez żadnych strat i w ilości porównywalnej do liczby pierwotnie wysianych komórek były wysiewane na płytkach przeznaczonych do testu klonogenności na kolejne 9 dni.

Test klonogenności potwierdził skuteczność terapeutyczną badanych pochodnych chloryny. W najwyższym uwzględnionym stężeniu frakcja komórek przeżywających wynosiła kilka procent. W oparciu o uzyskane wyniki wyznaczono stężenie fotouczulaczy przy którym obserwowano zabicie 50% populacji komórek – parametr IC_{50} . Wyznaczone wartości IC_{50} przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych pochodnych chloryny.

Nazwa fotouczulacza	IC_{50} [μM]			
	TEST MTS		TEST KLONOGENNOŚCI	
	<i>hct116</i>	<i>hct116 p53^{-/-}</i>	<i>hct116</i>	<i>hct116 p53^{-/-}</i>
<i>chl-a</i>	2,62 \pm 0,22	2,38 \pm 0,25	0,68 \pm 0,11	0,49 \pm 0,34
<i>chl-b</i>	1,42 \pm 0,17	1,22 \pm 0,15	0,77 \pm 0,11	0,23 \pm 0,04
<i>chl-c</i>	0,31 \pm 0,03	0,50 \pm 0,05	0,22 \pm 0,03	0,12 \pm 0,03
<i>chl-d</i>	2,08 \pm 0,17	3,10 \pm 0,42	0,83 \pm 0,32	0,45 \pm 0,08
<i>chl-e</i>	0,96 \pm 0,12	0,37 \pm 0,04	1,23 \pm 0,30	0,58 \pm 0,06
<i>chl-2</i>	1,07 \pm 0,09	1,04 \pm 0,11	0,43 \pm 0,06	0,53 \pm 0,21

Przeprowadzone badania pokazały, że po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny w różnych stężeniach oraz naświetleniu światłem czerwonym

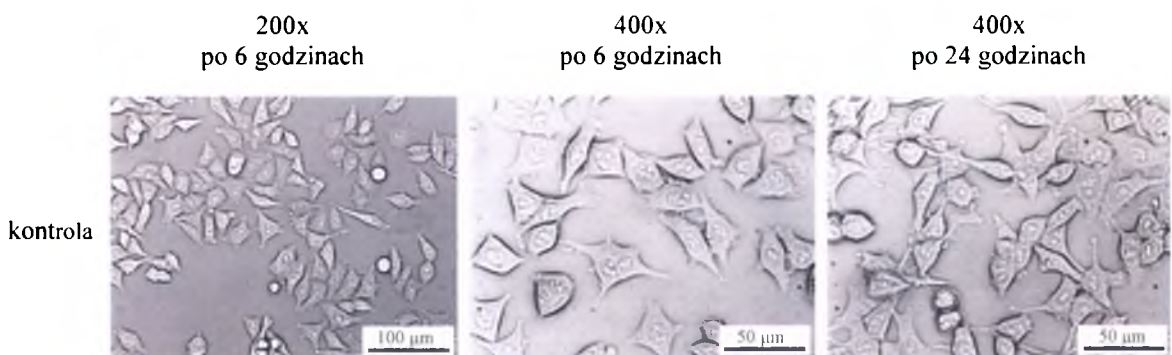
o dawce 20 J/cm^2 dochodzi do śmierci komórek zarówno zawierających, jak i pozbawionych białka p53. W najwyższym uwzględnionym stężeniu, tj. $5 \mu\text{M}$, różnice w przeżywalności komórek linii hct116 i hct116 p53^{-/-} były nieistotne statystycznie, z wyjątkiem chl-c i chl-e. W przypadku chl-c różnice istotne statystycznie występowały w całym zakresie stężeń, przy czym dla niższych stężeń silniejszy efekt terapeutyczny osiągnięto dla komórek linii hct116, a przy wyższych stężeniach dla komórek hct116 p53^{-/-}.

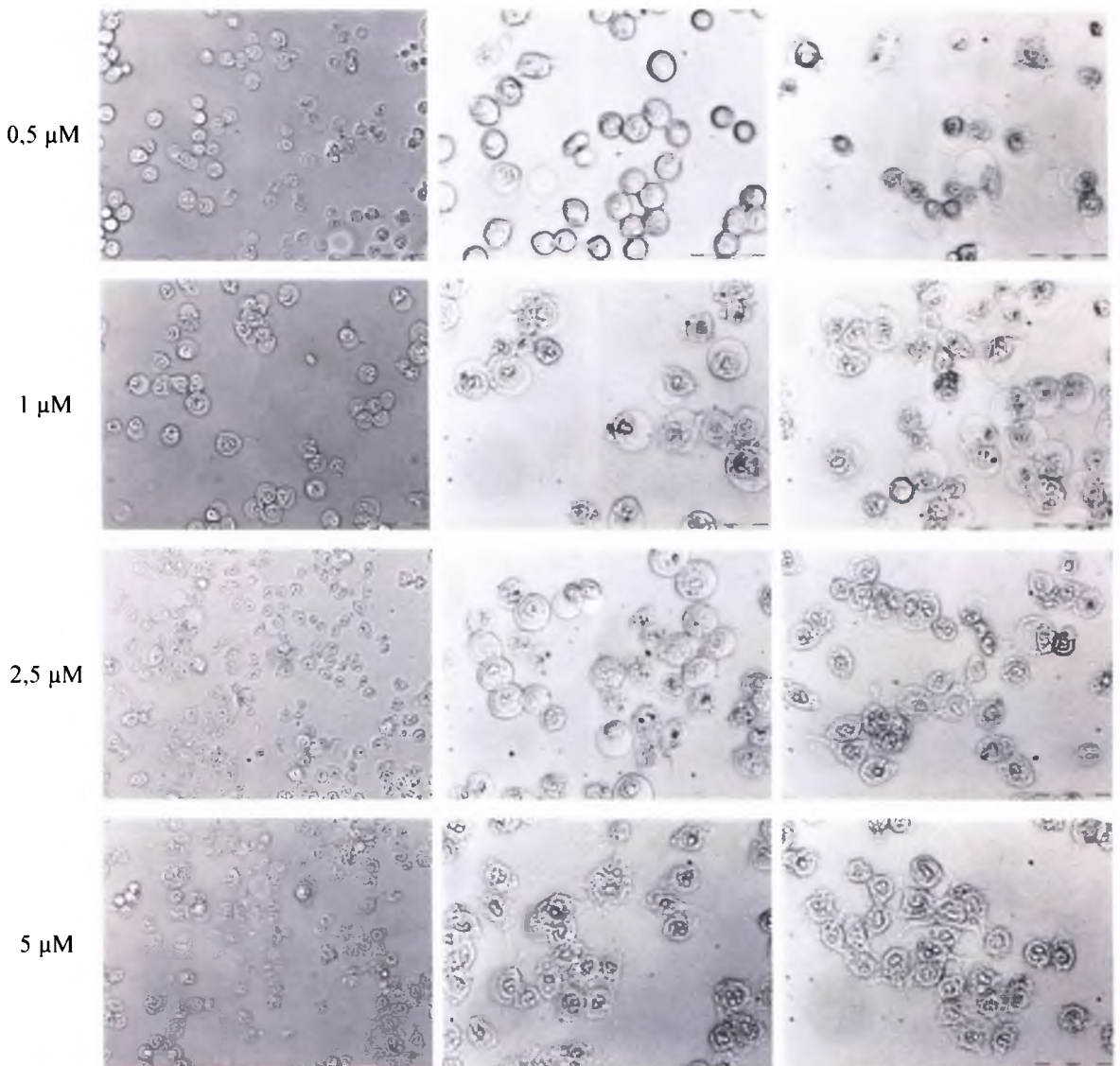
Obie metody oceny przeżywalności komórek potwierdziły najwyższą skuteczność fotouczulającą chl-c. Obserwowany efekt był porównywalny do wyniku uzyskanego dla związku referencyjnego.

2.3 Zmiany morfologii komórek po naświetleniu

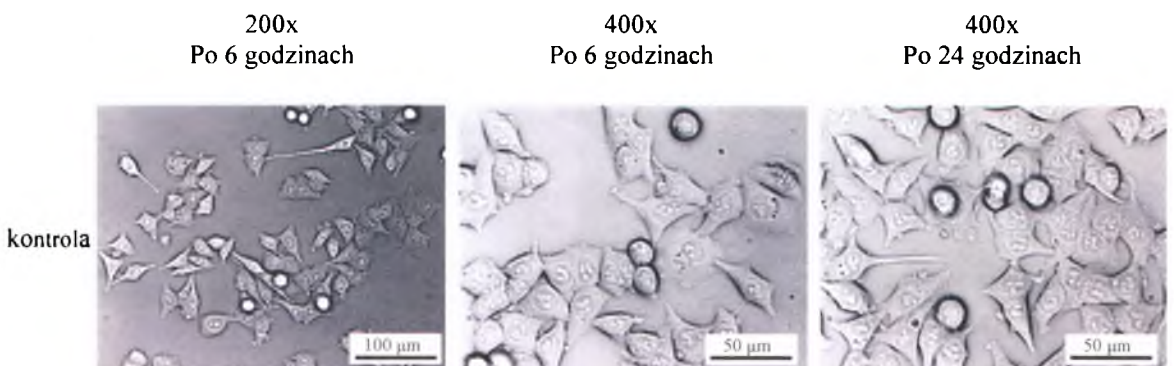
W ramach pracy oceniono również zmiany w morfologii komórek poddanych działaniu badanych fotouczulaczy i światła. Zaobserwowane wyraźne zmiany morfologiczne pojawiały się praktycznie od razu po zakończeniu naświetlania. Komórki natychmiast zaokrąglały się i widoczne były cechy wskazujące na ich uszkodzenie. Im wyższe stężenie fotouczulacza stosowano, tym szybciej efekty uszkodzenia były obserwowane. Dla najwyższego badanego stężenia była to kwestia kilku minut. Należy zaznaczyć, że podczas wykonywania eksperymentów, powyższych efektów nie zaobserwowano dla komórek eksponowanych jedynie na działanie światła (tzw. kontrola naświetlana). Zdjęcia komórek linii hct116, które po 3,5-godzinnej inkubacji z jedną z badanych chloryn naświetlono przedstawiono na rysunku 25.

