

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Tomasz Osmałek

**Modyfikowane ftalocyjaniny, porfirazyny
i subftalocyjaniny jako potencjalne
fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek

Poznań 2010

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, fotosensybilizatory,
tlen singletowy, fotostabilność, absorpcja przejściowa

Badania były finansowane w ramach

Grantu KBN nr N N405 180535

Wyniki badań zostały częściowo przedstawione w publikacjach:

1. Tomasz Gośliński, **Tomasz Osmałek**, Jadwiga Mielcarek
Photochemical and spectral characterization of peripherally modified porphyrazines.
Polyhedron 28, 3839 – 3843, 2009
2. Tomasz Gośliński, Ewa Tykarska, Wojciech Szczołko, **Tomasz Osmałek**,
Aleksandra Śmigielska, Stanisław Walorczyk, Hong Zong, Maria Gdaniec,
Brian M. Hoffman, Jadwiga Mielcarek, Stanisław Sobiak
*Synthesis and characterization of peripherally - functionalized porphyrazines
containing mixed pyrrolyl and pyridylmethylamino groups.*
J. Porphyr. Phthalocya. 13, 223-234, 2009

Pani Prof. dr hab. Jadwidze Mielcarek

*za przekazaną wiedzę,
opiekę naukową
oraz cenną pomoc podczas realizacji pracy*

serdecznie dziękuję

Panu dr Tomaszowi Goślińskiemu

*za przekazanie związków do badań,
pomoc w realizacji części praktycznej pracy
oraz liczne dyskusje*

serdecznie dziękuję

Panu dr Piotrowi Fita

*za pomoc w realizacji części praktycznej
pracy oraz cenne wskazówki*

serdecznie dziękuję

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP	9
II.	CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
1.	Terapia i diagnostyka fotodynamiczna	13
1.1.	Historia PDT	13
1.2.	Główne założenia terapii fotodynamicznej	14
1.3.	Mechanizmy działania PDT	17
1.4.	Reaktywne formy tlenu oraz tlen singletowy	19
1.4.1.	Zjawisko generowania tlenu singletowego	21
1.4.2.	Sposoby detekcji tlenu singletowego	22
1.5.	Toksyczność tkankowa i komórkowa PDT	23
1.5.1.	Transport i lokalizacja fotouczulaczy w obrębie tkanek nowotworowych	23
1.5.2.	Biodystrybucja fotosensybilizatorów	24
1.5.3.	Mechanizmy odpowiedzialne za niszczenie struktur nowotworowych	25
1.6.	Ograniczenia terapii fotodynamicznej	26
1.7.	Sposoby zwiększania biodostępności i selektywności fotouczulaczy	28
1.7.1.	Liposomy i emulsje	28
1.7.2.	Lipoproteiny	28
1.7.3.	Przeciwciała monoklonalne	29
1.7.4.	Nanotechnologia w PDT	29
1.8.	Charakterystyka i podział substancji fotouczulających	33
1.8.1.	Cechy idealnego fotouczulacza do PDT	33
1.8.2.	Podział fotouczulaczy	34
1.8.3.	Fotosensybilizatory stosowane w praktyce klinicznej	36
1.9.	Kliniczne możliwości zastosowania terapii fotodynamicznej	37
2.	Ftalocyjaniny, porfirazyny i subftalocyjaniny	40
2.1.	Porównanie budowy chemicznej	40
2.2.	Właściwości spektroskopowe	41
2.2.1.	Elektronowe widma absorpcji	42
2.2.2.	Elektronowe widma emisji	43
2.3.	Trwałość fotochemiczna fotosensybilizatorów	44
III.	CEL I ZAKRES PRACY	49

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	51
A. Aparatura, odczynniki i substancje do badań	51
1. Aparatura	51
2. Odczynniki	51
3. Substancje do badań	53
B. Metodyka i wyniki badań	56
1. Ocena jednorodności próbek ftalocyjanin TG-I-161, TG-I-162 oraz porfirazyny TG-I-123	56
2. Analiza spektralna	59
2.1. Efekty solwatochromowe	59
2.2. Molowe współczynniki absorpcji	70
2.3. Ocena właściwości agregacyjnych	72
2.4. Właściwości emisyjne i wydajność kwantowa fluorescencji	80
3. Ocena zdolności generowania tlenu singletowego	85
3.1. Metodyka pomiaru	85
3.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych oraz wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego	86
4. Ocena trwałości fotochemicznej	96
4.1. Metodyka pomiaru	96
4.2. Ocena jakościowa rozkładu fotochemicznego	96
4.3. Wyznaczenie parametrów kinetycznych rozkładu fotochemicznego	103
5. Pomiar absorpcji przejściowej	107
6. Ocena fototoksyczności ftalocyjaniny TG-I-161	122
6.1. Przygotowanie kultur komórkowych	122
6.2. Ocena toksyczności ciemnej	122
6.3. Ocena toksyczności w warunkach naświetlania	123
6.4. Ocena przeżywalności komórek	124
6.5. Analiza statystyczna	124
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI	126
VI. STRESZCZENIE	146
VII. SUMMARY	148
VIII. SPIS ZAMIESZCZONYCH SKRÓTÓW	150
IX. WYKAZ RYCIN I TABEL	152
1. Wykaz rycin	152
2. Wykaz tabel	157
PIŚMIENNICTWO	159

I. WSTĘP

Powszechnie wiadomo, że światło, będąc źródłem energii, może oddziaływać z materią i istotnie zmieniać właściwości różnych substancji chemicznych. Dobroczynny wpływ promieniowania świetlnego na organizm człowieka zauważono i udokumentowano już w czasach starożytnych. Jednakże pierwsze eksperymenty dotyczące specyficznych efektów terapeutycznych, będących rezultatem interakcji światła oraz substancji fotouczulających, miały miejsce dopiero sto lat temu. Oskar Raab, student z Monachium wykazał, że pewne substancje, takie jak akrydyna czy eozyna generują procesy fototoksyczne w organizmach żywych. Szybko okazało się, że zaobserwowane zjawisko można zastosować między innymi do inaktywacji niektórych bakterii, toksyn i enzymów, a efekt zależy od stężenia tlenu w naświetlanych komórkach. W niedługim czasie przeprowadzono również pierwsze badania nad możliwością leczenia w ten sposób zmian nowotworowych. Jednakże dopiero intensywny rozwój wiedzy, dotyczącej procesów fotofizycznych i fotochemicznych, umożliwił opracowanie technik fototerapeutycznych oraz fotochemioterapeutycznych, spośród których część osiągnęła status szeroko stosowanych terapii klinicznych [1,79,102].

Obecnie istnieją różne sposoby wykorzystania światła w lecznictwie. Fototerapia bazuje na absorpcji światła przez endogenne składniki komórek i tkanek. Natomiast fotochemioterapia wykorzystuje promieniowanie do wzbudzania wprowadzonego do ustroju związku chemicznego [6,79,130].

Do grupy metod fotochemioterapeutycznych należy ciesząca się bardzo dużym zainteresowaniem terapia fotodynamiczna (PDT – ang. *Photodynamic Therapy*). Jest to sposób miejscowego diagnozowania i leczenia zmian chorobowych, przede wszystkim nowotworowych. Skuteczność zależy od obecności trzech elementów, takich jak:

- **barwnik**, zwany fotosensybilizatorem, który uczula tkankę nowotworową na promieniowanie,
- **źródło światła**, emitujące promieniowanie o długości fali zbliżonej do maksimum absorpcji fotouczulacza,
- **tlen**, rozpuszczony w tkankach [4,79].

W pierwszym etapie, tzw. diagnostyce fotodynamicznej (PDD – ang. *Photodynamic Diagnosis*), choremu aplikowany jest odpowiedni fotosensybilizator, który kumuluje się w tkance nowotworowej. Jego selektywne wchłanianie wynika między innymi z szybkich podziałów komórek nowotworowych. Do wzbudzenia fotouczulacza potrzebne jest odpowiednie źródło światła. Najczęściej stosuje się lasery lub specjalne lampy z filtrami, emitujące promieniowanie w zakresie 300-400 nm. Naświetlany fotouczulacz wykazuje czerwoną luminescencję, co pozwala na określenie kształtu, wielkości i położenia zmian chorobowych. Proces ten służy do przeprowadzenia diagnozy, w tym do diagnostyki śródoperacyjnej. Dzięki tej metodzie możliwe stało się wykrywanie nawet drobnych, trudnych do zarejestrowania innymi metodami zmian nowotworowych, które mogą być źródłem przerzutów. PDD pozwala na szybkie wykrycie nowotworu i dzięki temu znacznie skuteczniejsze jego niszczenie [9,18,42,130,145].

Drugim etapem jest właściwa terapia fotodynamiczna, w której stosuje się większe dawki promieniowania niż w PDD. W tym przypadku zlokalizowane wcześniej komórki chorobowe zawierające fotouczulacz, poddaje się działaniu światła widzialnego najczęściej o długości fali 600-800 nm. Pod wpływem promieniowania, fotosensybilizator wytwarza w tkance czynniki toksyczne tj. tlen singletowy i wolne rodniki. Niszczenie komórek może zachodzić wg dwóch mechanizmów. Pierwszy wiąże się z reakcją wzbudzonego fotouczulacza bezpośrednio z substratem, co prowadzi do utworzenia wolnych rodników. Drugi natomiast, polega na bezpośrednim przeniesieniu energii od wzbudzonego stanu trypletowego fotosensybilizatora, do molekuł tlenu z wytworzeniem tlenu singletowego. Obydwa rodzaje wymienionych produktów są bardzo aktywnymi utleniaczami, inicjującymi reakcje prowadzące do destrukcji tkanki. Głównym mechanizmem cytotoksyczności PDT jest uszkodzenie błon komórkowych, błon mitochondriów, lizosomów oraz jądra. Wykazano, że duże stężenie fotouczulacza i krótki czas inkubacji prowadzi do unicestwienia komórek w wyniku nekrozy. Natomiast przy niższych stężeniach fotosensybilizatora i dłuższym czasie inkubacji (24 h), następuje śmierć komórek poprzez mechanizm apoptozy [31,100,130].

Obecnie terapia fotodynamiczna daje najlepsze rezultaty w leczeniu stanów przedrakowych, zlokalizowanych między innymi w obrębie jamy ustnej, przewodu pokarmowego, górnych dróg oddechowych oraz pęcherza moczowego. Szczególne znaczenie ma w leczeniu przelyku Barreta.

Terapia fotodynamiczna jest szczególnie korzystna w sytuacjach, w których niemożliwe jest leczenie chirurgiczne, radiologiczne lub chemioterapia. W wielu krajach europejskich została zatwierdzona także do leczenia bardziej zaawansowanych chorób nowotworowych. Zalicza się do nich: wczesny i nawracający rak pęcherza moczowego, rak przelyku, płuca, szyjki macicy oraz rak skóry. Trwają prace nad zastosowaniem terapii fotodynamicznej, jako uzupełnienia w leczeniu guzów mózgu, międzybłoniaka opłucnej oraz guzów wewnątrztrzewnowych [9,100,146,147,176].

Zwiększanie możliwości zastosowań jak również efektywności PDT, uwarunkowane jest przede wszystkim syntezą nowych fotouczulaczy o określonych właściwościach, odpowiednich dla danej jednostki chorobowej. Potencjalny fotosensybilizator musi spełniać kilka warunków, takich jak:

- wysoka wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego lub rodnikowych form utleniających, będących czynnikami cytotoksycznymi dla komórek nowotworowych;
- odpowiednia lokalizacja w komórce;
- selektywna kumulacja w tkance nowotworowej;
- intensywne pasma absorpcji w "oknach" transmisyjnych tkanki, czyli w obszarze, w którym nie absorbują związki endogenne (600-900 nm);
- brak efektów fototoksycznych w zdrowych tkankach;
- wysoki stopień czystości chemicznej;
- możliwie prosta i wydajna synteza [5,13,27,28,89,95].

Obecnie stosowane fotouczulacze nie są doskonałe. Często pozostają przez długi czas w skórze, powodując przedłużającą się nadwrażliwość na światło słoneczne. Ponadto, ze względu na różną strukturę tkanek nowotworowych, nie są związkami uniwersalnymi i różnią się skutecznością leczenia poszczególnych jednostek chorobowych. Wybiórczość działania jest z reguły niewystarczająca. Dlatego prowadzone są badania nad otrzymaniem nowych fotosensybilizatorów o większej selektywności, skuteczności i mniejszych efektach ubocznych. Wzrost skuteczności można osiągnąć poprzez zwiększenie wydajności kwantowej wzbudzenia tlenu singletowego oraz przez przesunięcie maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych, co pozwala na lepszą penetrację światła w głąb tkanek. Natomiast zmniejszenie skutków

ubocznych, jest możliwe poprzez skrócenie czasu półtrwania w tkankach i obniżenie klirensu osoczowego [5,10,29,31,59,100].