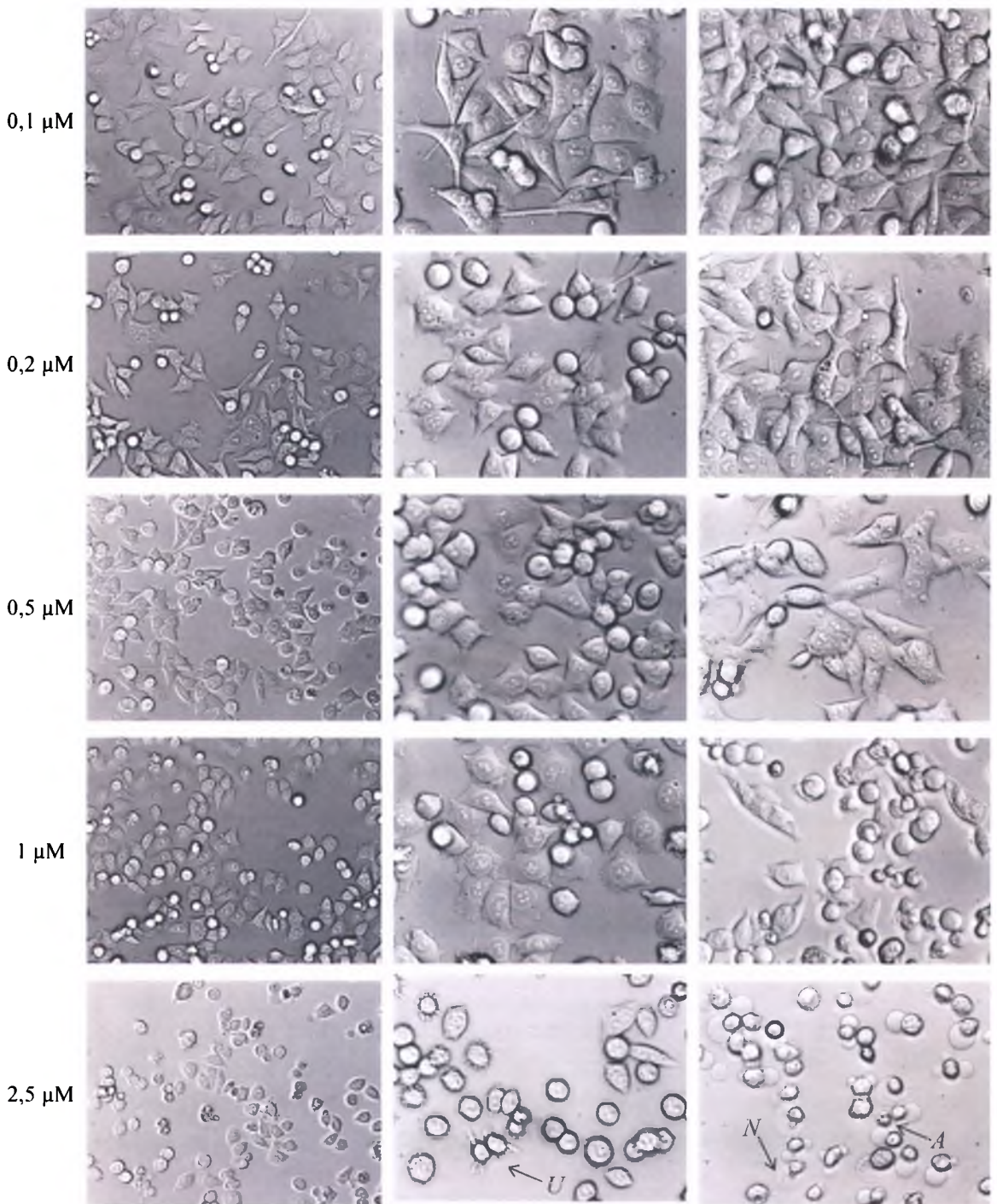
Odmienne efekty zaobserwowano po zastosowaniu związku referencyjnego (temporfiny). Wówczas zmiany morfologiczne widoczne były dopiero po pewnym czasie od zakończenia naświetlania i jedynie dla wyższych stężeń fotouczulacza (rysunek 26).





Rysunek 25. Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct16, które po 3,5-godzinnej inkubacji z chl-*c* w różnych stężeniach podano naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm^2) oraz zdjęcia nie traktowanych żadnym czynnikiem komórek kontrolnych. Zdjęcia zarejestrowano po 6 oraz 24 godzinach od zakończenia procedury naświetlania.



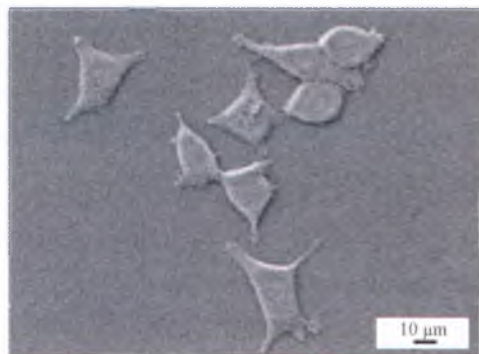
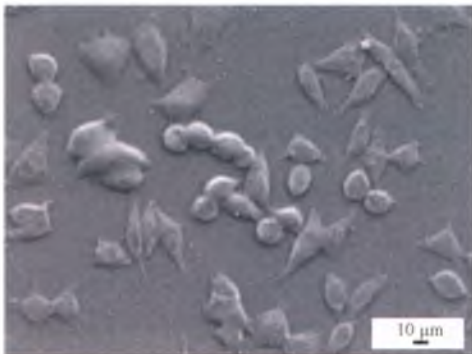


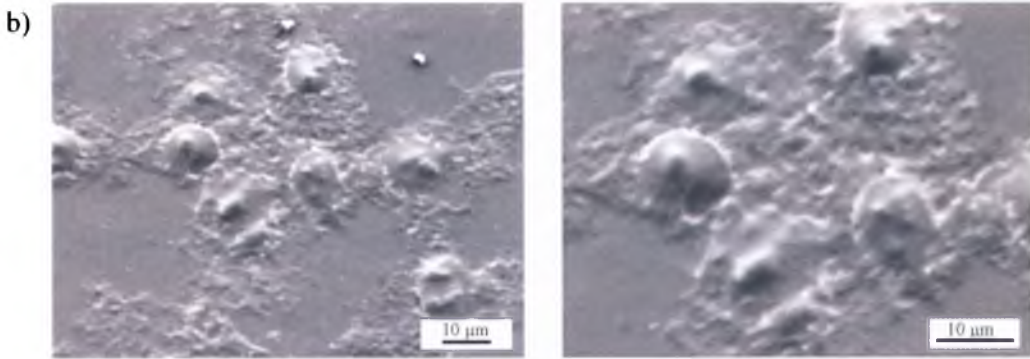
Rysunek 26. Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116, które po 3,5-godzinnej inkubacji z temoporfiną w różnych stężeniach poddano naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm^2) oraz zdjęcia nie traktowanych żadnym czynnikiem komórek kontrolnych. Zdjęcia zarejestrowano po 6 oraz 24 godzinach od zakończenia procedury naświetlania. Na zdjęciach strzałkami zaznaczono: *U* – komórki, które zaczęły się odklejać od podłoża, *A* – komórka którą zakwalifikowano jako ulegającą apoptozie, *N* – komórki zakwalifikowane jako ulegające nekrozie.

W porównaniu do grup kontrolnych różnice w kształcie komórek eksponowanych na działanie badanej pochodnej chloryny i światła widoczne były w całym zakresie stężeń już po 6 godzinach od naświetlenia. Obserwowane zmiany przejawiały się wakuolizacją komórek i ich odklejeniem od podłoża hodowlanego. W przypadku związku referencyjnego, zmiany morfologiczne po 6 godzinach widoczne były jedynie wśród komórek inkubowanych z najwyższymi stężeniami temoporfiny tj. 2,5 μM oraz 5 μM (dane nie prezentowane). Obraz komórek inkubowanych ze związkiem referencyjnym w stężeniach z zakresu od 0,1 μM do 0,5 μM nie odbiegał od obrazu komórek kontrolnych zarówno po 6 godzinach, jak i 24 godzinach. W przypadku temoporfiny stwierdzono, że śmierć komórek mogła nastąpić zarówno na drodze apoptozy, jak i nekrozy, choć przy niższych stężeniach rozróżnienie było problematyczne (rysunek 26).

W ramach pracy podjęto również próbę obserwacji komórek poddanych terapii przy pomocy mikroskopu elektronowego, wyposażonego w przystawkę pozwalającą na badanie próbek biologicznych. Analizę ograniczono do komórek eksponowanych na działanie światła (tzw. kontrola naświetlana) oraz komórek poddanych terapii fotodynamicznej z jednym z badanych fotouczulaczy. Różnicę w morfologii komórek kontrolnych oraz tych poddanych terapii fotodynamicznej pokazano na rysunku 27. Wśród naświetlanych komórek kontrolnych nie zaobserwowano zmian kształtu lub innych cech wskazujących wyraźnie na ich uszkodzenie. Widoczne zaokrąglone komórki to komórki będące w trakcie podziałów, a zaobserwowane w niektórych miejscach cytoplazmatyczne uszkodzenia, nie są tak rozległe i intensywne, jak te znajdujące się w grupie eksperymentalnej.

a)

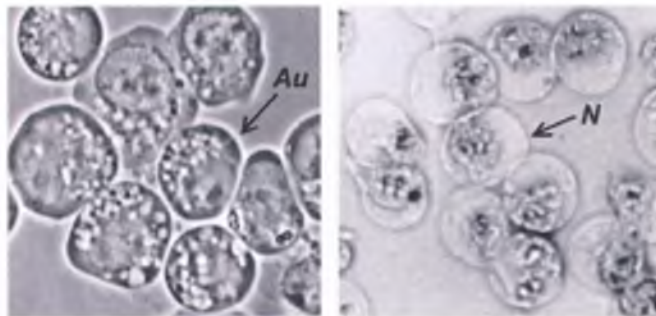




Rysunek 27. Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 podanych naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm^2) po 3,5-godzinnej inkubacji z chl-*a* (b) oraz zdjęcia grup kontrolnych poddanych jedynie działaniu światła (a) wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego. Analizę mikroskopową przeprowadzono po 24 godzinach od zakończenia naświetlania.

Uzyskane obrazy oraz szybkość obserwowanego procesu sugerują, że śmierć komórek mogła nastąpić na drodze nekrozy. Morfologicznie martwiczej śmierci komórki, jak często nazywa się nekrozę, towarzyszy wzrost objętości komórek, obrzęk organelli oraz utrata integralności błony, czego konsekwencją jest uwolnienie zawartości wewnątrzkomórkowej i indukcja stanu zapalnego (Kroemer, 2009).

Wśród obserwowanych komórek nie odnotowano cech wskazujących na proces autofagii, np. takich jak zaobserwowali Kessel i in. (Kessel, 2009). Morfologicznie autofagię definiuje się jako śmierć, której towarzyszy silna wakuolizacja cytoplazmy oraz obecność pęcherzyków (autofagosomów) otoczonych podwójną błoną (rysunek 28).



Rysunek 28. Zdjęcie (po lewej stronie) komórek białaczki mysiej (L1210) po terapii fotodynamicznej, wykonane przez Kessel i wsp. Strzałką zaznaczono komórki umierające na drodze autofagii (Au). Dla porównania, po prawej stronie, przedstawiono fragment zarejestrowanego zdjęcia, przedstawiającego komórki linii hct116 po PDT z jedną z badanych chloryn (chl-*c*). Zdjęcie wykonano po 24 godzinach od zakończenia naświetlania. Strzałką zaznaczono komórki zakwalifikowane jako ulegające śmierci na drodze nekrozy (N).