Do niedawna w większości terapii fotodynamicznych stosowano jako fotosensybilizatory głównie porfiryny pochodzenia naturalnego. Wykazano, że barwniki z tej grupy kumulują się selektywnie w tkance nowotworowej, jednak w niewystarczającym stopniu spełniają wymienione powyżej kryteria optyczne [17,95,130].

Z tego względu w ostatnim czasie nowych fotouczulaczy poszukuje się wśród syntetycznych pochodnych porfiryn. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się takie barwniki jak porfirazyny, ftalocyjaniny lub subftalocyjaniny. Wykazano, że korzystniejsze parametry fizykochemiczne oraz fotochemiczne wymienionych substancji mogą być efektem zamiany mostków metinowych na ugrupowania azowe. Ponadto w porównaniu z porfirynami posiadają zdecydowanie większą zdolność włączania jonów metali do centrum układu, co jest skutkiem silniejszych właściwości σ -donorowych i π -akceptorowych [2,11,20,37,45,89,166].

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2. Terapia i diagnostyka fotodynamiczna

1.1. Historia PDT

Promieniowanie słoneczne wykorzystywano w medycynie i farmacji od tysięcy lat. Dowody na korzystny wpływ światła w odniesieniu do niektórych schorzeń, można znaleźć między innymi w dziełach medycznych pochodzących ze starożytnego Egiptu, Indii oraz Chin. Już wtedy zauważono, że wiele substancji chemicznych pod wpływem promieniowania wywiera swoisty wpływ na organizm człowieka.

Pierwszym naukowym doniesieniem na temat zjawiska fotodynamicznego był opis doświadczenia, sporządzony w Monachium przez studenta medycyny, Oscara Raaba. W roku 1900 opisał on eksperyment, w którym uśmiercono kolonię pantofelków wykorzystując w tym celu barwniki akrydynowe oraz promieniowanie o długości fali odpowiadającej barwie czerwonej. Doniesienia te wzbudziły zainteresowanie profesora von Tappeinera, który wspólnie z dermatologiem, doktorem Jesionkiem, po raz pierwszy zastosował eozynę jako "fotouczulacz" do terapii nowotworów skóry. Wraz z rozwojem badań na temat terapii fotodynamicznej, pojawiało się coraz więcej systematycznych doniesień, dotyczących substancji fotouczulających. Mimo, że obecność hematoporfiryny we krwi stwierdzono już w roku 1841 (Sherer), a właściwości fluorescencyjne opisano 26 lat później, aktywność fotouczulająca tego barwnika została odkryta dopiero w roku 1911 przez Hausmanna. Opisał on również reakcje fototoksyczne występujące u myszy, przeprowadzając podział na ostre, podostre i chroniczne. Natomiast już w roku 1913, niemiecki naukowiec Meyer-Betz, celem oceny wpływu efektów fotouczulających na organizm człowieka, wstrzyknął sobie dożylnie 200 mg hematoporfiryny, po czym przez kilka godzin eksponował ciało na działanie światła słonecznego. Efektem przeprowadzonego doświadczenia były wyraźne reakcje fototoksyczne oraz intensywna opuchlizna. Kolejne publikacje na temat diagnostyki fotodynamicznej, ukazały się jednak dopiero w roku 1942, kiedy to dwaj berlińscy naukowcy Auler i Banzer, przeprowadzili szczegółową ocenę procesów akumulacji i fluorescencji porfiryn, podawanych egzogennie do organizmu. W roku 1948 Figge i Weiland przeprowadzili szeroko zakrojone badania, dotyczące możliwości wykorzystania różnych pochodnych porfirynowych w terapii i diagnostyce

fotodynamicznej. Oceniali między innymi skuteczność takich związków jak hematoporfiryna, koproporfiryna, protoporfiryna i hematoporfiryna cynkowa.

W wyniku bardzo intensywnego rozwoju badań już 70 lat po pierwszych eksperymentach von Tappeinera i Jesionka, zaczęto rozważać wprowadzenie PDT do leczenia klinicznego. W roku 1972 na łamach czasopisma *The Lancet*, pojawiła się pierwsza publikacja (*Photodynamic therapy of malignant tumours.*), której autorzy bezsprzecznie sugerowali, że hematoporfiryna może zostać wykorzystana do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych.

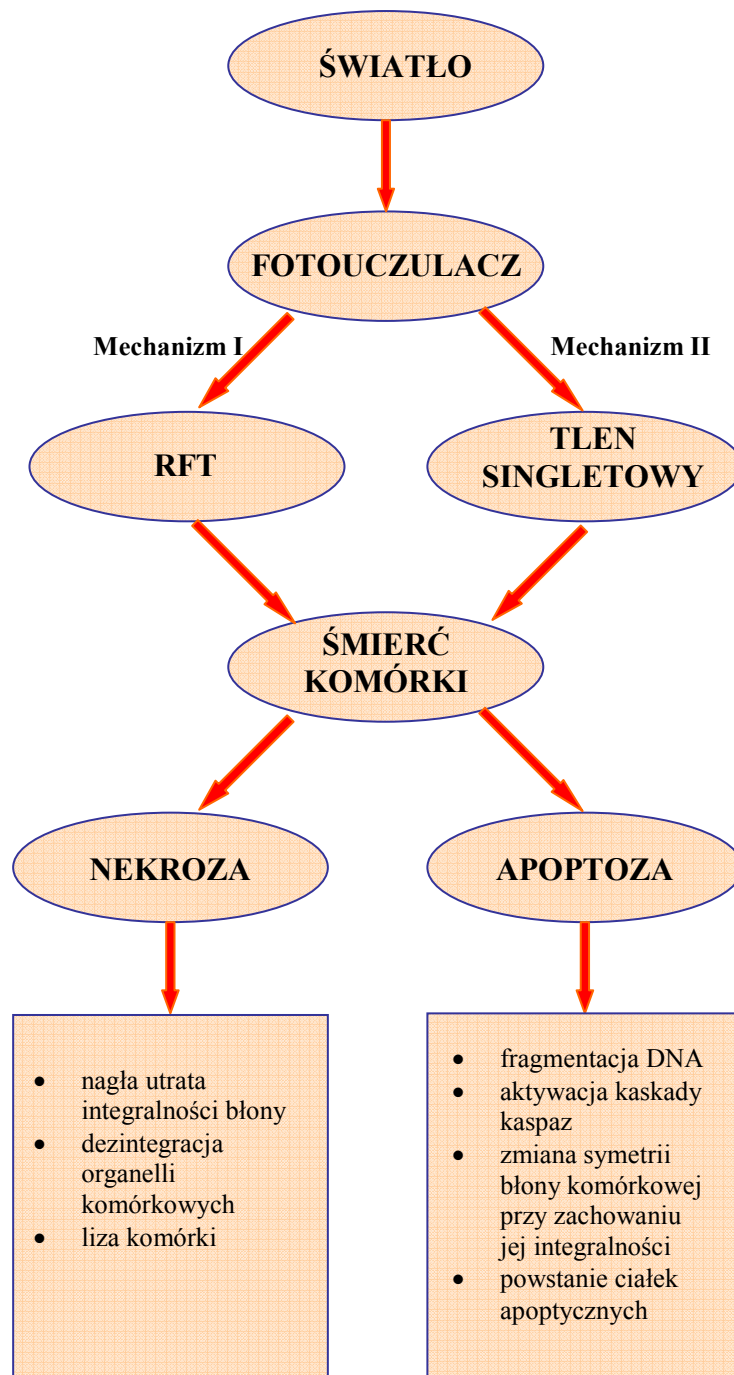
Trzy lata później wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez badaczy z Roswell Park Cancer Institute w Buffalo (USA), okrzyknięto kamieniem milowym w zakresie rozwoju badań nad PDT. Po raz pierwszy odnotowano udany przypadek wyleczenia nowotworu u myszy, z wykorzystaniem pochodnej hematoporfiryny. Po testach na zwierzętach przyszedł czas na ocenę skuteczności PDT u ludzi. Już w roku 1976 Kelly i Snell, ocenili wpływ efektu fotodynamicznego na nowotwory pęcherza moczowego. Natomiast dwa lata później Dougherty, poddał naświetlaniu 25 pacjentów, na których skórze odnotowano obecność 113 miejsc zmienionych nowotworowo. Skuteczność leczenia była zdumiewająca; jedynie 2 obszary pozostały całkowicie obojętne na terapię. Wkrótce zastosowanie PDT rozszerzono do leczenia nowotworów płuc, przełyku, narządów rodnych, mózgu oraz głowy i szyi [1,5,6,79,96,103,142,151,161].

1.2. Główne założenia terapii fotodynamicznej

Współczesna onkologia dysponuje wieloma tradycyjnymi metodami walki z chorobami nowotworowymi. Do najczęściej wykorzystywanych i najlepiej poznanych należą chirurgia oraz radio- i chemioterapia. Z powodzeniem stosowane są również hormonoterapia, terapia genowa, immunoterapia czy krioterapia. Leczenie operacyjne nie zawsze pozwala na całkowite usunięcie wszystkich komórek nowotworowych. Próby zniszczenia obszarów objętych zmianami chorobowymi, są często obciążone ryzykiem uszkodzenia tkanek zdrowych, co znacznie wydłuża okres rekonwalescencji pacjentów. Dlatego też istotnym problemem w zakresie leczenia nowotworów było opracowanie metody terapeutycznej, umożliwiającej selektywne i efektywne niszczenie komórek nowotworowych, bez wpływu na funkcjonowanie tkanek zdrowych [4,5,68].

PDT jest procedurą kilkietapową, której skuteczność opiera się na indukowaniu reakcji fotocytotoksycznych, będących wynikiem aktywacji światłem, zaaplikowanego

wcześniej fotouczulacza (Ryc. 1). W efekcie dochodzi do zniszczenia struktur komórkowych w obszarze zmian patologicznych [64,96,155].



Ryc. 1. Etapy PDT oraz mechanizmy prowadzące do śmierci komórek nowotworowych (RFT = reaktywne formy tlenu)

Podany dożylnie lub śródtkankowo fotouczulacz pochłaniany jest przez wszystkie komórki. Z tkanek zdrowych jest z reguły usuwany po kilkunastu godzinach, natomiast w tkankach nowotworowych pozostaje nawet przez kilka dni. Przyczyna selektywnego gromadzenia się barwników nie została do końca wyjaśniona. Barwniki wykorzystywane w metodach fotodynamicznych mają tendencję do tworzenia agregatów oraz dimerów o charakterze hydrofobowym, co tłumaczy ich powinowactwo do obszarów o podwyższonej zawartości cholesterolu i lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Mnożące się komórki nowotworowe, potrzebują do budowy błon komórkowych dużych ilości LDL oraz cholesterolu, co przyczynia się prawdopodobnie do akumulacji w nich fotouczulaczy. Ponadto, słabo wykształcony system naczyń limfatycznych, utrudnia procesy wydalania związków z miejsc zmienionych chorobowo, co sprawia, że ich stężenie jest kilka razy większe niż w tkance zdrowej [5,31,32,33,91,155].

Pierwszym etapem PDT jest tzw. diagnostyka fotodynamiczna (PDD; *Photodynamic Diagnosis*), której istotą jest detekcja światła emitowanego z komórek nowotworowych przez wzbudzone związki chemiczne. W procesie tym wykorzystuje się autofluorescencję, czyli emisję promieniowania pochodzącego od substancji endogennych (zwłaszcza układów porfiryńowych). Drugą możliwością jest ocena fluorescencji substancji fotouczulających podanych zewnętrznie. W tym przypadku najczęściej stosowaną grupą fotosensybilizatorów są pochodne porfiryńowe. Świecenie tkanek pod wpływem promieniowania o określonej długości fali, umożliwia ocenę ich stanu, poprzez analizę różnicy intensywności fluorescencji miejsc zdrowych i zmienionych nowotworowo [18,42,96,141,146].

Obserwacja autofluorescencji tkanek wykazała, że w komórkach zmienionych chorobowo występuje mniejsze natężenie emisji promieniowania w porównaniu z komórkami zdrowymi. Wynika to z różnego ukrwienia tkanek oraz z rozbieżnej zawartości zredukowanej i utlenionej formy nukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH i NAD⁺). Parenteralne podanie barwnika umożliwia wzmocnienie fluorescencji naświetlanego obszaru. Najczęściej w tym celu stosuje się światło o długości fali 400-410 nm. Szczególnie intensywną emisję promieniowania można obserwować na obrzeżach nowotworu, czyli w miejscu gdzie proliferacja komórek jest największa. Mimo, że fluoryzujące zmiany są widoczne gołym okiem, w celu dokładnej oceny analizuje się obrazy uzyskane za pomocą kamer o wysokiej rozdzielczości [18,29,119].

Drugim etapem leczenia jest właściwa terapia fotodynamiczna, w której nowotwór naświetla się większymi dawkami światła widzialnego z zakresu

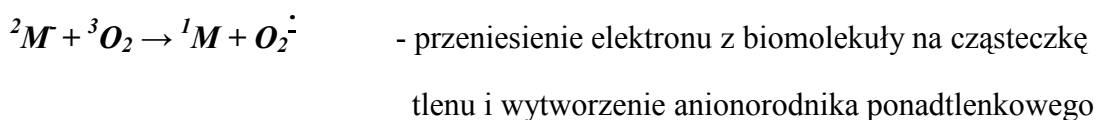
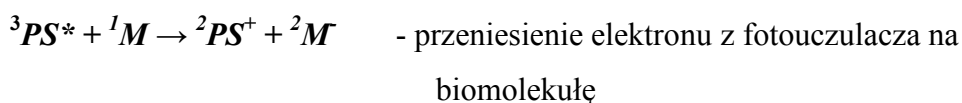
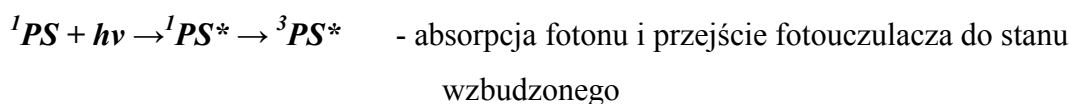
600-800 nm. Po absorpcji światła fotosensybilizator inicjuje szereg reakcji chemicznych, które prowadzą do bezpośredniej lub pośredniej produkcji wolnych rodników lub tlenu singletowego, które niszczą komórkę nowotworową [68].

1.3. Mechanizmy działania PDT

Proces niszczenia komórek nowotworowych metodą fotodynamiczną, zależny jest od stężenia tlenu w środowisku reakcji i zachodzi według dwóch głównych mechanizmów.

- **mechanizm I**

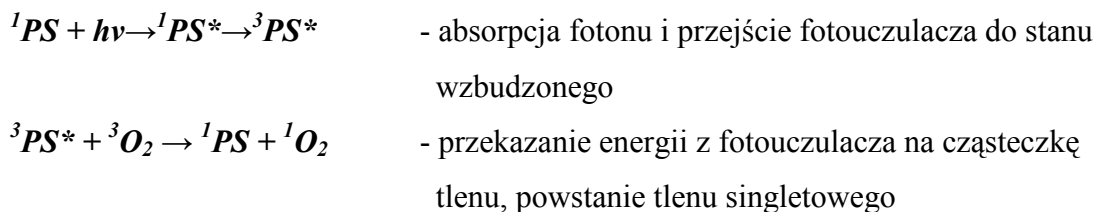
Absorpcja fotonu przez cząsteczkę fotouczulacza (PS, ang. *photosensitizer*) powoduje jego wzbudzenie i przejście z singletowego stanu podstawowego (S_0) do stanu singletowego wzbudzonego (S_1). Następnie w wyniku bezpromienistego przejścia interkombinacyjnego, fotosensybilizator przechodzi do wzbudzonego stanu trypletowego (T_1). W tej postaci może wzbudzać biomolekuły, znajdujące się w jego bezpośrednim otoczeniu. Następnie nadmiar energii jest przekazywany na cząsteczkę tlenu. W efekcie powstają reaktywne formy tlenu (RFT), które niszczą tkankę nowotworową w procesie utleniania (Ryc. 2).



- **mechanizm II**

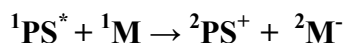
Przyjmuje się, że mechanizm II jest dominującym i najważniejszym procesem warunkującym skuteczność PDT. Po absorpcji fotonu i przejściu fotosensybilizatora do

wzbudzonego stanu trypletowego, dochodzi do przekazania energii bezpośrednio na cząsteczkę tlenu. W wyniku tego powstaje tlen singletowy, charakteryzujący się stosunkowo długim czasem życia oraz wyjątkowo silnymi właściwościami utleniającymi (Ryc. 2).

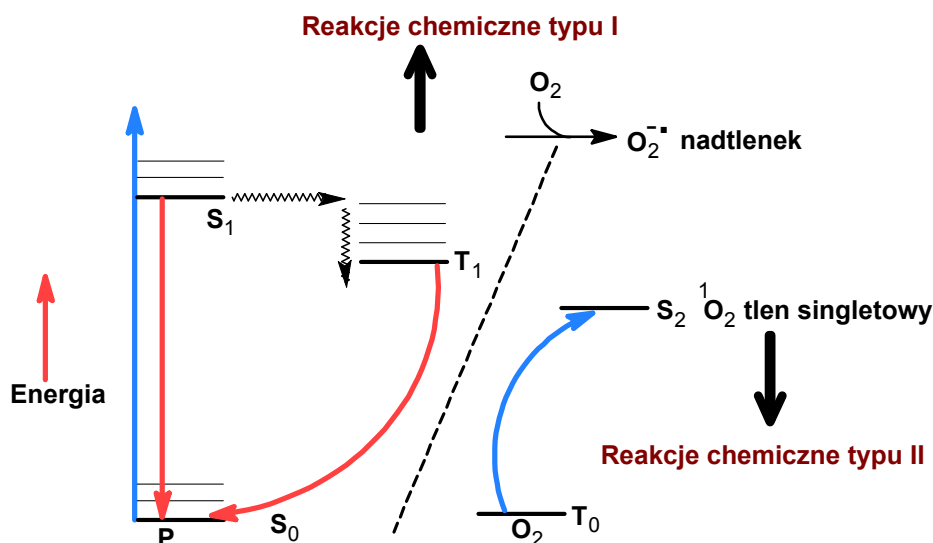


Stosunek udziału tych dwóch mechanizmów zależy od wielu czynników, takich jak: stężenie tlenu, stałe dielektryczne tkanek, pH środowiska, a także struktura barwnika.

W niektórych pracach na temat PDT wymienia się również trzeci mechanizm. W tym przypadku fotouczulacz będący we wzbudzonym stanie singletowym, reaguje bezpośrednio z biomolekułami i powstają różne fotoaddukty.



Mechanizm ten jest bardzo często pomijany, gdyż przeniesienie elektronów pomiędzy biomolekułą i PS z wytworzeniem wolnych rodników, jest mało efektywne termodynamicznie. Korzystniejsza jest natomiast reakcja powrotu reagentów do stanu podstawowego. W tym przypadku przebieg reakcji nie zależy od stężenia tlenu cząsteczkowego [31,32,33,96,155,162].



Ryc. 2. Przemiany energetyczne fotouczulaczy

1.4. Reaktywne formy tlenu oraz tlen singletowy

Tlen cząsteczkowy w podstawowym stanie trypletowym, posiada dwa niesparowane elektrony na antywiążących orbitalach *p*. Niewielka aktywność takiej formy wynika między innymi z faktu, że cząsteczki większości potencjalnych reagentów posiadają elektrony sparowane, czyli występują w stanie singletowym. Jak wspomniano wcześniej, cząsteczki fotouczulacza po aktywacji światłem o odpowiedniej długości fali, ulegają wzbudzeniu i wówczas są zdolne do przekazania energii innym molekułom. Jeżeli akceptorem energii jest tlen cząsteczkowy, może dojść do powstawania wysoce reaktywnych, toksycznych dla komórek form tlenu [13,65,175].

Reaktywne formy tlenu (RFT) są produktami jedno-, dwu- lub trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Wykazują większą aktywność chemiczną, aniżeli cząsteczka tlenu w stanie podstawowym. Można wśród nich wyróżnić:

- **wolne rodniki:** hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), alkoksyłowy ($\text{RO}\cdot$), nadtlenukowy ($\text{ROO}\cdot$), tlenek azotu ($\text{NO}\cdot$), wodoronadtlenkowy ($\text{HO}_2\cdot$), anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2\cdot^-$)

oraz

- **nadtlenki:** nadtlenek wodoru (H_2O_2), nadtlenki organiczne (ROOR) [15,175].

Generowanie form wolnorodnikowych oraz nadtlenków zachodzi przede wszystkim w warunkach obniżonego stężenia tlenu w środowisku reakcji. Powstają głównie w wyniku przeniesienia wodoru lub elektronu, między cząsteczką wzbudzonego barwnika, a tkanką nowotworową, w której przebiega reakcja fotochemiczna [65].

Tlen singletowy jest jednym z najbardziej aktywnych produktów pośrednich reakcji chemicznych i procesów biochemicznych. Jego istnienie odkryto po raz pierwszy w roku 1924 i zdefiniowano jako „*bardziej reaktywną formę tlenu*”. Główną drogą prowadząca do jego powstawania są reakcje fotosensybilizacji. W roku 1931 Kautsky po raz pierwszy zasugerował, iż tlen singletowy może być pośrednim produktem reakcji fotoutleniania z udziałem światłoczułych barwników. W wyniku intensywnych badań udowodniono, że cząsteczka tlenu singletowego, może reagować z biomolekułami takimi jak DNA, białka i lipidy [175].

Znane są dwie odmiany tlenu singletowego, różniące się przede wszystkim energią, jak również okresem półtrwania w środowisku wodnym:

$^1\Delta_g$ - Pierwszy stan wzbudzony

Energia tej postaci jest wyższa od energii stanu podstawowego o 22 kcal/mol. W takiej formie cząsteczka tlenu posiada elektrony sparowane w obrębie tego samego orbitalu.

$^1\Sigma_g^+$ - Drugi stan wzbudzony

Jest określany jako wyższy stan singletowy. Odznacza się energią wyższą od stanu podstawowego o 37 kcal/mol. W tym przypadku sparowane elektrony znajdują się na dwóch różnych orbitalach. Ta forma ulega jednoelektronowym reakcjom wolnorodnikowym.

Ze względu na brak niesparowanych elektronów, obie opisane formy tlenu singletowego, nie mogą być zaliczone do wolnych rodników. Brak ograniczenia spinowego charakterystycznego dla przedstawionych cząsteczek, znajduje wyraźne odzwierciedlenie w silnych właściwościach utleniających obu odmian. Wykazano również, że forma $^1\Sigma_g^+$ ma znacznie krótszy czas życia niż $^1\Delta_g$ ze względu na

zdecydowanie większą reaktywność. Parametry wymienionych postaci tlenu przedstawiono w Tabeli 1.

Stan energetyczny cząsteczki tlenu	Sposób wypełnienia najwyższych orbitali	Czas półtrwania [s]	Energia powyżej stanu podstawowego [kcal/mol]
Drugi stan wzbudzony $^1\Sigma_g^+$	↑ ↓	$< 10^{-11}$	37
Pierwszy stan wzbudzony $^1\Delta_g$	↑↓	$2 \cdot 10^{-6}$	22
Stan podstawowy $^3\Sigma_g^-$	↑ ↑	---	0

Tabela 1. Orientacja spinów elektronowych, czas półtrwania oraz energia poszczególnych form tlenu cząsteczkowego [175]

Reakcje tlenu singletowego z innymi cząsteczkami przebiegają z reguły na drodze przekazywania energii wzbudzenia, czego wynikiem jest powrót do podstawowego stanu trypletowego. Ponadto tlen singletowy może wchodzić w reakcje chemiczne ze związkami organicznymi, a do najlepiej poznanych należą procesy addycji oraz utleniania. W odniesieniu do organizmów żywych, toksyczność tlenu singletowego wynika głównie z wysokiej reaktywności w odniesieniu do białek zawierających takie aminokwasy jak histydyna, metionina, tryptofan, tyrozyna oraz cysteina. Zdecydowanie częściej uszkodzeniu ulegają również fragmenty DNA, w których przeważają reszty guaninowe oraz biomolekuły posiadające w swojej strukturze inne pochodne purynowe [175].

1.4.1. Zjawisko generowania tlenu singletowego

Tlen singletowy jest generowany w wyniku reakcji wywołanych światłem widzialnym i promieniowaniem nadfioletowym, ale może także powstawać w konsekwencji procesów przebiegających bez udziału światła. W warunkach fizjologicznych jest wytwarzany przez pobudzone fagocyty. Może być również jednym z produktów reakcji ozonu ze związkami obecnymi w komórkach. Z reguły nie występuje jednak w organizmie w ilościach fizjologicznie istotnych. Jedną z chorób związanych bezpośrednio z produkcją tlenu singletowego jest porfiria, będąca skutkiem

defektu metabolizmu porfiryn, które w dużych ilościach gromadzą się w skórze. Nawet krótka ekspozycja na światło może wówczas prowadzić do silnych reakcji fototoksycznych. Poza tym liczne substancje lecznicze również wykazują działanie światłouczulające, a tlen singletowy będący mediatorem reakcji, prowadzi do silnych efektów ubocznych. Lekami takimi są między innymi pochodne fenotiazyny, antybiotyki z grupy tetracyklin, chemioterapytyki (fluorochinolony), neuroleptyki, diuretyki tiazydowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne oraz antydepresanty [57,62,158,165].