Nie zaobserwowano również zmian morfologicznych charakterystycznych dla komórek umierających na drodze apoptozy, takich jak zaokrąglenie i zmniejszenie objętości komórki, wycofanie pseudopodiów, kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jądra komórkowego. Podczas apoptozy organella, gęsto upakowane w cytoplazmie, zwykle nie wykazują znaczących zmian morfologicznych. Charakterystyczne jest natomiast pęcznienie błony komórkowej (z zachowaniem integralności aż do końcowego etapu procesu) oraz formowanie tzw. ciałek apoptotycznych (Kroemer, 2009). Ciałka te zawierają fragmenty cytoplazmy i jądra, które w warunkach fizjologicznych mogą zostać pochłonięte przez sąsiadujące komórki lub makrofagi. W sytuacji gdy ciała te nie zostaną rozpoznane przez fagocyty, np. w hodowli komórkowej, często mówi się o tzw. wtórnej nekrozie (Krysko, 2009). Wówczas komórki umierające na drodze apoptozy wykazują szereg cech charakterystycznych dla procesu nekrozy, z wyjątkiem wywoływania reakcji zapalnej (Cruchten, 2002). W takiej sytuacji, biorąc pod uwagę jedynie morfologiczne kryteria różnicujące mechanizmy śmierci komórki, łatwo wyciągnąć nieprawidłowe wnioski.

Podsumowując, wykonanie analizy mikroskopowej, opartej jedynie na jakościowej analizie kryteriów morfologicznych, jest niewystarczające do prawidłowego rozróżnienia mechanizmów śmierci komórkowej. Według Krysko i in. prawidłowo przeprowadzona analiza wymaga uwzględnienia nie tylko kryteriów morfologicznych i biochemicznych, ale również zbadania oddziaływania komórek z fagocytami. Dlatego w trakcie dalszych badań konieczne będzie uzupełnienie i potwierdzenie wstępnego rozróżnienia pomiędzy apoptozą, nekrozą i autofagią przy pomocy analizy biochemicznej. Ponieważ nie istnieją parametry pozwalające na bezpośrednią identyfikację procesu nekrozy, konieczne będzie wykluczenie obecności parametrów typowych dla apoptozy (np. aktywacji kaspaz, uwolnienia cytochromu c, fragmentacji DNA), jak również zbadanie różnicowej kinetyki markerów śmierci komórkowej (np. ekspozycji fosfatydyloseryny, przepuszczalności błon komórkowych) (Khosravi-Far, 2008).

2.4 Ocena lokalizacji fotouczulaczy przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej

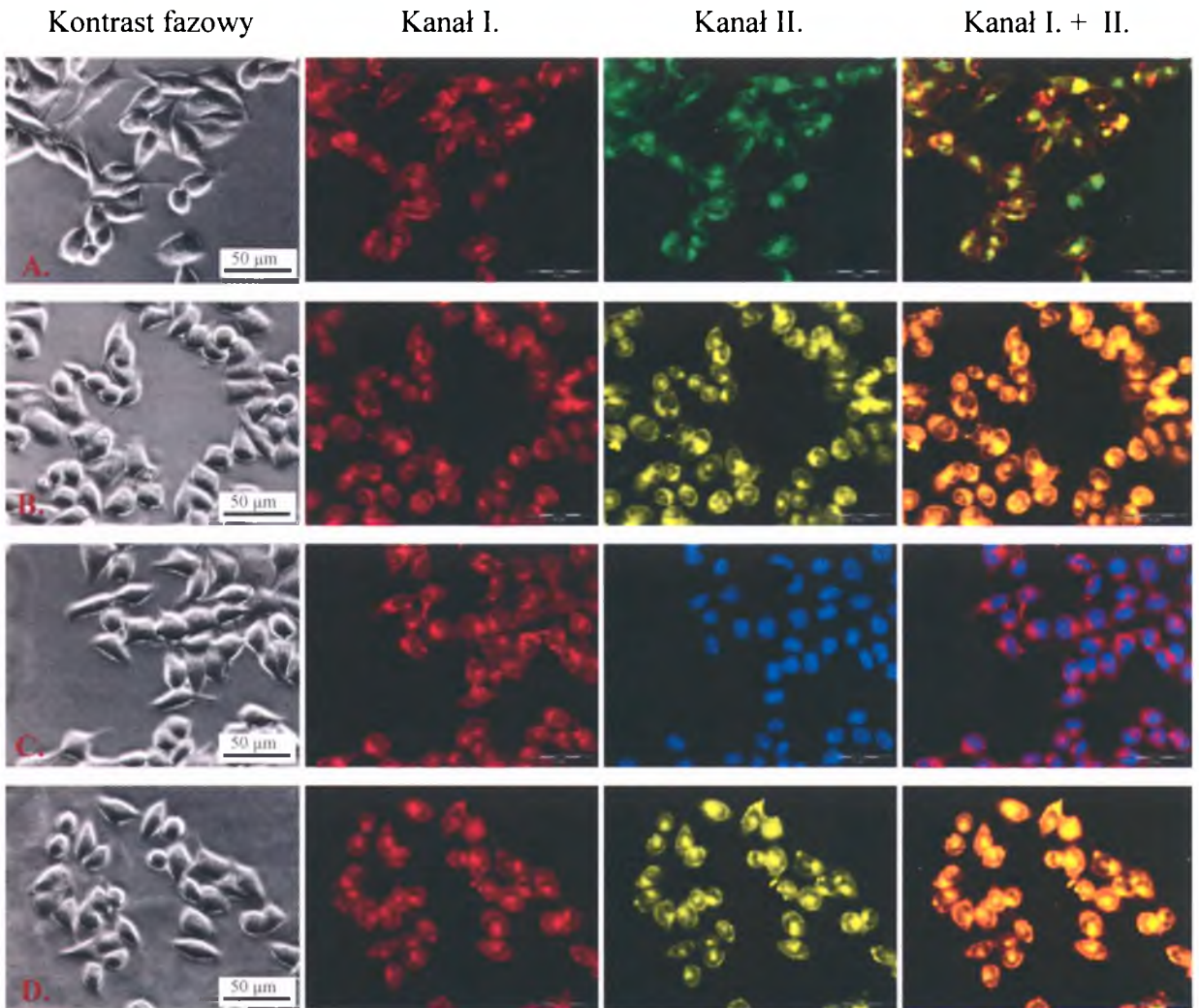
Wewnątrzkomórkowa lokalizacja fotouczulacza ma duże znaczenie w terapii fotodynamicznej. Determinuje sposób działania fotouczulaczy, a co za tym idzie, decyduje o mechanizmie śmierci komórkowej. Związane jest to z niewielkim zasięgiem działania generowanych po naświetleniu reaktywnych utleniaczy, ograniczonym do obszaru w którym znajduje się fotouczulacz. Miejsce subkomórkowej lokalizacji fotosensybilizatorów zależy od wielu czynników, w tym hydrofobowości i ładunku fotouczulacza. Generalnie przyjmuje się, że związki gromadzące się początkowo w lizosomach lub błonach komórkowych, działają mniej efektywnie niż te zgromadzone w mitochondriach lub siateczce śródplazmatycznej. Związane jest to z faktem niezwykle szybkiej indukcji apoptozy przez fotouczulacze wnikające do mitochondriów, w przeciwieństwie do tych zgromadzonych w lizosomach i błonach, którym przypisuje się wywoływanie nekrozy. Należy jednak pamiętać, że w trakcie naświetlania, fotouczulacz może zmienić swoje położenie, co wpłynie na efektywność jego działania.

W ramach pracy dokonano oceny gromadzenia fotouczulacza we wnętrzu komórek gruczołaka okrężnicy przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Zastosowano markery w postaci barwników fluorescencyjnych, które ułatwiły ocenę gromadzenia fotouczulacza w obrębie wybarwionych struktur. Analiza kolokalizacji, polegająca na ocenie obrazów powstałych po nałożeniu na siebie zdjęć uzyskanych podczas rejestracji fluorescencji badanego związku oraz fluorescencji markera, umożliwiła określenie miejsca, w którym zgromadził się fotouczulacz. Warunkiem była różna długość fali promieniowania wzbudzającego i emitowanego badanego fotosensybilizatora i stosowanego barwnika. Badanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji ograniczono do związku, dla którego stwierdzono największą skuteczność fotouczulającą, czyli chl-*c*. Po 2-godzinnej inkubacji z komórkami i wzbudzeniu światłem dopasowanym do pasm absorpcji chloryny, obserwowano czerwoną fluorescencję pochodzącą od zgromadzonego w komórkach fotouczulacza. Dodatkowo, rejestrowano fluorescencję pochodzącą od barwników wiążących się specyficznym do poszczególnych organelli, w tym do mitochondriów, lizosomów, siateczki śródplazmatycznej oraz jąder komórkowych, pozwalającą na wizualizację wybranej struktury. W przypadku barwnika MitoTracker (wybarwiającego mitochondria) emitowana była jasnozielona fluorescencja. Barwniki LysoTracer oraz ERTracker (wybarwiający odpowiednio lizosomy i siateczkę śródplazmatyczną) emitowały żółtą fluorescencję. Natomiast

fluorescencja pochodząca od zgromadzonego w jądrze komórkowym barwnika Hoechst była jasnoniebieska.

Na przedstawionych zdjęciach (rysunek 29) można zaobserwować, że badany fotouczulacz, najprawdopodobniej wnikający do wnętrza komórek poprzez dyfuzję, gromadził się praktycznie w całej objętości cytoplazmy. Wydaje się, że związek nie wniknął do wnętrza jądra komórkowego. Zastosowanie podwójnego barwienia z fotouczulaczem oraz barwnikiem MitoTracker pozwoliło zaobserwować, że fotouczulacz tylko częściowo kolokalizuje się w mitochondriach. Na zaprezentowanych zdjęciach (rysunek 29 A, kanał I. + II.) widoczna jest czerwona fluorescencja pochodząca od chloryny, która prawdopodobnie wciąż znajduje się w błonie komórkowej lub cytoplazmie. Żółte obszary odpowiadają miejscom, w których chloryna mogła zacząć wnikać do mitochondriów oraz zielone obszary pochodzące od mitochondriów pozbawionych fotouczulacza. Inna jest sytuacja w przypadku kolokalizacji fotouczulacza z barwnikiem ERTracker lub LysoTracker. Obserwowana zmiana koloru na pomarańczowy w obydwu przypadkach może oznaczać, że badany fotouczulacz zgromadził się w wybarwionych organellach czyli siateczce śródplazmatycznej i lizosomach.