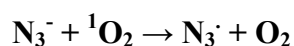
Generowanie tlenu singletowego może zachodzić na drodze fizycznej, jak również w wyniku reakcji chemicznej. Głównym szlakiem fizycznym jest opisane wcześniej zjawisko fotodynamiczne. Innym sposobem generowania tlenu singletowego jest zastosowanie mikrofal lub fal o częstotliwości radiowej, które generują do 10% tlenu singletowego w atmosferze tlenowej [44,175].

1.4.2. Sposoby detekcji tlenu singletowego

Spośród sposobów wykrywania obecności tlenu singletowego do najbardziej znanych zalicza się metody wykorzystujące:

- **Zmiatacze tlenu singletowego**

Zmiatacze to cząsteczki, które mogą hamować reakcje indukowane przez tlen singletowy. Przykładem są azydki, określane mianem zmiataczy fizycznych. Poprzez reakcję z tlenem ulegają przekształceniu do rodników azydkowych zgodnie ze schematem:



W podobnym celu wykorzystuje się również tak zwane zmiatacze chemiczne, czyli substancje takie jak karoten, kwas askorbinowy, tiol lub histydyna.

- **Wygaszacze tlenu singletowego**

Wygaszanie jako proces dezaktywacji stanu wzbudzonego, który może przebiegać według mechanizmu fizycznego lub chemicznego. Wygaszanie fizyczne

zachodzi bez tworzenia produktów. Natomiast na drodze chemicznej tlen singletowy może reagować z wygaszaczem (R), dając jako produkt cząsteczkę o ogólnej strukturze RO₂.

Znane są dwa główne mechanizmy wygaszania poprzez:

i) transfer energii

Jest to reakcja odwrotna do procesu powstawania tlenu singletowego. W tym przypadku wygaszacz przechodzi w stan trypletowy, natomiast tlen wraca do poziomu podstawowego.

ii) transfer ładunku

Ten mechanizm opiera się na interakcji tlenu singletowego, wykazującego właściwości elektronobiorcze, z wygaszaczem dysponującym wolnymi elektronami. W efekcie tworzy się kompleks typu *charge transfer*, w którym nie obowiązują ograniczenia związane z przejściem interkombinacyjnym. Dysocjacja takiego kompleksu prowadzi również do powstania tlenu w stanie podstawowym [13,175].

1.5. Toksyczność tkankowa i komórkowa PDT

1.5.1. Transport i lokalizacja fotouczulaczy w obrębie tkanek nowotworowych

Po wprowadzeniu fotosensybilizatora do krwioobiegu rozpoczyna się seria procesów, które mają różny czas trwania. Bezpośrednio po aplikacji, szybkość z jaką ustala się stan równowagi ze składnikami obecnymi w układzie krążenia, zależy w dużej mierze od zastosowanego rozpuszczalnika lub nośnika. Po rozpuszczeniu lub uwolnieniu z nośnika, następuje przyłączenie PS do białek surowicy, erytrocytów lub leukocytów. Ponadto krążący w krwioobiegu barwnik może wiązać się ze ścianami naczyń krwionośnych, których wymiary oraz właściwości fizjologiczne różnią się w zależności od organu docelowego. Przypuszcza się, że bezpośrednia penetracja PS, zależy od siły oddziaływania z ich powierzchnią. Im mniejsze powinowactwo, tym szybszy i wydajniejszy transport [40]. Po dotarciu do miejsca docelowego uwolniony z krwioobiegu PS, rozprasza się na drodze osmozy w tkance łącznej organów. Po spełnieniu funkcji terapeutycznej musi ulegać możliwie szybkiej eliminacji. Z tkanek

nowotworowych lub narządów nie posiadających aktywności metabolizowania, usuwanie odbywa się głównie na drodze limfatycznego odwodnienia. Jeśli natomiast dany PS przedostanie się do wątroby lub innego organu posiadającego aktywność metabolizowania, może ulegać przemianom pod wpływem enzymów. Ogólnie przyjęto, że większość znanych fotouczulaczy wydalą się z organizmu razem z żółcią. Badanie farmakokinetyki fotosensybilizatorów wymaga konsekwentnego pomiaru stężenia w tkankach i innych płynach ustrojowych. Często analiza polega na pobieraniu próbek krwi i określaniu czasu półtrwania w surowicy. Można też oznaczać stężenie w moczu lub kale. Metody takie wymagają opracowania procedur ilościowej analizy w próbkach materiału biologicznego. Zwykle po homogenizacji stężenie PS analizuje się poprzez pomiar fluorescencji [32,33,87].

1.5.2. Biodystrybucja fotosensybilizatorów

W wyniku badań przeprowadzonych na małych zwierzętach (myszy i szczury) najwyższy poziom fotouczulaczy stwierdzono w wątrobie. Udowodniono również, że stężenie sulfonowanych ftalocyjanin w tym narządzie, jest odwrotnie proporcjonalne do stopnia sulfonowania oraz lipofilności PS. Wątroba charakteryzuje się dużym przepływem krwi. Posiada również pory, dzięki którym cząsteczki mogą w łatwy sposób opuścić naczynia krwionośne, a następnie z żółcią przedostać się do dwunastnicy [32,33,96].

Analizując losy PS w organizmie zauważono, że po podaniu dożylnym możliwa jest również kumulacja w płucach oraz śledzionie. Woodburn i wsp. badali porfiryny posiadające różne współczynniki podziału oktanol/woda. Wykazali, że kumulacja w śledzionie jest porównywalna z innymi narządami. Egorin i wsp. z kolei porównując dystrybucję jednakowych dawek porfiryn w różnych rozpuszczalnikach stwierdzili, że kumulacja w tym organie jest bardzo zróżnicowana. Okazało się, że również nerki oraz pęcherz moczowy mają zdolność kumulowania dużych ilości PS. Z kolei organy układu pokarmowego (żołądek, jelito cienkie i grube), zaliczono do narządów ze średnią kumulacją PS (więcej niż wątroba, mniej niż mięśnie). Pomimo, że efekty uboczne terapii fotodynamicznej związane są głównie z odczynami fotoalergicznymi i nadwrażliwością na promieniowanie słoneczne, skóra kumuluje niewielkie ilości PS. Najmniejsze ilości natomiast znaleziono w tzw. „suchych” narządach, do których zalicza się serce, mięśnie szkieletowe, oczy oraz mózg. Większość stosowanych w PDT

fotocuczulaczy charakteryzuje się dużą lipofilnością, dlatego opracowując ich postać leku, istnieje konieczność łączenia z odpowiednimi nośnikami, które zwiększą rozpuszczalność w wodzie i ułatwią transport z układu krążenia do tkanki nowotworowej. Idealny nośnik powinien umożliwić selektywną kumulację fotocuczulacza w tkance nowotworowej, nie może również obniżać aktywności leku, musi być nietoksyczny i biodegradowalny [96,105].

1.5.3. Mechanizmy odpowiedzialne za niszczenie struktur nowotworowych

Główną przyczyną toksyczności PDT jest uszkodzenie struktur komórkowych, mitochondriów, lizosomów oraz jądra. Oksydacyjne uszkodzenie lipidów błon komórkowych, prowadzi do zerwania integralności i zwiększenia przepuszczalności [97].

W procesie niszczenia tkanki nowotworowej z wykorzystaniem PDT, główną rolę odgrywają trzy podstawowe zjawiska:

I. Bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych; w tym przypadku mechanizm fotodynamiczny jest niewystarczający dla całkowitego wyleczenia. Spośród głównych ograniczeń można wymienić:

- nierównomierne rozmieszczenie fotosensybilizatora w tkance nowotworowej,
- dostępność tlenu w tkankach poddanych PDT (wszystkie efekty PDT zależne są od obecności tlenu w komórkach, z tego powodu w przypadku niedotlenienia terapia jest nieefektywna). Podczas choroby nowotworowej często występuje niedokrwistość, co doprowadza do upośledzonego dostarczania tlenu do tkanek. Aby przywrócić skuteczność PDT, przed naświetlaniem guza podaje się rekombinowaną erytropoetynę, która wzmacnia wytwarzanie krwinek czerwonych w szpiku.

II. Uszkodzenie naczyń krwionośnych; w rezultacie następuje zahamowanie transportu składników odżywczych do tkanki nowotworowej.

III. Aktywacja odpowiedzi przeciwnowotworowej układu immunologicznego; polega w pierwszej kolejności na wywołaniu zmian w błonie komórkowej. Efektem jest

aktywacja licznych fosfolipaz, które powodują zwiększoną degradację fosfolipidów i uwolnienie czynników zapalnych. Efektorami układu immunologicznego są także makrofagi, które fagocytują liczne, obumarłe komórki nowotworowe.

Każdy z tych mechanizmów może wywierać wpływ na pozostałe, tworząc dość skomplikowaną sieć wzajemnych zależności. W przypadkach integracji tych trzech mechanizmów, udaje się skutecznie leczyć nawet zaawansowane stadia nowotworów [32,33,64].

Śmierć komórek nowotworowych w wyniku PDT jest wynikiem dwóch procesów: nekrozy lub apoptozy. Nekroza (martwica) to bierny, niespecyficzny proces kataboliczny. Spowodowana jest działaniem takich czynników jak wysoka temperatura, ciśnienie lub pH, które w sposób nieodwracalny uszkadzają funkcje komórek. Apoptoza, natomiast w odróżnieniu do nekrozy to proces czynny, definiowany jako zaprogramowana śmierć komórki. Sposób w jaki komórka ulegnie unicestwieniu zależy od rodzaju i stężenia PS, dawki promieniowania oraz fazy cyklu komórkowego. Duża dawka fotouczulacza oraz krótki czas inkubacji, prowadzi zwykle do uszkodzenia błony komórkowej i nekrozy. Natomiast przy niższych stężeniach fotosensybilizatora oraz dłuższym czasie inkubacji (24 h), przeważa mechanizm apoptozy. Wówczas w wyniku uszkodzenia retikulum endoplazmatycznego, wzrasta stężenie wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , z uszkodzonych mitochondriów uwolniony zostaje cytochrom c oraz zachodzi aktywacja kaskady kaspaz [33,96].

1.6. Ograniczenia terapii fotodynamicznej

Jednym z najważniejszych ograniczeń terapii fotodynamicznej jest zbyt niska selektywność stosowanych fotouczulaczy. Jak wspomniano wcześniej, poza tkankami docelowymi barwniki mogą kumulować się w narządach zdrowych, między innymi w skórze lub oczach [5]. Stężenia jakie tam osiągają nie są wysokie, ale wystarczające aby wywołać niebezpieczne reakcje fototoksyczne, nawet kilkadziesiąt dni po zakończeniu leczenia. Dlatego też okres rekonwalescencji jest z reguły bardziej uciążliwy i niebezpieczny dla pacjenta niż właściwa terapia. Aby skutecznie wyeliminować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, należy całkowicie zmienić tryb życia. Zaleca się przebywanie w zaciemnionych pomieszczeniach, dopuszczalne jest używanie żarówek o bardzo niskiej mocy. Niewskazane jest oglądanie telewizji. Wychodząc na zewnątrz należy zadbać o dokładne osłonięcie całego ciała, pamiętając

o założeniu okularów przeciwsłonecznych i nakryciu głowy. W przypadku najbardziej znanego i stosowanego od lat 70-tych, preparatu o nazwie Photofrin, szczególne względy bezpieczeństwa muszą być zachowane przez okres 30 dni po podaniu leku. Jeżeli natomiast wątroba osoby leczonej nie funkcjonuje w sposób prawidłowy, czas może ulec wydłużeniu nawet do trzech miesięcy. Oprócz nadwrażliwości na światło, należy poinformować pacjenta o możliwości wystąpienia trudności w oddychaniu, jak również bólu w klatce piersiowej. Często pojawiającym się objawem jest również zwężenie światła przełyku [34,64].

Nieco łagodniej przebiega okres rekonwalescencji po zastosowaniu preparatu Visudyne. Co prawda nie jest to lek wykorzystywany w leczeniu nowotworów, natomiast znalazł zastosowanie w terapii wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki żółtej oka. W tym przypadku po naświetlaniu, pacjent musi bezwzględnie unikać światła widzialnego przez 5 dni [28].