Należy zauważyć, że w przypadku mikroskopii fluorescencyjnej rejestrowane promieniowanie pochodzi z całej objętości próbki, co utrudnia dokładną analizę. W przyszłości konieczne będzie uzupełnienie badań przy pomocy skaningowego mikroskopu konfokalnego, co w obecnej pracy nie było możliwe. Pozwoli to na ocenę miejsca gromadzenia fotouczulacza z większą dokładnością, dzięki możliwości rejestrowania przekrojów optycznych pochodzących z różnych głębokości obserwowanych komórek oraz możliwości tworzenia trójwymiarowych rekonstrukcji otrzymanych obrazów.



Rysunek 29. Lokalizacja fotouczulacza w komórkach gruczolaka okrężnicy linii hct116 rejestrowana przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Kolokalizację oceniono po inkubacji komórek z chl-c (2.5 μ M, 2-godzinna inkubacja) oraz inkubacji z odpowiednim markerem fluorescencyjnym, tj. barwnikiem MitoTracker (A.), barwnikiem ERTracker (B.), barwnikiem Hoechst (C.), barwnikiem LysoTracker (D.). Kanał I.: fluorescencja pochodząca od zgromadzonego w komórkach fotouczulacza; Kanał II.: fluorescencja pochodząca od barwnika fluorescencyjnego; Kanał I. + II.: nałożenie odpowiednich obrazów.

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem pracy była charakterystyka sześciu nowych, nie badanych wcześniej, fotouczulaczy z grupy chloryn, które zaprojektowano i zsyntezowano z myślą o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce i terapii fotodynamicznej. Aby poprawić ich powinowactwo do komórek nowotworowych, do części z nich przyłączono fragmenty cukrów. W makroskali pozwala to na wykorzystanie wzmożonego metabolizmu i zwiększonej glikolizy szybko proliferujących komórek nowotworowych do wybiórczego transportu związków. W skali bardziej lokalnej umożliwia specyficzne oddziaływanie z komórkami nowotworowymi za pośrednictwem wiążących cukier receptorów lektynowych.

Badania związane z poszukiwaniem nowych substancji fotouczulających są ważne dla rozwoju terapii fotodynamicznej, ponieważ skuteczne leczenie możliwe jest tylko wtedy, gdy dysponujemy fotouczulaczem o odpowiedniej charakterystyce. Niezwykle ważna jest selektywność działania nowych fotouczulaczy, nie tylko w kontekście powodzenia terapii, ale przede wszystkim z punktu widzenia troski o bezpieczeństwo pacjenta. Dodatkowo, fotouczulacz powinien posiadać szereg innych cech, omówionych w części teoretycznej, predysponujących go do wykorzystania w PDT i warunkujących jego skuteczne, fototoksyczne działanie. Ponieważ własności te wynikają bezpośrednio z budowy chemicznej związków, proces ich tworzenia wymaga współpracy interdyscyplinarnego zespołu.

Struktura chemiczna omawianych chloryn, została zmodyfikowana tak, aby nadać fotouczulaczom pożądane w PDT cechy, w tym amfifilowość i wybiórcze działanie na komórki nowotworowe za pośrednictwem przyłączonych fragmentów cukrowych. W ramach pracy przeprowadzono badania pozwalające na ich charakterystykę fizykochemiczną oraz określenie aktywności biologicznej w eksperymentach z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Potwierdzono, że wszystkie proponowane związki posiadają odpowiednie z punktu widzenia zastosowań w PDT właściwości fotofizyczne, takie jak silna absorpcja w długofalowym zakresie widma oraz czasy życia w stanie trypletowym, pozwalające na wydajne generowanie tlenu singletowego. Wśród badanych związków niezwykle obiecujące wydają się proponowane pochodne chloryny e6, tj. chl-c i chl-e. To właśnie dla nich zaobserwowano najsilniejszy efekt terapeutyczny w badaniach *in vitro*. W przypadku chl-c obserwowany spadek przeżywalności komórek był największy, porównywalny do

wyniku uzyskanego dla związku referencyjnego temoporfmy, substancji czynnej fotouczulacza Foscan. Co ciekawe, pozostałe fotouczulacze charakteryzowały się wyższą kwantową wydajnością generowania tlenu singletowego, co może wskazywać na udział wolnych rodników w tym procesie.

Mimo wysokiej wydajności generowania tlenu singletowego, słabszy wynik badań biologicznych *in vitro* uzyskano dla chl-*a*. Związek ten posiada bardziej hydrofilowy charakter, co mogło sprzyjać jego agregacji w środowisku komórkowym. Dodatkowo, wykazany brak fotostabilności również przyczynił się do uzyskania gorszego efektu terapeutycznego. W przypadku tego fotouczulacza założone warunki badania efektu fotodynamicznego nie okazały się optymalne. W przyszłości jego badanie będzie zatem wymagało postępowania różniącego się od przyjętego w ramach niniejszego opracowania (inny sposób podania, inna dawka światła).

Badania wykonane w ramach pracy miały charakter badań podstawowych i pozwoliły na wyjaśnienie wielu kwestii dotyczących aktywności biologicznej i charakterystyki fizykochemicznej proponowanych fotouczulaczy. Jednocześnie ujawniły nowe zagadnienia, które w przyszłości będą wymagały rozwiązania i wyjaśnienia, wskazując dalsze kierunki badań. Ukończenie niniejszej pracy z pewnością nie oznacza zakończenia prac nad możliwością zastosowania omawianych fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej, a jedynie otwiera nowy, kolejny etap badań.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Wszystkie badane fotouczulacze wykazywały absorpcję w tzw. oknie terapeutycznym tkanek.
- Pochodne chloryny e6, czyli chl-*c*, chl-*d* i chl-*e* posiadały ostatnie pasmo Q najbardziej przesunięte w kierunku długofalowego zakresu widma. Wśród tych fotouczulaczy najwyższą wartość molowego współczynnika absorpcji charakteryzowała chl-*e*.
- Zaobserwowano, że wartość molowego współczynnika absorpcji ostatniego pasma Q jest wyższa dla chloryn pozbawionych fragmentów cukrowych, tj. chl-*e* i chl-2, w porównaniu z pochodnym glikolizowanymi.
- Fotouczulacze badane w dimetylosulfotlenku, tj. chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* i chl-2 nie wykazywały tendencji do agregacji.

- Wykorzystanie buforu fosforanowego jako rozpuszczalnika dla fotouczulaczy hydrofilowych, czyli chl-*a* i chl-*b*, sprzyjało tworzeniu form zagregowanych. Dla roztworów przygotowanych w etanolu zjawiska agregacji nie zaobserwowano.
- Fotouczulacze charakteryzowały się umiarkowanymi wartościami kwantowej wydajności fluorescencji ($0,23 \pm 0,31$), co pozwala na ich zastosowanie w diagnostyce fotodynamicznej a jednocześnie nie wyklucza skutecznego generowania tlenu singletowego.
- Wyznaczony czas życia fotouczulaczy w stanie trypletowym (w obecności tlenu $0,23 \mu\text{s} \pm 0,31 \mu\text{s}$) okazał się wystarczający do przekazania energii na tlen molekularny.
- Wszystkie fotouczulacze charakteryzują się wysoką kwantową wydajnością generowania tlenu singletowego ($0,56 \pm 0,73$) przekraczającą 50%.
- Wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego badanych fotouczulaczy można uszeregować w następujący sposób:
chl-*b* > chl-*a* i chl-*e* > chl-2 > chl-*c* > chl-*d*.
- Pod wpływem światła badane fotouczulacze ulegały fotomodyfikacji, przy czym w przypadku chl-*c*, chl-*d*, chl-*e* i chl-*b* zmiany intensywności ostatniego pasma Q wywołane naświetleniem były nieznaczne.
- Fotouczulacze chl-*a* oraz chl-2 wykazały brak fotostabilności w warunkach prowadzonych eksperymentów biologicznych, ulegając fotodegradacji podczas naświetlania.
- Badane związki wykazują maksymalną akumulację w komórkach gruczolaka okrężnicy linii hct116 po 3 - 4 godzinach w zależności od związku.
- W uwzględnionym zakresie stężeń badane pochodne chloryny nie wykazują toksycznego wpływu na komórki gruczolaka okrężnicy w ciemności.
- Pod wpływem światła zaobserwowano spadek przeżywalności dla wszystkich badanych związków, zarówno wśród komórek z aktywnym, jak i nieaktywnym białkiem p53.

- Najskuteczniejsze działanie fototoksyczne wykazywała chl-*c*. Obserwowany efekt fotodynamiczny był porównywalny do związku referencyjnego czyli temoporfiny.
- Po naświetleniu komórek eksponowanych na działanie badanych chloryn i światła, bardzo szybko obserwowano zmiany morfologiczne wskazujące na uszkodzenie komórek, co może wskazywać na nekrotyczny typ śmierci komórkowej.
- Przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej stwierdzono obecność chl-*c* w lizosomach, siateczce śródplazmatycznej oraz mitochondriach.
- Najsilniejszy efekt terapeutyczny zaobserwowano dla chl-*c* i to właśnie ten związek powinien zostać wytypowany do dalszych badań na modelach zwierzęcych.

VII. LITERATURA

1. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., i in.: *Photodynamic therapy of cancer: an update*, CA: A Cancer Journal for Clinicians **61**, (2011) 250-281.
2. Ali H., Lier J. E.: *Metal complexes as photo- and radiosensitizers*, Chemical Reviews **99**, (1999) 2379-2450.
3. Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C. J. H., Sibata, C. H.: *Photosensitizers in clinical PDT*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **1**, (2004) 27-42.
4. Almeida R. D., Manadas B. J., Carvalho A. P., Duarte C. B.: *Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy*, Biochimica et Biophysica Acta **1704**, (2004) 59-86.
5. Atkins P. W.: *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2007).
6. Baker A., Kanofsky J. R.: *Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells*, Photochemistry and Photobiology **55**, (1992) 523-528.
7. Baker A., Kanofsky J. R.: *Time-resolved studies of singlet-oxygen emission from L1210 leukemia cells labeled with 5-(N-hexadecanoyl)amino eosin. A comparison with a one-dimensional model of singlet-oxygen diffusion and quenching*, Photochemistry and Photobiology **57**, (1993) 720-727.
8. Ballut S., Makky A., Chauvin B., Michel J. P., Kasselouri A., Maillard P., Rosilio V.: *Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties*, Organic & Biomolecular Chemistry **10**, (2012) 4485-4495.
9. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2008).
10. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Desroches M. C., Blais J., Maillard P., Oliveira D. M., Tedesco A. C., Prognon P., Delaire J.: *Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **81**, (2005) 154-162.
11. Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M. L., Guillemin F., Barberi-Heyob M.: *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*, Trends in Biotechnology **26**, (2008) 612-621.
12. Bednarek J., Kiljańska Z. M.: *Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy*, Postępy Biochemii **51**, (2005) 447-458.

13. Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G.: *Excited states and free radicals in biology and medicine. Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*, Oxford University Press, (1993).
14. Bonnett R.: *Chemical aspects of photodynamic therapy*, Gordon and Breach Science Publishers, (2000).
15. Bonnett R., Martinez G.: *Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy*, *Tetrahedron* **57**, (2001) 9513-9547.
16. Bonnett R., Martinez G.: *Photobleaching of Compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)- porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC)*, *Organic Letters* **4**, (2002) 2013-2016.
17. Brancalion L., Moseley H.: *Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy*, *Lasers in Medical Science* **17**, (2002) 173-186.
18. Bredell M. G., Besic E., Maake C., Walt H.: *The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: A short review*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **101**, (2010) 185-190.
19. Bugaj A. M.: *Targeted photodynamic therapy - a promising strategy of tumor treatment*, *Photochemical & Photobiological Science* **10**, (2011) 1097-1109.
20. Bullous A. J., Alonso C. M. A., Boyle R. W.: *Photosensitizer-antibody conjugates for photodynamic therapy*, *Photochemical & Photobiological Science* **10**, (2011) 721-750.
21. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P.: *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1776**, (2007) 86-107.
22. Canti G., De Simone A., Korbelik M.: *Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology*, *Photochemical & Photobiological Science* **1**, (2002) 79-80.
23. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Mechanisms in photodynamic therapy: part three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, (2005) 91-106.
24. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, (2005) 1-23.
25. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Mechanisms of photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localisation*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, (2004) 279 - 293.
26. Chatterjee D. K., Fong L. S., Zhang Y.: *Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm*, *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, (2008) 1627-1637.

27. Chen B., Pogue B. W., Hasan T.: *Liposomal delivery of photosensitising agents*, Expert Opinion on Drug Delivery **2**, (2005) 477-87.
28. Chen G. G., Lai P. B. S.: *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy: apoptosis in cancer*, Springer, (2009).
29. Chen Q., Huang Z., Chen H., Shapiro H., Beckers J., Hetzel F. W.: *Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy*, Photochemistry and Photobiology **76**, (2002) 197-203.
30. Chen X., Hui L., Foster D. A., Drain C. M.: *Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells*, Biochemistry **43**, (2004) 10918-10929.
31. Chiaviello A., Postiglione I., Palumbo G.: *Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: a brief overview*, Cancers **3**, (2011) 1014-1041.
32. Chwiłkowska A., Kulbacka J., Saczko J.: *Śmierć komórek nowotworowych. Udział reakcji fotodynamicznej w indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych*, Polski Merkuriusz Lekarski **175**, (2011) 45-48.
33. Cruchten S., Broeck W.: *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*, Anatomia, histologia, embryologia **31**, (2002) 214-223.
34. Das K., Dube A., Gupta P. K.: *A spectroscopic study of photobleaching of Chlorin p6 in different environments*, Dyes and Pigments **64** (2005) 201-205.
35. Dąbrowski J.: *Nowe halogenowe fotosensybilizatory tetrapirolowe do terapii fotodynamicznej nowotworów*, Uniwersytet Jagielloński (2009) - rozprawa doktorska.
36. D'Cruz A. K., Robinson M. H., Biel M. A.: *mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients*, Head & Neck **26**, (2004) 232-240.
37. Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Macrophage-targeted photodynamic therapy*, International Journal of Immunopathology and Pharmacology **17**, (2004) 117-126.
38. DeRosa M. C., Crutchley R. J.: *Photosensitized singlet oxygen and its applications*, Coordination Chemistry Reviews **233-234**, (2002) 351-371.
39. Derycke A. S. L., Witte P. A. M.: *Liposomes for photodynamic therapy*, Advanced Drug Delivery Reviews **56**, (2004) 17-30.
40. Dongen G. A., Visser G. W., Vrouenraets M. B.: *Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer*, Advanced Drug Delivery Reviews **56**, (2004) 31- 52.
41. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korblik M., Moan J., Peng Q.: *Photodynamic Therapy*, Journal of the National Cancer Institute. **90**, (1998) 889-905.

42. Dworakowska D.: *Rola białka p53, pRb, p21^{WAF1/CIP1}, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy*, *Onkologia Polska* **8**, (2005) 223-228.
43. Edinger A. L., Thompson C. B.: *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*, *Current Opinion in Cell Biology* **16**, (2004) 663-669.
44. Eljamel M. S., Goodman C., Moseley H.: *ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial*, *Lasers in Medical Science* **23**, (2008) 361-367.
45. Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R. K.: *The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy*, *Chemical Society Reviews* **40**, (2011) 340-362.
46. Firczuk M., Nowis D., Gołąb J.: *PDT-induced inflammatory and host responses*, *Photochemical & Photobiological Science* **10**, (2011) 653-663.
47. Gasińska A., Biesaga B.: *Dwa oblicza hipoksji nowotworów*, *Nowotwory Journal of Oncology* **60**, (2010) 332-340.
48. Girotti A. W.: *Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **63**, (2001) 103-113.
49. Gomer C. J., Rucker N., Banerjee A., Benedict W. F.: *Comparison of mutagenicity and induction of sister chromatid exchange in Chinese Hamster Cells exposed to hematoporphyrin derivative photoradiation, ionizing radiation, or ultraviolet radiation*, *Cancer research* **43**, (1983) 2622-2627.
50. Gouterman M.: *Spectra of Porphyrins*, *Journal of Molecular Spectroscopy* **6**, (1961) 138-163.
51. Grabolle M., Spieles M., Lesnyak V., Gaponik N., Eychmüller A., Resch-Genger U.: *Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties*, *Analytical Chemistry* **81**, (2009) 6285-6294.
52. Graczykowska A.: *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, Wydawnictwo Bellona, Warszawa (1999).
53. Grądzka I.: *Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek*, *Postępy Biochemii* **52**, (2006) 157-165.
54. Gutowicz M.: *Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **65**, (2011) 104-113.
55. Hackbarth S., Schlothauer J., Preuss A., Röder B.: *New insights to primary photodynamic effects - Singlet oxygen kinetics in living cells*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **98**, (2010) 173-179.

56. Hadjur C., Lange N., Rebstein J., Monnier P., Bergh H., Wagnieres G.: *Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **45**, (1998) 170-178.
57. Hama Y., Urano Y., Koyama Y., Choyke P. L., Kobayashi H.: *Targeted optical imaging of cancer cells using lectin-binding BODIPY conjugated avidin*, Biochemical and Biophysical Research Communications **348**, (2006) 807-813.
58. Hamblin M. R., Hasan T.: *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?*, Photochemical & Photobiological Science **3**, (2004) 436-450.
59. Hamblin M. R., Miller J. L., Ortel B.: *Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy*, Photochemistry and Photobiology **72**, (2000) 533-540.
60. Hamblin M. R., Mróz P.: *Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical*, Artech House, (2008).
61. Henderson B. W., Fingar V. H.: *Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor*, Cancer Research **47**, (1987) 3110-3114.
62. Henriquez M., Armisen R., Stutzin A., Quest A. F.: *Cell death by necrosis, a regulated way to go*, Current Molecular Medicine **8**, (2008) 187-206
63. Hongying Y., Fuyuan W., Zhiyi Z.: *Photobleaching of chlorins in homogeneous and heterogeneous media*, Dyes and Pigments **43**, (1999) 109-117.
64. Hopper C., Kübler A., Lewis H., Tan I. B., Putnam G.: *mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma*, International Journal of Cancer **111**, (2004) 138-146.
65. Huang Z.: *A review of progress in clinical photodynamic therapy*, Technology in Cancer Research & Treatment **4**, (2005) 283-293.
66. Huang Z., Xu H., Meyers A. D., Musani A. I., Wang L., Tagg R., Barqawi A. B., Chen Y. K.: *Photodynamic therapy for treatment of solid tumors - potential and technical challenges*, Technology in Cancer Research & Treatment **7**, (2008) 309-320.
67. Isakau H. A., Parkhats M. V., Knyukshto V. N., Dzhagarov B. M., Petrov E. P., Petrov P. T.: *Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulations: photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction in vitro*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **92**, (2008) 165-174.
68. Jiménez-Banzo A., Sagristà M. L., Mora M., Nonell S.: *Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts*, Free Radical Biology & Medicine **44**, (2008) 1926-1934.

69. Jones R. M., Wang Q., Lamb J. H., Djelal B. D., Bonnett R., Lim C. K.: *Identification of photochemical oxidation products of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin by on-line high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A* **722**, (1996) 257-265.
70. Josefsen L. B., Boyle R. W.: *Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers*, *Metal-Based Drugs* **276109**, (2008) 1-24.
71. Kawczyk-Krupka A., Czuba Z., Latos W., Mertas A., Król W., Simon-Sieron M., Sieron A.: *Aspekty immunologiczne terapii fotodynamicznej*, *Journal of Ecology and Health* **6**, (2010) 284-290.
72. Kaźmierczuk A., Kiliańska Z. M.: *Rola białek szoku cieplnego w apoptozie komórek*, *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **64**, (2010) 273-283.
73. Kelbauskas L., Dietel W.: *Internalization of aggregated photosensitizers by tumor cells: subcellular time-resolved fluorescence spectroscopy on derivatives of pyropheophorbide-a ethers and chlorin e6 under femtosecond one- and two-photon excitations*, *Photochemistry and Photobiology* **76**, (2002) 686-694.
74. Kessel D., Oleinick N. L.: *Initiation of autophagy by photodynamic therapy*, *Methods in Enzymology* **453**, (2009) 1-16.
75. Khosravi-Far R., Zakeri Z., Lockshin R. A.: *Methods in enzymology, volume 442: programmed cell death, general principles for studying cell death*, Academic Press, (2008).
76. Kopij M., Rapak A.: *Rola receptorów jądrowych w procesie śmierci komórek*, *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **62**, (2008) 571-581.
77. Korbelik M., Dougherty G. J.: *Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors*, *Cancer research* **59**, (1999) 1941-1946.
78. Král V., Králová J., Kaplánek R., Briza T., Martásek P.: *Quo vadis porphyrin chemistry?*, *Physiological Research* **55**, (2006) S3-S26.
79. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., i in.: *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*, *Cell Death and Differentiation* **16**, (2009) 3-11.
80. Krysko D. V., Vandenabeele P.: *Phagocytosis of dying cells: from molecular mechanisms to human diseases*, Springer, (2009).
81. Krześlak A.: *Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów*, *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **64**, (2010) 490-503.
82. Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy*, *Coordination Chemistry Reviews* **248**, (2004) 321-350.

83. Laville I., Figueiredo T., Loock B., Pigaglio S., Maillard P., Grierson D. S., Carrez D., Croisyc A., Blais J.: *Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins*, Bioorganic & Medicinal Chemistry **11**, (2003) 1643-1652.
84. Laville I., Pigaglio S., Blais J.-C., Doz F., Loock B., Maillard P., Grierson D. S., Blais J.: *Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells*, Journal of Medicinal Chemistry **49**, (2006) 2558-2567.
85. Li G., Pandey S. K., Graham A., Dobhal M. P., Mehta R., Chen Y., Gryshuk A., Rittenhouse-Olson K., Oseroff A., Pandey R. K.: *Functionalization of OEP-based benzochlorins to develop carbohydrate-conjugated photosensitizers. Attempt to target beta-galactoside-recognized proteins*, The Journal of Organic Chemistry **69**, (2004) 158-172.
86. Li W. T.: *Nanotechnology-based strategies to enhance the efficacy of photodynamic therapy for cancers*, Current Drug Metabolism **10**, (2009) 851-860.
87. Liu Q., Hamblin M. R.: *Macrophage-targeted photodynamic therapy: scavenger receptor expression and activation state*, International Journal of Immunopathology Pharmacology **18**, (2005) 391-402.
88. Liu W., Oseroff A. R., Baumann H.: *Photodynamic therapy causes cross-linking of signal transducer and activator of transcription proteins and attenuation of interleukin-6 cytokine responsiveness in epithelial cells*, Cancer research **64**, (2004) 6579-6587.
89. Lukšienė Ž.: *Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment*, Medicina **12**, (2003) 1137-1150.
90. MacCormack M. A.: *Photodynamic Therapy*, Advances in Dermatology **22**, (2006) 219-258.
91. Macdonald I. J., Dougherty T. J.: *Basic principles of photodynamic therapy*, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines **5**, (2001) 105-129.
92. Magi B., Ettorre A., Liberatori S., Bini L., Andreassi M., Frosali S., Neri P., Pallini V., Di Stefano A.: *Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation*, Cell Death and Differentiation **11**, (2004) 842-852.
93. Maiya B. G., Hariprasad G., Giribabu L.: *Photodynamic Therapy (PDT)*, Resonance **5**, (2000) 6-18.
94. Mazur E., Stołtny D., Kwiatek S., Kawczyk-Krupka A., Latos W., Sieroń A.: *Diagnostyka (PDD) i terapia fotodynamiczna (PDT) - wskazania i wykorzystanie PDD i PDT w leczeniu uzdrowiskowym*, Acta Balneologica **2**, (2010) 107-111.
95. Mennenga A., Gärtner W., Lubitz W., Görner H.: *Effects of noncovalently bound quinones on the ground and triplet states of zinc chlorins in solution and*

- bound to de novo synthesized peptides*, Physical Chemistry Chemical Physics **8**, (2006) 5444-5453.
96. Moan J., Berg K.: *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*, Photochemistry and Photobiology **53**, (1991) 549-553.
97. Monteiro C. J., Pereira M. M., Azenha M. E., Burrows H. D., Serpa C., Arnaut L. G., Tapia M. J., Sarakha M., Wong-Wah-Chung P., Navaratnam S.: *A comparative study of water soluble 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfophenyl)porphyrin and its metal complexes as efficient sensitizers for photodegradation of phenols*, Photochemical & Photobiological Science **4**, (2005) 617-24.
98. Mroz M., Huang Y. Y., Wharton T., Hamblin M. R.: *Fullerenes in Photodynamic Therapy of Cancer*, Handbook of Nanophysics, (2010).
99. Muller P. J., Wilson B. C.: *Photodynamic therapy of brain tumors - a work in progress*, Lasers in Surgery and Medicine **38**, (2006) 384-389.
100. Najbar J., Turek A.: *Fotochemia i spektroskopia optyczna: ćwiczenia laboratoryjne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2009).
101. Niedre M., Patterson M. S., Wilson B. C.: *Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo*, Photochemistry and Photobiology **75**, (2002) 382-391.
102. Nowis D., Makowski M., Mróz P., Mrówka P., Issat T., Gietka J., Gołąb J.: *Fotodynamiczna terapia nowotworów*, Magazyn otorynolaryngologiczny **4**, (2003) 93-100.
103. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Gołąb J.: *Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy*, Acta Biochimica Polonica **52**, (2005) 339-352.
104. Nowis D., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Jakóbisiak M., Gołąb J.: *The influence of photodynamic therapy on the immune response*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **2**, (2005) 283-298.
105. Nyman E. S., Hynninen P. H.: *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **73**, (2004) 1-28.
106. Nyokong T., Ahsen, V.: *Photosensitizers in medicine, environment, and security*, Springer, (2012).
107. O'Connor A. E., Gallagher W. M., Byrne A. T.: *Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy*, Photochemistry and Photobiology **85**, (2009) 1053-1074.
108. Obata M., Hirohara S., Sharyo K., Alitomo H., Kajiwara K., Ogata S., Tanihara M., Ohtsuki C., Yano S.: *Sugar-dependent photodynamic effect of glycoconjugated porphyrins: A study on photocytotoxicity, photophysical properties and binding*

- behavior to bovine serum albumin (BSA)*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, (2007) 1204-1211.
109. Osterloh J., Graca M., Viente H., *Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors*, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **6**, (2002) 305-324
110. Overholt B. F., Wang K. K., Burdick J. S., Lightdale C. J., Kimmey M., Nava H. R., Sivak M. V., Nishioka N., Barr H., Marcon N., Pedrosa M., Bronner M. P., Grace M., Depot M.: *Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia*, *Gastrointestinal Endoscopy* **66**, (2007) 460-468.
111. Parkhats M. V., Galievsky V. A., Stashevsky A. S., Trukhacheva T. V., Dzhagarov B. M.: *Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e 6: The effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone*, *Optics and Spectroscopy* **107**, (2009) 974-980.
112. Paszko E., Ehrhardt C., Senge M. O., Kelleher D. P., Reynolds J. V.: *Nanodrug applications in photodynamic therapy*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **8**, (2011) 14-29.
113. Paszyc S.: *Podstawy fotochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1992).
114. Pervaiz S., Olivo M.: *Art and science of photodynamic therapy*, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**, (2006) 551-556.
115. Phillips D.: *Light relief: photochemistry and medicine*, *Photochemical & Photobiological Sciences* **9**, (2010) 1589-1596.
116. Piskorz J., Nowak, M., Gośliński, T.: *Terapeutyczne i diagnostyczne zastosowania kwasu 5-aminolewulinowego*, *Farmacja Polska* **7**, (2009) 476-482.
117. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T.: *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*, *Lasers in Medical Science* **24**, (2009) 259-268.
118. Podbielska H., Sieroń A., Stręk W.: *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław (2004).
119. Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: *Reaktywne formy tlenu*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* **4**, (2008) 1007-1015.
120. Redmond R. W., Gamlin J. N.: *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules*, *Photochemistry and Photobiology* **70**, (1999) 391-475.
121. Robertson C. A., Evans, D. H., Abrahamse H.: *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **96**, (2009) 1-8.

122. Rodriguez M. E., Morán F., Bonansea A., Monetti M., Fernández D. A., Strassert C. A., Rivarola V., Awruch J., Dixelio L. E.: *A comparative study of the photophysical and phototoxic properties of octakis(decyloxy)phthalocyaninato zinc(II), incorporated in a hydrophilic polymer, in liposomes and in non-ionic micelles*, Photochemical & Photobiological Science **2**, (2003) 988-994.
123. Rossetti F. C., Lopes L. B., Carollo A. R., Thomazini J. A., Tedesco A. C., Bentley M. V.: *A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy*, Journal of Controlled Release **155**, (2011) 400-408.
124. Rotomskis R., Streckyte G., Bagdonas S.: *Phototransformations of sensitizers 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **39**, (1997) 167-171.
125. Rotomskis R., Streckyte G., Bagdonas S.: *Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **39**, (1997) 172-175.
126. Schmidt R., Tanielian C., Dunsbach R., Wolff C.: *Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ sensitization*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **79**, (1994) 11-17.
127. Sears P., Wong C. H.: *Carbohydrate mimetics: a new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition*, Angewandte Chemie (International. ed. in English) **38**, (1999) 2300 - 2324.
128. Senge M. O.: *mTHPC - A drug on its way from second to third generation photosensitizer?*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **9**, (2012) 170-179.
129. Sharman W. M., Lier J. E., Allen C. M.: *Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems*, Advanced Drug Delivery Reviews **56**, (2004) 53-76.
130. Shen H. R., Spikes J. D., Kopecková P., Kopecek J.: *Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **34**, (1996) 203-210.
131. Shieh Y.-A., Yang S.-J., Wei M.-F., Shieh M.-J.: *Aptamer-based tumor-targeted drug delivery for photodynamic therapy*, ACS Nano **4**, (2010) 1433-1442.
132. Sieroń A., Kościarz-Grzesiok A., Kawczyk-Krupka A., Sieroń-Stołtny K., Misiak A.: *Application of photodynamic therapy in the treatment of premalignant and malignant changes of head and neck*, Wiadomości Lekarskie **61** (2008) 283-287.
133. Silva E. F. F., Serpa C., Dąbrowski J. M., Monteiro C. J. P., Formosinho S. J., Stochel G., Urbanska K., Simoes S., Pereira M. M., Arnaut L. G.: *Mechanisms of singlet-oxygen and superoxide-ion generation by porphyrins and bacteriochlorins*

- and their implications in photodynamic therapy*, Chemistry - a European Journal **16**, (2010) 9273-9286.
134. Simons J. P.: *Fotochemia i spektroskopia*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1976).
135. Snyder J. W., Skovsen E., Lambert J. D. C., Ogilby P. R.: *Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells*, Journal of the American Chemical Society **127**, (2005) 14558-14559.
136. Snyder J. W., Skovsen E., Lambert J. D. C., Poulsen L., Ogilby P. R.: *Optical detection of singlet oxygen from single cells*, Physical Chemistry Chemical Physics **8**, (2006) 4280-4293.
137. Sobolev A. S., Jans D. A., Rosenkranz A. A.: *Targeted intracellular delivery of photosensitizers*, Progress in Biophysics & Molecular Biology **73**, (2000) 51-90.
138. Solban N., Rizvi I., Hasan T.: *Targeted Photodynamic Therapy*, Lasers in Surgery and Medicine **38**, (2006) 522-531.
139. Starkey J. R., Rebane A. K., Drobizhev M. A., Meng, F., Gong A., Elliott A., McInnerney K., Spangler C. W.: *New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse*, Clinical Cancer Research **14**, (2008) 6564-6573.
140. Stewart F., Baas P., Star W.: *What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)?*, Radiotherapy and Oncology **48**, (1998) 233-248.
141. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: *Rodzaje śmierci komórki*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej **61**, (2007) 420-428.
142. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O. D., Zanella F., Reulen H. J., ALA-Glioma Study Group: *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*, The Lancet Oncology **7**, (2006) 392-401.
143. Sznarkowska A., Olszewski R., Zawacka-Pankau J.: *Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej **64** (2010) 396-407.
144. Ścibior-Bentkowska D., Czeczot H.: *Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej **63** (2009) 58-72.
145. Tønnesen H. H.: *The photostability of drugs and drug formulations*, Taylor & Francis, (1996).
146. Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F. A.: *Photodynamic Therapy in Oncology*, The Oncologist **11**, (2006) 1034-1044.