W odniesieniu do kolejnego preparatu o nazwie Foscan, informacja dla pacjenta zawiera szczegółowy opis postępowania po ukończonej terapii. W ciągu pierwszych 24 godzin należy przebywać w pomieszczeniach, w których całkowicie ograniczono dostęp światła dziennego. Dopuszczalne jest natomiast używanie żarówek o maksymalnej mocy 60 W. W ciągu kolejnych sześciu dni, można stopniowo zwiększać intensywność oświetlenia sztucznego, przy dalszym unikaniu promieniowania słonecznego. Wskazane jest ciągle noszenie okularów przeciwsłonecznych, gdyż nawet najmniejsza dawka światła może wywołać ból oczu oraz głowy. Po tygodniu pacjent może przebywać poza domem, jednak nie dłużej niż 15 minut, pamiętając o szczelnym okryciu całego ciała. W 15 dniu należy wykonać test polegający na wystawieniu niewielkiego fragmentu ciała na działanie światła słonecznego przez okres 5 minut. Jeżeli po 24 godzinach nie wystąpi żadna reakcja fototoksyczna w postaci bólu lub zaczerwienienia, możliwe jest stopniowe powracanie do normalnego trybu życia. Z obserwacji wynika, że całkowity zanik fotowrażliwości przypada na 22 dzień po zakończeniu leczenia.

Oprócz zwiększonej wrażliwości pacjentów na światło, stosunkowo niska selektywność fotouczulaczy jest często przyczyną zaburzeń funkcjonowania innych narządów, czego efektem są takie objawy jak wymioty, nudności, biegunka, trudności w przełykaniu lub anemia [28,64,96].

1.7. Sposoby zwiększania biodostępności i selektywności fotouczulaczy

Głównym ograniczeniem PDT jest zbyt niska selektywność stosowanych preparatów. Najczęstsze efekty uboczne są związane z kumulowaniem się fotouczulaczy w tkankach zdrowych. Dlatego też równoległe z pracami nad syntezą nowych fotosensybilizatorów, prowadzone są badania mające na celu wydajny transport leku do tkanek nowotworowych. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się takie rozwiązania jak zastosowanie liposomów, miceli, emulsji olejowych, lipoprotein lub przeciwciał monoklonalnych [43,106,122,125,132,140].

1.7.1. Liposomy i emulsje

Pierwszym fotouczulaczem, którego właściwości analizowano w formie związanej z liposomami była hematoporfiryna. Po podaniu podotrzewnowym do organizmu myszy wykazano, że pomimo wolniejszej kumulacji w tkance nowotworowej, lek osiągał dwukrotnie większe stężenie niż po aplikacji roztworu wodnego. Dalsze badania wykazały, że fotouczulacze podawane w formie liposomów są bardzo wydajnie wychwytywane przez makrofagi, czego efektem jest kumulacja w wątrobie lub śledzionie. Wydawałoby się, że może to stanowić poważne ograniczenie tzw. terapii celowanej. Okazało się jednak, że stężenia uzyskane we wspomnianych narządach dla fotouczulaczy w formie wolnej i związanej, nie różnią się w sposób znaczący. Bardzo obiecujące wyniki otrzymano również w przypadku niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej, która w zależności od rodzaju liposomów, uzyskiwała stężenie w obrębie nowotworów, nawet dziesięciokrotnie większe niż w tkance zdrowej. Wykazano również, że ftalocyjaniny podstawione peryferyjnie grupami butoksyłowymi, wprowadzone do ustroju w formie emulsji na bazie kremoforu EL, kumulowały się w tkance neoplastycznej z bardzo wysoką wydajnością [106,122,125].

1.7.2. Lipoproteiny

Zjawisko łączenia się fotouczulaczy z lipoproteinami krwi zależy głównie od ich wartości HLB, czyli równowagi hydrofilowo-lipofilowej (ang. *hydrophilic-lipophilic balance*). Barwniki o umiarkowanej hydrofobowości są transportowane głównie jako połączenia z albuminami, natomiast z lipoproteinami wiążą się uczulacze silnie

hydrofobowe. Niezwykle korzystnym sposobem zwiększania selektywności, jest łączenie fotouczulaczy z lipoproteinami o małej gęstości (LDL). Okazało się, że miejscem docelowym podanych w ten sposób barwników, są bezpośrednio komórki nowotworowe. Natomiast barwniki w formie niezwiązanej powodują głównie uszkodzenia naczyń krwionośnych w obrębie guza. Wyjaśnieniem zaobserwowanej różnicy może być fakt, że komórki silnie proliferujące, odznaczają się zwiększoną syntezą receptorów odpowiedzialnych za wychwytywanie LDL z otoczenia [125].

1.7.3. Przeciwciała monoklonalne

Przeciwciała monoklonalne posiadają zdolność rozpoznawania i łączenia się z antygenami nowotworowymi, znajdującymi się na powierzchni komórek. Zalety takiego rozwiązania potwierdzono w przypadku hematoporfiryny. W wyniku połączenia z przeciwciałami barwnik wykazywał dwukrotnie większy efekt terapeutyczny niż forma niezwiązana. Tego typu połączenia wydają się również idealnym rozwiązaniem w walce z nowotworami, upośledzającymi funkcjonowanie szpiku kostnego, jak białaczka lub chłoniaki [125].

1.7.4. Nanotechnologia w PDT

Głównym założeniem nanomedycyny jest opracowanie struktur umożliwiających przede wszystkim szybką i trafną diagnozę danego schorzenia, a następnie zastosowanie wydajnej i możliwie nieinwazyjnej terapii. Nanotechnologia z jednej strony służy udoskonaleniu i zwiększeniu skuteczności tradycyjnych metod leczenia, z drugiej natomiast oferuje cały szereg nowych rozwiązań, gwarantujących poprawę selektywności oraz bezpieczeństwa. Wprowadzenie układów w skali nano do leczenia umożliwia precyzyjną ocenę i modyfikację podstawowych parametrów farmakokinetycznych, począwszy od rozpuszczalności leków, czasów półtrwania po podaniu do ustroju, a skończywszy na kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnej w określonym czasie i wymaganym miejscu. W odniesieniu do terapii fotodynamicznej duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem takich nanocząstek jak nanorurki, nanokropki, czy opisane wcześniej liposomy [21,30,41,109,178].

Nanorurki węglowe ze względu na unikatowe właściwości przewodzące, znalazły początkowo zastosowanie głównie w branży elektronicznej. Okazało się

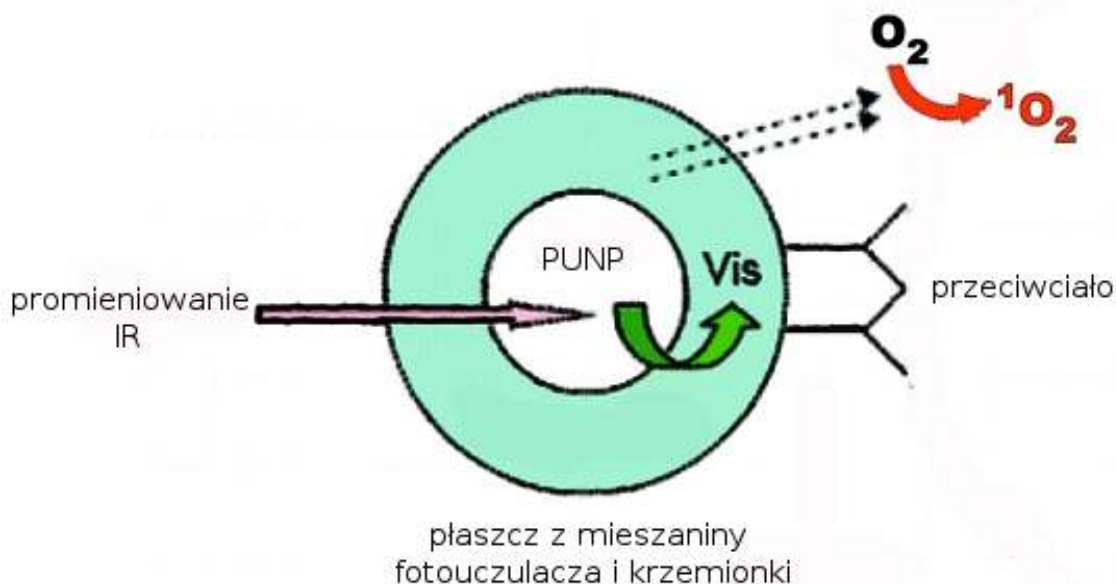
jednak, że po odpowiedniej modyfikacji, wykazują zdolność do stosunkowo łatwego przechodzenia przez błony komórkowe. Dlatego też zaczęto rozważać wykorzystanie nanorurek jako nośników substancji leczniczych. Odpowiednia modyfikacja zewnętrznej powierzchni, polegająca na przyłączeniu cząsteczek fotouczulacza oraz przeciwciał specyficznych dla określonego nowotworu, wydaje się niezwykle interesującym rozwiązaniem w terapii fotodynamicznej. Wykazano, że tego rodzaju układy mogą działać w sposób dwukierunkowy. Nanorurki, szczególnie jednościenne, silnie absorbują bowiem promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (700–5000 nm). Dlatego też komórki ulegałyby niszczeniu zarówno w wyniku tworzącego się tlenu singletowego, jak również pod wpływem wysokiej temperatury [107].

Ilość materiałów, z jakich można przygotować nanocząstki jest bardzo zróżnicowana. Mogą to być struktury otrzymane na bazie polimerów, metali lub ceramik. Wśród nanocząstek polimerowych można wyróżnić takie, które po spełnieniu swojego zadania ulegają biodegradacji oraz takie, które są usuwane z organizmu w postaci niezmienionej [30,123].

W przypadku PDT rozważano zastosowanie nanocząstek, zbudowanych z siarczku cynku. Przeprowadzone doświadczenia dowiodły, że stanowią odpowiednie podłoże do przyłączania różnego rodzaju znaczników, natomiast dodatkowe połączenie z jonami manganu lub europu, wywołuje efekt fluorescencyjny, niezwykle przydatny w diagnostyce fotodynamicznej. Innym rodzajem są nanocząstki otrzymywane na bazie krzemionki. Poprzez odpowiednią modyfikację procesu produkcji, otrzymuje się cząstki o ściśle zdefiniowanym rozmiarze porów (2–50 nm). Kolejną zaletą jest fakt, że w organizmie są degradowane do kwasu krzemowego, który jest łatwo eliminowany. Okazało się także, że nanocząstki krzemowe mogą generować tlen singletowy bez udziału fotouczulacza [74,123].

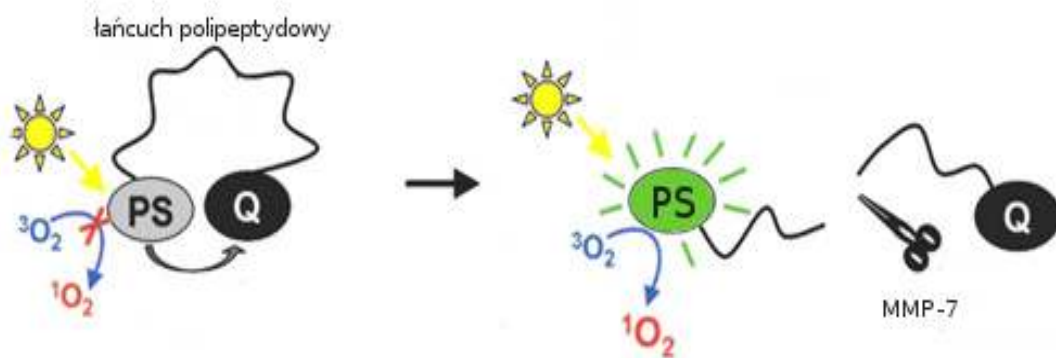
W ostatnim czasie pojawiła się informacja o udanej syntezie fotouczulacza, wzbudzanego promieniowaniem o długości fali z zakresu podczerwieni (ryc. 3). Rdzeń takiej cząsteczki zbudowano z nanocząstek mających zdolność konwersji energii uzyskanej z fotonów - PUNPs (*ang. Photon Upconverting Nanoparticles*). Wyjątkowość opisanych układów polega na tym, że promieniowanie wyemitowane posiada energię wyższą niż pochłonięte. Głównymi zaletami takich rozwiązań są: (i) absorpcja promieniowania podczerwonego, które penetruje tkankę na głębokość nawet kilkanaście razy większą niż promieniowanie widzialne, (ii) wysoka specyficzność

kumulacji w tkance nowotworowej, (iii) poszerzenie zbioru potencjalnych fotouczulaczy. Sugeruje się, że połączenia tego rodzaju, będą w przyszłości stanowiły kolejną generację fotouczulaczy [174].