147. Twardowski J.: *Biospektroskopia*, tom 3, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1989).
148. Uchoa A. F., Oliveira K. T., Baptista M. C., Bortoluzzi A. J., Yamamoto Y., Serra O. A.: *Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation*, *The Journal of Organic Chemistry* **76**, (2011) 8824-8832.
149. Vaupel P., Mayer A.: *Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome*, *Cancer Metastasis Reviews* **26**, (2007) 225-239.
150. Verma S., Watt G. M., Mai Z., Hasan T.: *Strategies for enhanced photodynamic therapy effects*, *Photochemistry and Photobiology* **83**, (2007) 996-1005.
151. Vo-Dinh T.: *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press, (2003).
152. Vousden K. V., Lu X.: *Live or let die: the cell's response to p53*, *Nature Reviews Cancer* **2**, (2002) 594-604.
153. Wachowska M., Muchowicz A., Firczuk M., Gabrysiak M., Winiarska M., Wańczyk M., Bojarczuk K., Golab J.: *Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer*, *Molecules* **16**, (2011) 4140-4164.
154. Wainwright M.: *Photosensitisers in Biomedicine*, John Wiley and Sons, (2009).
155. Wang S., Gao R., Zhou F., Selke M.: *Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy*, *Journal of Materials Chemistry* **14**, (2004) 487-493.
156. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B.: *Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution*, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **22**, (1993) 113-262.
157. Williams A. T. R., Winfield S. A., Miller J. N.: *Relative fluorescence quantum yields using a computer controlled luminescence spectrometer*, *Analyst* **108**, (1983) 1067-1071.
158. Wilson B. C., Patterson M. S.: *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*, *Physics in Medicine and Biology* **53**, (2008) R61-R109.
159. Wojtyk J. T. C., Goyan R., Gudgin-Dickson E., Pottier R.: *Exploiting tumour biology to develop novel drug delivery strategies for PDT*, *Medical Laser Application* **21**, (2006) 225-238.
160. Woźniak M., Czyż M.: *Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **62**, (2008) 613-624.
161. Yano S., Hirohara S., Obata M., Hagiya Y., Ogura S., Ikeda A., Kataoka H., Tanaka M., Joh T.: *Current states and future views in photodynamic therapy*,

Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews **12**, (2011) 46-67.

162. Zawacka-Pankau J., Krachulec J., Grulkowski I., Bielawski K. P., Selivanova G.: *The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances*, Toxicology and Applied Pharmacology **232**, (2008) 487-497.

163. Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A., Efremova O., Bonnett R., Songca P., Kassem M.: *Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **33**, (1996) 171-180.

164. Zhang Y., Gorner H.: *Photoprocesses of chlorin e6 bound to lysozyme or bovin serum albumin*, Dyes and Pigments **83**, (2009) 174-179.

165. Zhu T. C., Finlay J. C.: *The role of photodynamic therapy (PDT) physics*, Medical Physics **35**, (2008) 3127-3136.

166. Zieleźnik W., Sieroń A., Cebula W., Adamek M., Padwińska E.: *Terapia fotodynamiczna w gastroenterologii*, Gastroenterologia Polska **6**, (1999) 57-61.

167. Zieliński W., Rajca A.: *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa (1995).

VIII. SPIS TABEL

TABELA 1. Główne zalety i ograniczenia terapii fotodynamicznej. Ograniczenia są sklasyfikowane jako fundamentalne dla idei PDT oraz narzucone przez obecny stan technologii (Wilson, 2008).....	str. 9
TABELA 2. Charakterystyka stanów elektronowych tlenu molekularnego (Bonnett, 2000), (DeRosa, 2002).	str. 15
TABELA 3. Czas życia tlenu singletowego $^1\text{O}_2$ (τ_Δ) w różnych rozpuszczalnikach (Bensasson, 1993), (Bonnett, 2000)	str. 17
TABELA 4. Stałe szybkości reakcji $^1\text{O}_2$ z wybranymi biomolekułami (Graczykova, 1999)	str. 18
TABELA 5. Wybrane własności fotouczulaczy zatwierdzonych do leczenia schorzeń onkologicznych oraz będących w trakcie badań klinicznych (O'Connor, 2009).....	str. 45
TABELA 6. Opis wykorzystanych barwników fluorescencyjnych (Promega)	str. 64
TABELA 7. Wyjaśnienie oznaczeń (*, **, ***, ****) zastosowanych w prezentowanych w pracy wykresach słupkowych. Ilość gwiazdek oznacza poziom istotności statystycznej zgodnie z danymi zamieszczonymi w tabeli.....	str. 66
TABELA 8. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl- <i>c</i> , chl- <i>d</i> , chl- <i>e</i> oraz chl-2 w DMSO.	str. 69
TABELA 9. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl- <i>a</i> i chl- <i>b</i> w PBS.	str. 69
TABELA 10. Położenie pasm absorpcji λ oraz wartości molowych współczynników absorpcji ϵ wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm dla roztworów chl- <i>a</i> i chl- <i>b</i> w PBS z dodatkiem Tritonu-X-100.	str. 74
TABELA 11. Maksimum widma fluorescencji λ_{max} , wartość przesunięcia Stokesa oraz energia stanu singletowego wyznaczone dla roztworów chl- <i>c</i> , chl- <i>d</i> , chl- <i>e</i> i chl-2 w DMSO.	str. 76
TABELA 12. Wartości kwantowej wydajności fluorescencji Φ_f wyznaczone dla roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu w stosunku do TPP....	str. 80
TABELA 13. Wartości średniego czasu życia cząsteczek fotouczulacza w stanie trypletowym w warunkach tlenowych oraz zbliżonych do beztlenowych dla roztworów badanych fotouczulaczy i TPP	

w etanolu. W tabeli przedstawiono także wyznaczonej z równania Sterna-Volmera wartości stałej wygaszania stanu trypletowego przez tlen molekularny.	str. 86
TABELA 14. Wartości kwantowej wydajności generowania tlenu singletowego badanych pochodnych chloryny wyznaczone w etanolu w stosunku do fenalenonu.	str. 88
TABELA 15. Stosunek wartości absorbancji odczytanej dla ostatniego pasma Q po (A) i przed (A_0) naświetleniem roztworów pochodnych chloryny różnymi dawkami promieniowania generowanego przez lampę halogenową z filtrem górnoprzepustowym 630 nm	str. 96
TABELA 16. Wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych pochodnych chloryny.....	str. 109

IX. SPIS RYSUNKÓW

RYSUNEK 1:	Schemat procesów fotofizycznych zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki fotouczulacza	str. 11
RYSUNEK 2:	Schemat reakcji fotochemicznych zachodzących po wzbudzeniu cząsteczki fotouczulacza. Zastosowane oznaczenia: $F(S_0)$ - fotouczulacz w singletowym stanie podstawowym, $F^*(S_1)$ i $F^*(T_1)$ - fotouczulacz we wzbudzonym stanie singletowym S_1 i trypletowym T_1 , S - substrat, F^{*-} - anionorodnik fotouczulacza, S^{*+} - kationorodnik substratu, FH^* i S^* - rodniki odpowiednio fotouczulacza i substratu, O_2^{*-} - anionorodnik ponadtlenkowy	str. 12
RYSUNEK 3:	Schemat powstawania reaktywnych form tlenu podczas jedno-, dwu- oraz trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu (Bartosz, 2008).	str. 13
RYSUNEK 4:	Struktury chemiczne omawianych fotouczulaczy (Hamblin, 2008), (Ethirajan, 2011)	str. 23
RYSUNEK 5:	Budowa chemiczna wybranych fotouczulaczy z grupy porfiryn (Ethirajan, 2011)	str. 25
RYSUNEK 6:	Budowa chemiczna wybranych fotouczulaczy - pochodnych chloryn i bakteriochloryn (Bonnett, 2000), (Ethirajan, 2011), (Wainwright, 2009)	str. 27
RYSUNEK 7:	Budowa chemiczna fotouczulacza Fotosens (Bonnett, 2000)	str. 28
RYSUNEK 8:	Różnice i podobieństwa w morfologii komórek uległych śmierci na drodze trzech podstawowych mechanizmów. Na schemat naniesiono zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające komórki zdrowe (a.) oraz komórki podczas autofagii (b.), apoptozy (c.) i nekrozy (d.). Skala naniesiona na zdjęcia odpowiada 1 μm (Henriquez, 2008), (Edinger, 2004)	str. 35
RYSUNEK 9:	Propagacja światła w tkankach (Agostinis, 2011)	str. 38
RYSUNEK 10:	Widma absorpcji najważniejszych barwników endogennych oraz wody warunkujące położenie tzw. okna terapeutycznego tkanek (600 nm - 1200 nm)	str. 39
RYSUNEK 11:	Struktura chemiczna chl-2 ($C_{41}H_{53}N_5O_5$ M = 695,89 g/mol).	str. 48

RYSUNEK 12:	Struktura chemiczna chl- <i>a</i> (C ₅₁ H ₇₅ N ₇ O ₁₁ M = 962,18 g/mol)	str. 48
RYSUNEK 13:	Struktura chemiczna chl- <i>b</i> (C ₅₃ H ₇₉ N ₇ O ₁₃ M = 1022,23 g/mol)	str. 49
RYSUNEK 14:	Struktura chemiczna chl- <i>e</i> (C ₃₅ H ₃₈ N ₄ O ₆ M = 610,70 g/mol)	str. 49
RYSUNEK 15:	Struktura chemiczna chl- <i>c</i> (C ₄₅ H ₆₀ N ₆ O ₁₂ M = 876,99 g/mol)	str. 50
RYSUNEK 16:	Struktura chemiczna chl- <i>d</i> (C ₄₇ H ₆₄ N ₆ O ₁₄ M = 937,04 g/mol)	str. 50
RYSUNEK 17:	Schemat blokowy spektrometru do laserowej fotolizy błyskowej. I. – wiązka światła wzbudzającego generowana przez laser II. – wiązka analizująca	str. 54
RYSUNEK 18:	Mikroskopowe zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 (a) oraz hct116 p53 ^{-/-} (b)	str. 58
RYSUNEK 19:	Schematyczne przedstawienie grup eksperymentalnych uwzględnionych w badaniach biologicznych	str. 59
RYSUNEK 20:	Lampa halogenowa wykorzystywana do naświetlania	str. 60
RYSUNEK 21:	Mikroskopowy obraz komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 tworzących kolonię potomną. a) powiększenie 100x b) powiększenie 400x	str. 61
RYSUNEK 22:	Metoda wyznaczania parametru IC ₅₀ przy pomocy pakietu GraphPad Prism v.5.0 zastosowana dla jednej z badanych chloryn.	str. 66
RYSUNEK 23:	Schemat poziomów energetycznych oraz widm absorpcji i emisji. Na rysunku zaznaczono w jaki sposób wyznaczono przesunięcie Stokesa oraz energię stanu singletowego S ₁ fotouczulacza - E _s	str. 75
RYSUNEK 24:	Fluorescencja pochodząca od zgromadzonej w komórkach chl-c zarejestrowana po 3,5-godzinnej inkubacji komórek linii hct116 z fotouczulaczem (po prawej) oraz zdjęcie komórek wykonane w technice kontrastu fazowego (po lewej).	str. 101