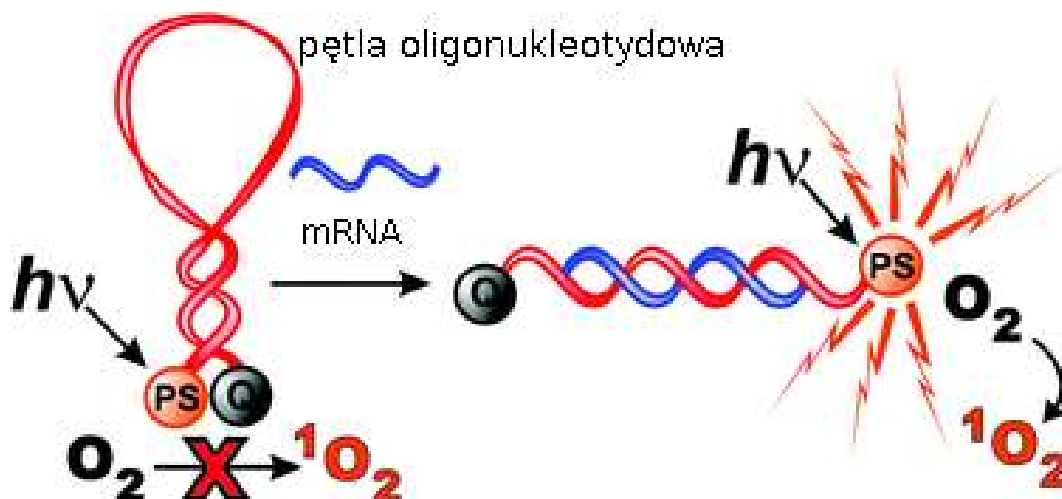
Ryc. 3. Schemat działania fotouczulacza typu PUNP [174]

Na szczególną uwagę zasługuje również koncepcja tzw. fotodynamicznych latarni molekularnych (*ang. Photodynamic Molecular Beacons; PMB*). Ideą takiego rozwiązania jest połączenie cząsteczki fotouczulacza i wygaszacza za pomocą fragmentu polipeptydu, będącego jednocześnie molekularnym markerem, rozpoznawanym jedynie przez komórki nowotworowe. Dzięki temu uzyskuje się selektywną kumulację leku w obrębie guza. Ponadto zadaniem peptydu łączącego, jest utrzymanie obu cząsteczek w bliskiej odległości, umożliwiającej transfer energii. Wygaszcz pełni z kolei rolę akceptora energii emitowanej przez barwnik i blokuje proces powstawania reaktywnych form tlenu. Po wprowadzeniu do komórki sekwencja polipeptydu jest rozpoznawana i rozcinana przez enzym, charakteryzujący się wysokim poziomem ekspresji w tkankach nowotworowych. W przypadku raka trzustki, jelita grubego, piersi i niedrobnokomórkowego raka płuc, taką rolę pełni macierzowa metaloproteinaza. Rozcięcie łącznika prowadzi do odblokowania cząsteczki fotosensybilizatora (ryc. 4). Tkanę eksponuje się następnie na działanie promieniowania o odpowiedniej długości fali i w ten sposób uaktywnia właściwy proces fotodynamicznego niszczenia nowotworu [176].



Ryc. 4. Schemat działania PMB z peptydowym łącznikiem; PS - fotouczulacz, Q - wygaszacz, MMP-7- metaloproteinaza 7 [176]

Możliwe jest również połączenie cząsteczek przy pomocy oligonukleotydu o sekwencji antysensownej z celowanym, specyficznym dla danego nowotworu m-RNA. Łącznik oligonukleotydowy tworzy strukturę pętli (tzw. spinki do włosów; *ang. hairpin*), która otwiera się w obecności odpowiedniego m-RNA. Umożliwia to wzbudzenie fotouczulacza w reakcji fotodynamicznej (ryc. 5) [35].



Ryc. 5. Schemat działania PMB z oligonukleotydowym łącznikiem o strukturze „spinki do włosów” ; PS - fotouczulacz, Q – wygaszacz [35].

Pomimo niewątpliwych zalet wynikających z zastosowania nanostruktur w PDT, należy również zwrócić uwagę na potencjalne zagrożenia, jakie niesie wprowadzenie tak złożonych układów do organizmu. Obecnie największym wyzwaniem dla zespołów badawczych jest dokładne poznanie szlaków przemian, jakim ulegają one w ustroju po zakończeniu terapii, ze szczególnym uwzględnieniem procesu eliminacji. Wykazano bowiem, że niektóre rodzaje nanocząstek mogą pozostawać w organizmie przez okres kilku miesięcy, a nawet kilku lat [53].

1.8. Charakterystyka i podział substancji fotouczulających

1.8.1. Cechy idealnego fotouczulacza do PDT

Fotouczulacze muszą spełniać kilka warunków, aby mogły być wykorzystywane w diagnostyce i leczeniu metodą fotodynamiczną. Dobry fotosensybilizator powinien odznaczać się takimi parametrami jak:

- **Maksimum absorpcji w zakresie 600-800 nm.** Pasma absorpcji fotosensybilizatora nie mogą pokrywać się z pasmami absorpcji w obszarze widzialnym barwników endogennych, takich jak melanina, hemoglobina, oksyhemoglobina oraz z pasmami absorpcji wody w obszarze bliskiej podczerwieni.
- **Minimum absorpcji w zakresie 400-600 nm.** Fotouczulacze absorbujące w tym regionie spektroskopowym, zwiększają fotowrażliwość skóry, co jest głównym efektem ubocznym terapii fotodynamicznej, charakterystycznym dla pierwszej generacji fotouczulaczy, bazujących na pochodnych hematoporfiryny.
- **Wysoka wydajność tworzenia tlenu singletowego lub reaktywnych form tlenu.**
- **Fotostabilność.** Fotosensybilizator powinien charakteryzować się stabilnością, pomimo możliwości utleniania przez tlen singletowy i inne reaktywne formy tlenu wytwarzane *in situ*.
- **Brak efektów fototoksycznych** (cytotoksyczność, mutagenność) w zdrowych tkankach.

- **Selektywna kumulacja w tkankach nowotworowych.** Wymagane jest aby fotouczulacze pozostawały w miejscu działania przez co najmniej kilkadziesiąt godzin.
- **Wysoki stopień czystości chemicznej.** W terapii fotodynamicznej konieczne jest zastosowanie pojedynczego, dobrze zdefiniowanego fotouczulacza, co pozwala na lepsze określenie zależności pomiędzy strukturą barwnika, a wywołanym efektem.
- **Możliwość prostej i wydajnej syntezy.**
- **Łatwa i szybka eliminacja z organizmu** [5,110].

1.8.2. Podział fotouczulaczy

Fotosensybilizatory stosowane w praktyce klinicznej można podzielić ze względu na:

a) rozpuszczalność:

1. **hydrofobowe** – wykazują większe powinowactwo do lipidów komórkowych. Należą do nich między innymi ftalocyjaniny cynkowe i chlorowo-glinowe, naftalocyjaniny oraz cynowa etiopurpuryna. Ze względu na problemy w dystrybucji, wymagają stosowania nośników zwiększających rozpuszczalność, takich jak liposomy lub Tween 80.
2. **hydrofilowe** – wykazują dobrą rozpuszczalność w środowisku wodnym. Zaliczamy do nich pochodne tetrafenylporfiry oraz chloroglinowe pochodne ftalocyjanin zawierające podstawniki sulfonowe. W zależności od budowy występują w roztworze wodnym w formie kationowej lub anionowej.
3. **amfifilowe** – do tej grupy należą porfiryne pochodne, które wokół hydrofobowego pierścienia posiadają niesymetrycznie rozmieszczone polarne podstawniki. Mają one największe znaczenie kliniczne ze względu na możliwość umiejscowienia, zarówno w strefach lipidowych, jak i wodnych komórki.

b) strukturę chemiczną:

1. pochodne porfiryne

HpD – hematoporfiryna i jej pochodne

BPD – benzoporfiryna i jej pochodne

ALA – kwas 5-aminolewulinowy i jego pochodne

Teksafiryny

2. pochodne chlorofilu

Chloryny

Purpuryny

Bakteriochloryny

3. barwniki

Ftalocyjaniny

Naftalocyjaniny

Subftalocyjaniny

c) generacje:

- 1. Pierwsza generacja** związków fotouczulających obejmuje preparaty hematoporfiryn HpD, będące mieszaninami monomerów, dimerów i oligomerów porfiryńowych, połączonych za pomocą wiązań estrowych lub eterowych. Są one otrzymywane na drodze ekstrakcji z tzw. masy erytrocytarnej.
- 2. Druga generacja** obejmuje związki stosowane w PDT od 1980 r. Są to pochodne hematoporfiryny i fotouczulacze otrzymane syntetycznie, takie jak kwas 5-aminolewulinowy, pochodne benzoporfiryny, teksafiryny, pochodne etiopuryny lub analogi chloryn.
- 3. Trzecia generacja** to połączenia fotosensybilizatorów z nośnikami poprawiającymi selektywność ich kumulacji w chorej tkance. Są to połączenia z przeciwciałami monoklonalnymi, nośnikami białkowymi lub systemami białkowo/receptorowymi. Mogą być dodatkowo znakowane radioaktywnie. Wykorzystują nowotworowe markery powierzchniowe: receptory czynników wzrostu, receptory dla transferyny, integryny, kwasu foliowego, insuliny i lipoprotein o małej gęstości LDL, a także transportery glukozy. Nie można jednoznacznie stwierdzić, czy nowsze generacje fotouczulaczy są skuteczniejsze. Pomimo poprawy pewnych parametrów terapeutycznych, często odnotowuje się silny ból w czasie zabiegu lub zbyt dużą reaktywność wywołującą podrażnienie przy bardzo słabym oświetleniu [5,110,155].

1.8.3. Fotosensybilizatory stosowane w praktyce klinicznej

Photofrin jest zaliczany do fotosensybilizatorów pierwszej generacji. W skład preparatu wchodzi hematoporfiryna, hydroksyetylowinylodeuteroporfiryna oraz protoporfiryna, skompleksowane w formie mono-, di- i oligomerów. W PDT znalazł zastosowanie w leczeniu lub zmniejszaniu objawów raka przełyku oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. W 2003 roku Photofrin zakwalifikowano do leczenia uszkodzeń przedrakowych przełyku Barrett'a. Substancje aktywne preparatu są aktywowane światłem o długości fali 630 nm [5,8,97].

Levulan to nazwa handlowa kwasu 5-aminolewulinowego (ALA). Po aplikacji przyczynia się do kumulacji w komórkach protoporfiryny IX, będącej właściwym czynnikiem fotouczulającym. W odróżnieniu od pozostałych fotouczulaczy może być podany doustnie, chociaż najczęściej jest stosowany na skórę w postaci maści. Największą skuteczność wykazuje w odniesieniu do powierzchniowych zmian skórnych oraz nowotworów jamy ustnej. Może być także użyty w przypadku nowotworów przełyku i żołądka. Trwają badania nad wprowadzeniem do lecznictwa estrów ALA, które dzięki obecności długiego lipofilowego łańcucha, wykazują zwiększoną zdolność penetracji przez warstwę rogową skóry [5,56].

m-THPC - meta-tetrahydroksyfenylochloryna (m-THPC) = **Foscan, Temoporfin**. Jest to hydrofobowa chloryna rdzeniowa, posiadająca grupę hydroksylową w pozycji *meso*. Taka budowa warunkuje między innymi znaczny wzrost rozpuszczalności. Pierwsze badania z udziałem m-THPC rozpoczęły się w 1990 roku i dotyczyły leczenia chłoniaka oraz terapii nowotworów występujących w rejonie narządów rodnych, dróg oddechowych oraz okolicach głowy i szyi. W porównaniu z preparatem Photofrin, m-THPC jest około 20 razy bardziej skuteczna. Efektywna terapia wymaga znacznie niższych stężeń fotouczulacza oraz krótszego czasu naświetlania. Stwierdzono, że charakteryzuje się większą wydajnością generowania tlenu singletowego, wykazując jednocześnie bardziej selektywne działanie [5,87,93].

Motexafin Lutetium w literaturze znany jako **Lutrin**, albo **Lutex** to również fotosensybilizator drugiej generacji. Składnikiem preparatu jest aromatyczna metaloporfiryna posiadająca maksimum absorpcji przy 732 nm, podawana dożylnie

6-24 godzin przed rozpoczęciem naświetlania. Czas trwania fotowrażliwości wynosi jedynie 1-2 dni [5,25,66,138].

Visudyne – substancja aktywna preparatu jest zaliczana do grupy benzoporfiryn. W tym przypadku wywołujący efekt fotodynamiczny wykorzystuje się w leczeniu pacjentów cierpiących na starcze zwyrodnienie plamki żółtej (AMD) [28,70,135].

W krótkim czasie rozwój nauki przyczynił się do syntezy wielu nowych fotosensybilizatorów, określanych mianem drugiej generacji, które charakteryzują się krótszymi czasami klirensu osocznego i półtrwania w tkankach. Są one pobudzane przez światło o większej długości fali (650-690 nm). Dzięki temu znacząco zwiększyła się selektywność terapii i zmniejszyło ryzyko ewentualnych działań ubocznych [64,68,77].

1.9. Kliniczne możliwości zastosowania terapii fotodynamicznej

W oparciu o przesłanki teoretyczne i eksperymentalne, metody fotodynamiczne stosuje się w wielu dyscyplinach klinicznych. Powszechnie wykorzystywane są przede wszystkim w diagnostyce i terapii zmian przednowotworowych, i nowotworów złośliwych [7,9,70,97,101,121,144].

Terapia fotodynamiczna okazała się najskuteczniejsza w leczeniu stanów przedrakowych, zlokalizowanych w obrębie jamy ustnej, przewodu pokarmowego, górnych dróg oddechowych i pęcherza moczowego oraz niezbyt zaawansowanych zmian nowotworowych. Najwięcej doniesień dotyczy skuteczności w terapii przełyku Barret'a, który jest stanem przednowotworowym tego narządu [104]. Wysoką skuteczność wykazano również w przypadku raka szyjki macicy. Ftalocyjaniny cynkowe były także przedmiotem badań, odnośnie skuteczności względem komórek nowotworu piersi. Okazało się, że pochodne z grupami oktakis(N,N-dimetyloamino)etylosulfanylowymi w połączeniu ze światłem czerwonym, dezaktywowały ok. 70% komórek [159].

Szczególne osiągnięcia z wykorzystaniem PDT odnotowano w dermatologii. Spośród wszystkich organów skóra wydaje się idealna dla tego rodzaju leczenia. Jest łatwo dostępna dla światła, natomiast leczenie często nie wymaga ogólnoustrojowego podawania fotouczulacza. Ponadto skutki terapii są zauważalne w bardzo krótkim

czasie. Jak dotąd zjawisko fotodynamiczne wykorzystywano w leczeniu przypadłości takich jak łuszczyca, przebarwienia oraz wszelkiego rodzaju znamiona. Znakomite efekty uzyskuje się również w usuwaniu zmian trądzikowych [7,18,64,67,141].

Jak wspomniano wcześniej PDT z powodzeniem stosuje się w usuwaniu zmian występujących w obrębie górnych dróg oddechowych. Szczególne sukcesy odnotowuje się w terapii nowotworów oraz brodawczaków krtani. W przypadku nowotworu strun głosowych, kuracja jest bardzo skuteczna i umożliwia zachowanie głosu oraz zaniechanie interwencji chirurgicznej [61,168].

Efekty fotodynamiczne można wykorzystać również w zwalczaniu infekcji bakteryjnych lub grzybiczych. W wyniku zastosowania fotouczulaczy eliminuje się przede wszystkim zjawisko lekooporności drobnoustrojów, jak również ogranicza ryzyko wystąpienia powikłań charakterystycznych dla antybiotykoterapii. Metoda PDT okazała się skuteczna w zwalczaniu zakażeń jamy ustnej, wywołanych między innymi grzybnią *Candida*. Skuteczność wykazano również w odniesieniu do gronkowców z rodzaju *S. aureus*, jak również niezwykle groźnych pałeczek ropy błękitnej *P. aeruginosa*. Okazało się, że bardziej podatne na inaktywację są bakterie Gram-dodatnie. W przypadku komórek Gram-ujemnych, korzystne okazało się stosowanie fotouczulaczy łącznie z substancjami takimi jak polimyksyna lub kompleks tris-EDTA, których zadaniem jest zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej otoczki bakteryjnej. Takie rozwiązania okazały się skuteczne w leczeniu zakażeń pałeczką okrężnicy *E. coli* [14,39,93,111,134,143,156].

Przewaga terapii i diagnostyki fotodynamicznej nad konwencjonalnymi metodami chirurgicznymi i radioterapeutycznymi polega na swoistej selektywności. Wybiórczość jest osiągnięta przez preferencyjne gromadzenie się substancji uczulającej na światło w wybranej tkance. Ponadto aktywność fotodynamiczna jest ograniczona do miejsca naświetlania i nie oddziałuje na otaczające komórki, przy braku fotouczulacza lub światła. Znacznie rzadziej dochodzi do powikłań. Inną ważną zaletą jest stosunkowo szybka regeneracja tkanek oraz mniejsze ryzyko powstawania blizn. PDT może być także wykorzystywana jako uzupełnienie radioterapii, chemioterapii czy leczenia chirurgicznego [64,73].

Atutami terapii fotodynamicznej są: duża skuteczność, dobry efekt kosmetyczny, możliwość zachowania prawidłowej funkcji leczonego narządu oraz mała inwazyjność wobec głębiej położonych struktur. Zadowalające rezultaty można osiągnąć także w leczeniu paliatywnym, w szczególności w przypadku rozległych

zmian nowotworowych. Terapia fotodynamiczna nie wymaga sterylnego otoczenia w miejscu leczenia. Może być przeprowadzana w klinikach jednodniowego pobytu, co obniża koszty kuracji oraz korzystnie wpływa na stan psychiczny osoby leczonej. W znacznym stopniu przyczynia się do poprawy komfortu życia w czasie rekonwalescencji. Zmniejsza również dolegliwości bólowe związane z występowaniem zmiany nowotworowej [64].

Powikłania po zastosowaniu metod fotodynamicznych są znacznie rzadsze niż w przypadku tradycyjnych technik leczenia. Odpowiednio dobierając dawki fotouczulacza i promieniowania, można w znacznym stopniu zmniejszyć efekty uboczne. W dermatologii są to głównie miejscowy rumień, ból i pieczenie w miejscu naświetlania. Po naświetlaniu zmian przelyku, może nastąpić zwężenie wymagające mechanicznego rozszerzenia, a po kuracji raka pęcherza moczowego – krwiomocz, objawy dysuryczne oraz zmniejszenie objętości i zwłóknienie pęcherza. W każdym przypadku ogólnego podania związku fotouczulającego, należy liczyć się z ryzykiem łagodnych poparzeń słonecznych [8,28].

Obecnie trwają prace nad miejscowym podawaniem fotosensybilizatorów przez specjalnie zaprojektowane aplikatory, co umożliwi prawie całkowite zmniejszenie nadwrażliwości na światło w innych miejscach ciała. Prowadzone są także próby łączenia terapii fotodynamicznej z immunoterapią oraz radiochemioterapią (w odniesieniu do zmian zlokalizowanych w węzłach chłonnych). Natomiast problem ograniczonej skuteczności terapii fotodynamicznej u chorych z niedokrwistością, usiłuje się eliminować poprzez podanie erytropoetyny, której zadaniem jest zwiększenie stopnia utlenienia tkanek. Jednym z kierunków rozwoju PDT jest poznanie mechanizmów obronnych, uruchamianych w komórkach nowotworowych poddanych terapii fotodynamicznej. Można przypuszczać, iż leczenie łączone, polegające na jednoczesnym zastosowaniu metody fotodynamicznej oraz substancji blokujących mechanizmy obronne komórek rakowych, doprowadzi do wzmocnienia działania przeciwnowotworowego [10].

2. Ftalocyjaniny, porfirazyny i subftalocyjaniny

2.1. Porównanie budowy chemicznej

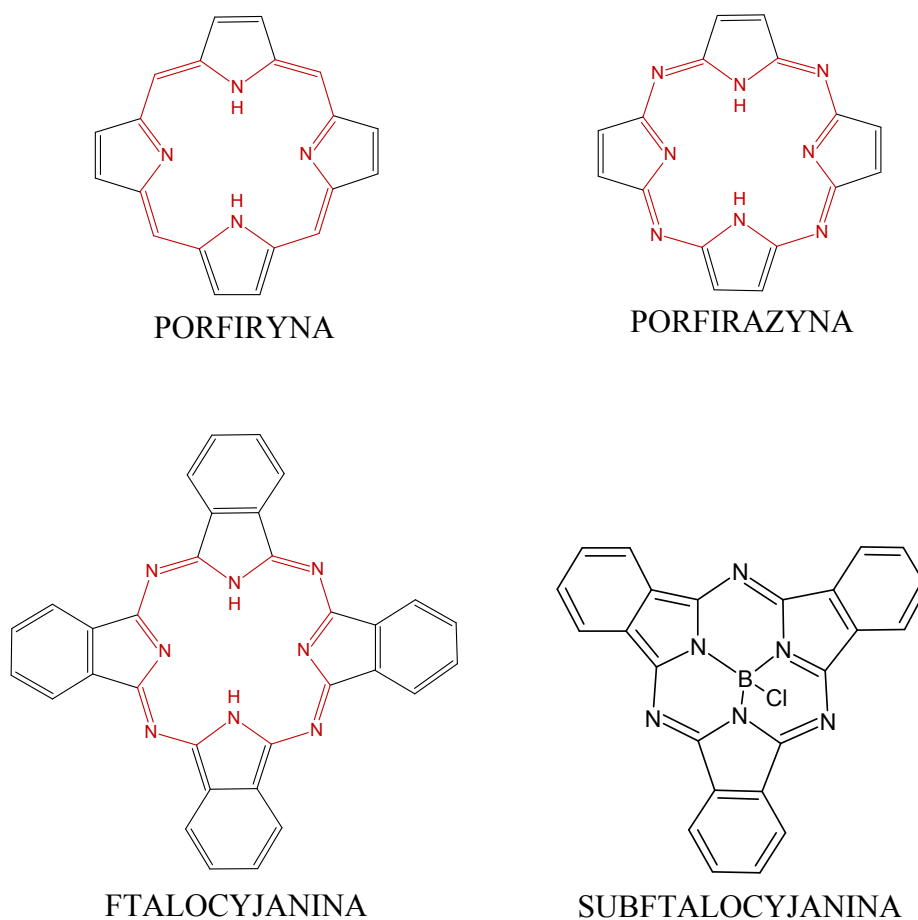
Podstawowa struktura porfiryny (porfina) składa się z czterech jednostek pirolu, połączonych czterema mostkami metinowymi. Jest to układ aromatyczny zawierający 22 elektrony π (w tym 18 zdelokalizowanych), spełniający regułę aromaticzności Hückla ($4n+2\pi$, gdzie $n = 4$). Porfirazyny natomiast są izoelektronowe z porfirynami i wykazują zbliżony kształt cząsteczek. Różnica strukturalna polega na zastąpieniu atomów węgla w mostkach metinowych atomami azotu. Takie połączenia, określane jako aza, są z reguły bardziej elektroujemne. Okazało się, że wprowadzenie atomów azotu zamiast atomów węgla, prowadzi do obniżenia energii wszystkich molekularnych orbitali walencyjnych. Obserwuje się również zmniejszenie rozmiaru układu makrocyklicznego. Ftalocyjaniny z kolei mogą być rozpatrywane jako pochodne porfirazyn, których układ aromatyczny został poszerzony o cztery pierścienie benzenowe [11,20,47,49,90,118,160,172].

Innym rodzajem cząsteczek makrocyklicznych są subftalocyjaniny, w których liczba pierścieni benzopirolowych została zredukowana do trzech. Można je rozpatrywać jako niższe homologi ftalocyjanin. Posiadają układ 14 aromatycznych elektronów π . Często są wykorzystywane jako substraty w syntezie niesymetrycznych ftalocyjanin [45,86,117].

Wzory strukturalne porfiryny, porfirazyny, ftalocyjaniny, oraz subftalocyjaniny przedstawiono na ryc. 6.

Strukturę wymienionych powyżej związków można modyfikować zarówno w centrum pierścienia, jak również w części peryferyjnej. Rozróżnia się tak zwane pochodne demetalowane lub metalowane. W drugim przypadku jon metalu oddziałuje z atomami azotu dwóch pierścieni pirolowych. Wykazano, że obecność metalu w pierścieniu wpływa stabilizująco na cały układ [78,116,166].

Zdecydowanie większą różnorodność związków, uzyskano dzięki opracowaniu metod syntezy pochodnych podstawionych peryferyjnie. Spośród wielu rodzajów podstawników, najbardziej rokujące okazały się grupy sulfonowe, karboksylowe, silikonowe, alkilowe, alkoksylowe, aminowe oraz estrowe [12,47,49,124,137].



Ryc. 6. Wzory strukturalne porfiryny, porfirazy, ftalocyjaniny oraz subftalocyjaniny

2.2. Właściwości spektroskopowe

Jedną z głównych metod oceny nowych fotouczulaczy jest spektrofotometria w zakresie UV-Vis. Widma absorpcji oraz emisji stanowią obszerne źródło informacji na temat struktury badanej cząsteczki, umożliwiają analizę stanów energetycznych, pozwalają wnioskować na temat symetrii. Analizując powstawanie lub zanikanie poszczególnych pasm, można ocenić czy dany fotouczulacz wykazuje tendencję do tworzenia agregatów, a tym samym dobrać odpowiedni rozpuszczalnik do dalszych badań [47,49,76,160].