- RYSUNEK 25: Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116, które po 3,5-godzinnej inkubacji z chl-*c* w różnych stężeniach podano naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) oraz zdjęcia nie traktowanych żadnym czynnikiem komórek kontrolnych. Zdjęcia zarejestrowano po 6 oraz 24 godzinach od zakończenia procedury naświetlania. str. 111
- RYSUNEK 26: Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116, które po 3,5-godzinnej inkubacji z temoporfiną w różnych stężeniach poddano naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) oraz zdjęcia nie traktowanych żadnym czynnikiem komórek kontrolnych. Zdjęcia zarejestrowano po 6 oraz 24 godzinach od zakończenia procedury naświetlania. Na zdjęciach strzałkami zaznaczono: *U* – komórki, które zaczęły się odklejać od podłoża, *A* – komórka którą zakwalifikowano jako ulegającą apoptozie, *N* – komórki, zakwalifikowane jako ulegające nekrozie. str. 112
- RYSUNEK 27: Zdjęcia komórek gruczolaka okrężnicy linii hct116 podanych naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) po 3,5-godzinnej inkubacji z chl-a (B.) oraz zdjęcia grup kontrolnych poddanych jedynie działaniu światła (A.) wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego. Analizę mikroskopową przeprowadzono po 24 godzinach od zakończenia naświetlania. str. 114
- RYSUNEK 28: Zdjęcie (po lewej stronie) komórek białaczki mysiej (L1210) po terapii fotodynamicznej, wykonane przez Kessel i in. Strzałką zaznaczono komórki umierające na drodze autofagii (Au). Dla porównania, po prawej stronie, przedstawiono fragment zarejestrowanego zdjęcia, przedstawiającego komórki linii hct116 po PDT z jedną z badanych chloryn (chl-*c*). Zdjęcie wykonano po 24 godzinach od zakończenia naświetlania. Strzałką zaznaczono komórki zakwalifikowane jako ulegające śmierci na drodze nekrozy (N). str. 114
- RYSUNEK 29: Lokalizacja fotouczulacza w komórkach gruczolaka okrężnicy linii hct116 rejestrowana przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Kolokalizację oceniono po inkubacji komórek z chl-*c* (2,5 μM, 2-godzinna inkubacja) oraz inkubacji z odpowiednim markerem fluorescencyjnym, tj. barwnikiem MitoTracker (A.), barwnikiem ERTracker (B.), barwnikiem Hoechst (C.), barwnikiem LysoTracker (D.). Kanał I.: fluorescencja pochodząca od zgromadzonego w komórkach fotouczulacza; Kanał II.: fluorescencja pochodząca od markera (barwnika fluorescencyjnego); Kanał I. + II.: nałożenie odpowiednich obrazów. str. 118

X. SPIS WYKRESÓW

WYKRES 1:	Widma absorpcji serii roztworów chl- <i>a</i> (A) oraz chl- <i>b</i> (B) w PBS.....	str. 68
WYKRES 2:	Widma absorpcji serii roztworów chl- <i>c</i> (C), chl- <i>d</i> (D), chl- <i>e</i> (E) oraz chl-2 (F) w DMSO.....	str. 68
WYKRES 3:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl- <i>a</i> w buforze fosforanowym. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 646 \text{ nm}$)	str. 71
WYKRES 4:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl- <i>b</i> w buforze fosforanowym. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 646 \text{ nm}$).	str. 71
WYKRES 5:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl- <i>c</i> w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 666 \text{ nm}$)	str. 72
WYKRES 6:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl- <i>d</i> w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 666 \text{ nm}$).....	str. 72
WYKRES 7:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl- <i>e</i> w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 664 \text{ nm}$)	str. 73
WYKRES 8:	Graficzna zależność absorbancji od stężenia wyznaczona na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji serii roztworów chl-2 w DMSO. Wartość absorbancji odczytano dla ostatniego pasma Q ($\lambda = 645 \text{ nm}$)	str. 73
WYKRES 9:	Widma absorpcji serii roztworów chl- <i>a</i> i chl- <i>b</i> w buforze fosforanowym po dodaniu niewielkiej ilości Tritonu-X-100.....	str. 74
WYKRES 10:	Znormalizowane widma wzbudzenia i fluorescencji roztworów chl- <i>c</i> , chl- <i>d</i> , chl- <i>e</i> oraz chl-2 w DMSO	str. 76
WYKRES 11:	Porównanie widm fluorescencji roztworów chl- <i>a</i> i chl- <i>b</i> w buforze fosforanowym przed i po dodaniu Tritonu-X-100.....	str. 77

WYKRES 12:	Znormalizowane widma wzbudzenia i fluorescencji roztworów chl- <i>a</i> i chl- <i>b</i> w PBS z dodatkiem Tritonu-X-100 ...	str. 78
WYKRES 13:	Widma fluorescencji serii roztworów badanych fotouczulaczy w etanolu (długość fali wzbudzenia $\lambda = 400$ nm) oraz wyznaczone na ich podstawie zależność intensywności integralnej od wartości absorbancji	str. 82
WYKRES 14:	Widmo absorpcji UV-VIS oraz widmo absorpcji przejściowej tryplet-tryplet roztworu chl- <i>e</i> w etanolu zarejestrowane po różnych czasach od zadziałania wzbudzającego impulsu laserowego ($\lambda = 355$ nm).	str. 83
WYKRES 15:	Przykładowe krzywe kinetycznego zaniku stanu trypletowego roztworu chl- <i>a</i> w etanolu zmierzone w warunkach tlenowych. Długość fali detekcji wynosiła 450 nm. Zapis kinetyczny został uśredniony z 10 pomiarów.	str. 84
WYKRES 16:	Widma fosforescencji tlenu singletowego dla roztworu związku referencyjnego (fenalenonu) w etanolu zarejestrowane po różnych czasach od zadziałania laserowego impulsu wzbudzającego ($\lambda = 355$ nm).	str. 87
WYKRES 17:	Przykładowa krzywa kinetyczna obrazująca zanik fosforescencji tlenu singletowego zarejestrowana w temperaturze pokojowej dla roztworu chl-2 w etanolu. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm. Detekcja przy $\lambda = 1271$ nm.	str. 89
WYKRES 18:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl- <i>a</i> (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 90
WYKRES 19:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl- <i>b</i> (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 90
WYKRES 20:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl- <i>c</i> (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 91
WYKRES 21:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl- <i>d</i> (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 91
WYKRES 22:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl- <i>e</i> (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 92
WYKRES 23:	Zależność intensywności emisji fosforescencji I_0 od	

	względnej energii lasera wyznaczona dla roztworu chl-2 (■/□) oraz fenalenonu (■/□) w etanolu.	str. 92
WYKRES 24:	Badanie stabilności roztworu chl-c w DMSO ($c = 50 \mu\text{M}$) w ciemności. Widma absorpcji zmierzono dla świeżego roztworu oraz po 24 h, 48 h, 72 h oraz po tygodniu od przygotowania roztworu.	str. 93
WYKRES 25:	Widmo absorpcji roztworu chl-c w DMSO ($c = 20 \mu\text{M}$) zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$)	str. 94
WYKRES 26:	Widmo absorpcji roztworu chl-e ($c = 20 \mu\text{M}$) w DMSO zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).....	str. 94
WYKRES 27:	Widmo absorpcji roztworu chl-2 w DMSO ($c = 20 \mu\text{M}$) zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).	str. 95
WYKRES 28:	Widmo absorpcji roztworu chl-a ($c = 20 \mu\text{M}$) w buforze fosforanowym zarejestrowane po różnych czasach naświetlania światłem czerwonym generowanym przez lampę halogenową ($\lambda \geq 630 \text{ nm}$).	str. 96
WYKRES 29:	Trójwymiarowe wykresy wzbudzenie - emisja roztworów uzyskanych w wyniku lizy komórek kontrolnych (nie traktowanych żadnym czynnikiem) oraz komórek poddanych 3-godzinnej inkubacji z roztworami badanych pochodnych chloryny. Dla grup inkubowanych z fotouczulaczem przy ok. $\lambda = 650 \text{ nm}$ widoczny jest pik wskazujący na obecność fotouczulacza w otrzymanym lizacie (zaznaczono kwadratem). λ - długość fali emisji; λ' - długość fali wzbudzenia	str. 98
WYKRES 30:	Fragmenty trójwymiarowych widm wzbudzenie - emisja roztworów otrzymanych w wyniku lizy komórek inkubowanych z chl-b przez różny czas (po lewej) oraz widma powstałe w wyniku ich przecięcia płaszczyznami $\lambda = 650 \text{ nm}$ (w środku) oraz $\lambda' = 390 \text{ nm}$ (po prawej). λ - długość fali emisji; λ' - długość fali wzbudzenia.....	str. 99
WYKRES 31:	Zależność akumulacji badanych pochodnych chloryny w komórkach linii hct116 od czasu inkubacji wyznaczona na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru lizatów komórkowych. Każdy punkt na wykresie reprezentuje wartość średnią z ośmiu punktów pomiarowych. Błąd wyznaczono ze	

- wzoru na odchylenie standardowe. str. 101
- WYKRES 32: Wyniki testu MTS dla związku referencyjnego. Przeżywalność komórek linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej (a) oraz 24-godzinnej (b) inkubacji z temoporfiną w różnych stężeniach (0,1 μ M ÷ 5 μ M) oraz naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych (dane nie prezentowane)..... str. 102
- WYKRES 33: Cytotoksyczność badanych pochodnych chloryny. Komórki linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} inkubowano z badanymi fotouczulaczami w różnych stężeniach (0,5 μ M ÷ 5 μ M) przez 3,5 godziny w ciemności. Przeżywalność komórek oceniono testem MTS w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych. str. 104
- WYKRES 34: Fototoksyczność badanych pochodnych chloryny: chl-a (a), chl-b (b), chl-c (c), chl-d (d), chl-e (e), chl-2 (f). Przeżywalność komórek linii hct116 oraz hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny w różnych stężeniach (0,5 μ M ÷ 5 μ M) i naświetleniu światłem czerwonym (20 J/cm²) w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych (dane nie prezentowane).. str. 106
- WYKRES 35: Wyniki testu klonogenności. Przeżywalność komórek linii hct116 po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny oraz związkiem referencyjnym (temoporfiną) w stężeniach 0,25 ÷ 2,5 μ M wyznaczona w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych. str. 108
- WYKRES 36: Wyniki testu klonogenności. Przeżywalność komórek linii hct116 p53^{-/-} po 3,5-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi chloryny oraz związkiem referencyjnym (temoporfiną) w stężeniach 0,25 ÷ 2,5 μ M wyznaczona w odniesieniu do niczym nie traktowanych komórek kontrolnych. str. 108