2.2.1. Elektronowe widma absorpcji

Widma absorpcji większości fotouczulaczy charakteryzują się obecnością dwóch podstawowych pasm:

- **pasmo Q** – występujące w zakresie widzialnym (600-800 nm), charakteryzujące się dużą intensywnością ($\epsilon > 10^5$) oraz niską energią wzbudzenia,
- **pasmo Soreta** – zlokalizowane w zakresie 300-400 nm.

Wymienione pasma w widmie niepodstawionych porfirazyn, charakteryzują się porównywalnym natężeniem i występują odpowiednio w zakresie 330-350 (Soret) oraz 530-620 nm (pasmo Q). Różnice w budowie peryferyjnych podstawników wywołują często zmiany w intensywności pasm oraz w długości fali, przy której występują. Oprócz pasm Q i Soreta obserwuje się także pasma typu *charge transfer* (CT), 450-600 nm. Są one wynikiem przeniesienia ładunku z metalu od ligandu (MLCT) lub odwrotnie (LMCT) [47,48,76,88,118,126,150,160,164].

W przypadku subftalocyjanin pasmo Q jest również bardzo intensywne i z reguły znajduje się w zakresie 550-650 nm [45,117,153].

Analizując fotosensybilizatory szczególną uwagę zwraca się przede wszystkim na lokalizację oraz kształt pasma Q. Wykazano między innymi, że wyraźne rozdwojenie może świadczyć o obecności w roztworze zarówno form monomerycznych, jak również agregatów. Ogólnie przyjęto, że tendencja do agregacji to zjawisko niekorzystne, wpływające negatywnie na zdolność generowania tlenu singletowego. Rozszczepienie pasma Q może być także wynikiem demetalacji kompleksu. Dowiedziono również, że pojawianie się słabych pasm w zakresie długofalowym, może być wynikiem utlenienia pierścienia makrocyklicznego, a następnie agregacji form utlenionych [2,3,92,100,112,160,173].

Wyraźny wpływ na przebieg widma UV-Vis ma rodzaj użytego rozpuszczalnika. Przesunięcie pasma Q w kierunku długofalowym obserwowano w rozpuszczalnikach organicznych (największe dla 1-chloronaftalenu). Takie przesunięcie może wynikać z destabilizacji orbitalu HOMO lub stabilizacji LUMO. Sugeruje się, że interakcja między rozpuszczalnikami koordynującymi, a cząsteczką fotouczulacza stabilizuje

LUMO. Ogólnie przyjęto, że rozpuszczalniki posiadające rozbudowany układ elektronów π mogą stabilizować LUMO, co skutkuje przesunięciem pasma Q w kierunku długofalowym. Agregacja powoduje zbliżanie się orbitali poszczególnych molekuł, co w rezultacie prowadzi do rozszczepienia poziomów energetycznych HOMO i LUMO. Powstają w ten sposób podpoziomy wibronowe, które tylko nieznacznie różnią się energią. Ilość tych podpoziomów zależy od liczby cząsteczek tworzących aglomerat. Wraz ze wzrostem liczby cząsteczek zwiększa się siła oddziaływań między nimi. Ostatecznie poszczególne poziomy nie są już zauważalne, powstaje natomiast nowe pasmo [36,75,126,149,160].

Stosunkowo trudna do wyjaśnienia jest natomiast obecność drobnych pasm, położonych po stronie długofalowej pasma Q. W widmach porfirazyn mogą one pochodzić od wspomnianych wcześniej przejść typu "charge transfer". W przypadku ftalocyjanin cynkowych w tym zakresie obserwowano tak zwane pasmo X. Z reguły pojawiało się w rozpuszczalnikach o niskiej polarności, natomiast nie było obserwowane w bardziej polarnych takich jak DMF, aceton, DMSO, a także THF [113,114,115].

Sugeruje się, że pasmo X jest wynikiem zniekształcenia pierścienia w niektórych rozpuszczalnikach. Takie odchylenia od płaszczyzny są charakterystyczne również dla tetrafenylporfiryn. Efekt jest bardziej widoczny, gdy podstawniki peryferyjne są rozmieszczone w sposób niesymetryczny [47,48,49,76,90].

2.2.2. Elektronowe widma emisji

Charakterystyka właściwości emisyjnych fotouczulaczy obejmuje zazwyczaj ocenę jakościową, czyli analizę przebiegu widm fluorescencji oraz wzbudzenia emisji, jak również ilościową, polegającą na wyznaczeniu wartości wydajności kwantowych fluorescencji.

Większość porfirazyn posiada z reguły dwa pasma emisji w zakresie UV-Vis – pasmo S_2 , odpowiadające przejściu ze stanu wzbudzonego S_2 do stanu podstawowego, które występuje przy krótszych długościach fali, oraz pasmo S_1 , które występuje przy falach dłuższych. Jednakże liczba pasm emisji zależy od długości fali wykorzystanej do wzbudzenia. Zastosowanie światła o λ poniżej 400 nm, prowadzi do powstania zarówno pasma S_1 jak i S_2 , podczas gdy światło o dłuższej fali wywołuje pojawienie się jedynie pasma S_1 [23,63,102,126,136].

Metalofталocyjaniny natomiast wykazują zwykle intensywną, czerwoną fluorescencję w zakresie 600-800 nm oraz mało intensywną emisję (tzw. fioletową). W drugim przypadku, pasma zlokalizowane przy długości fali od 400 do 650 nm są szerokie i odznaczają się niską intensywnością. Obecność takich pasm potwierdzono w odniesieniu do metalofталocyjanin z wbudowanymi jonami kobaltu, glinu oraz rutenu. Wykazano, że tego rodzaju emisja pojawia się przy wzbudzeniu dwufotonowym, jako rezultat absorpcji promieniowania o dużej intensywności lub z zakresu nadfioletu. Prawdopodobnie pochodzi ze stanów wzbudzonych typu $n-\pi^*$ [76,90,157].

Dla fталocyjanin z podstawnikami peryferyjnymi, przesunięcie Stokes'a może przekraczać nawet 100 nm. Z reguły jednak odległość między pasmem Q widma absorpcji oraz widma emisji jest niewielka, co może sugerować, że konfiguracje jądrowe stanów podstawowego i wzbudzonego są zbliżone. Absorpcja promieniowania o różnych długościach fali, nie wpływa zasadniczo na różnice w widmach emisyjnych. Drobne zmiany mogą wynikać z pojawienia się dodatkowych poziomów wibronowych. Widma absorpcji i wzbudzenia fluorescencji fotouczulaczy, powinny być swoimi odbiciami lustrzanymi (reguła Lewszyna). W przypadku występowania agregacji mogą się jednak różnić. Agregaty w większości przypadków nie wykazują jednak właściwości fluorescencyjnych [81,114,115,120,126].

Podobnie jak w przypadku widm absorpcji, również przebieg widm emisji fotouczulaczy, zależy od modyfikacji peryferyjnej cząsteczek. Zauważono, że obecność podstawników zawierających heteroatomy, wywiera niekorzystny wpływ na zjawisko emisji. Na przykład atomy azotu z wolnymi parami elektronowymi w wyniku sprzężenia z układem elektronów π pierścienia, ułatwiają wygaszenie wzbudzenia na drodze bezpromienistej [118,128,129,179].

2.3. Trwałość fotochemiczna fotosensybilizatorów

Odporność barwników na rozkład pod wpływem światła, jest niezwykle istotna nie tylko w PDT, ale również w wielu dziedzinach przemysłu. W terapii fotodynamicznej procesy, jakim ulega cząsteczka fotouczulacza mają istotny wpływ przede wszystkim na bezpieczeństwo, jak również skuteczność leczenia. Po raz pierwszy zjawisko fotodegradacji barwnika *in vivo*, zaobserwowano podczas terapii preparatem Photofrin w roku 1986. Już wtedy największym ograniczeniem PDT, była

długo utrzymująca się fototoksyczność, występująca nie tylko w rejonie naświetlanej tkanki [26,95,127].

Rozróżnia się dwa rodzaje reakcji fotochemicznych, jakim mogą ulegać fotosensybilizatory:

1. **Fotomodyfikacja (fototransformacja)** – modyfikacja struktury chromoforu, wywołana działaniem światła, pociąga za sobą zmiany w intensywności niektórych pasm absorpcji i fluorescencji. Przykładem może być fototransformacja cząsteczki hematoporfiryny w środowisku wodnym, podczas której pojawia się nowe pasmo przy ok. 640 nm.
2. **Photobleaching (fotodegradacja)** – absorpcja promieniowania prowadzi do rozpadu cząsteczki do niewielkich fragmentów, które nie posiadają zdolności absorbowania w zakresie widzialnym. Zachodzące zmiany są zauważalne jako utrata barwy [27,51,127].

Zauważono, że fotomodyfikacji w pewnym stopniu towarzyszy również proces rozkładu, dlatego można przyjąć, że oba zjawiska zachodzą równocześnie w trakcie naświetlania [96].

Szlaki prowadzące do fotodegradacji lub fototransformacji są bardzo zróżnicowane. Spośród zachodzących reakcji można wyróżnić:

- **fotoaddycję oraz fotocyklizację:** skutkiem tych procesów może być utrata chromoforu
- **transfer elektronów:** może prowadzić do wykształcenia nowych pasm przesuniętych w kierunku fal dłuższych, zjawisko to jest z reguły odwracalne
- **fotoredukcję:** zachodzi w obecności czynników redukujących i jest procesem nieodwracalnym.

Najczęstszym czynnikiem sprzyjającym zachodzeniu reakcji fotochemicznych jest tlen. Większość tego typu procesów zależy od obecności tlenu singletowego lub innych reaktywnych form tlenu o charakterze rodnikowym. Pierwsze próby oceny

procesu fotowycielania dotyczyły preparatu Photofrin. Ponieważ w latach osiemdziesiątych największym ograniczeniem stosowania tego leku, była bardzo długo utrzymująca się nadwrażliwość na światło, zaczęto rozważać fotodegradację barwników jako zjawisko korzystne. Sugerowano również aby pacjentów, którym zaaplikowano fotouczulacz poddawać naświetlaniu wstępnemu, wzrastającymi dawkami promieniowania. Przeprowadzone badania na myszach wydawały się obiecujące, jednak z czasem okazało się, że takie postępowanie nie przynosi korzystnych efektów w odniesieniu do właściwej terapii. Inne rozwiązanie polegało z kolei na stosowaniu małych stężeń fotouczulaczy w połączeniu z dużym natężeniem światła. Udało się znacznie obniżyć toksyczność w tkankach zdrowych, przy zachowaniu wysokich zniszczeń w obrębie struktur nowotworowych.

W miarę wzrostu zainteresowania problemem trwałości fotochemicznej fotouczulaczy, systematycznie pojawiały się informacje związane z oceną kinetyczną zachodzących procesów. Analiza mechanizmów reakcji oraz identyfikacja i charakterystyka powstających fotoproduktów jest zadaniem niezwykle trudnym.

Jak wspomniano wcześniej, najdokładniej scharakteryzowano procesy fotochemiczne zachodzące z udziałem porfiryn. Pierwsza ocena fotosabilności tej grupy związków dotyczyła hematoporfiryny. Wnikliwa ocena zachodzących procesów wykazała, że w trakcie naświetlania powstają trzy główne rodzaje fotoproduktów:

- I. wykazujące absorpcję w zakresie UV (240–320 nm) zidentyfikowane jako mono- i dipirole,
- II. pochodne bilirubiny wykazujące maksimum absorpcji przy 545 nm,
- III. dwa produkty posiadające maksima absorpcji przy 640 i 660 nm, którym przypisano strukturę odpowiednio chloryny i bakteriochloryny.

Wykazano równocześnie, że wyraźny wpływ na przebieg procesu fotochemicznego ma zjawisko agregacji fotouczulaczy. W wyniku naświetlania agregatów przeważał proces tworzenia trwałych fotoproduktów, natomiast gdy eksponowana była forma monomeryczna, zachodził głównie proces fotowycielania [27].

Pierwsze badania dotyczące zachowania pochodnych syntetycznych w warunkach intensywnego naświetlania pojawiły się w roku 1986. Ich celem było porównanie fotostabilności sulfonowanej ftalocyjaniny i naftalocyjaniny, metalowanych jonami glinu, naświetlanych lampą ksenonową o mocy 450 W. Okazało się, że

cząsteczka ftalocyjaniny odznaczała się ponad 1000 razy większą stabilnością. Wykazano również, że proces rozkładu wyraźnie zależy od ilości tlenu obecnego w środowisku, dlatego też jako główny czynnik odpowiedzialny za degradację barwnika uznano tlen singletowy. W celu potwierdzenia zależności, związki eksponowano na światło w postaci roztworów w wodzie deuterowanej, co przyspieszyło zachodzące procesy prawie dziewięciokrotnie. Kolejne eksperymenty wykazały, że w trakcie naświetlania ftalocyjanin, bardziej odporna na rozkład jest forma zagregowana. Określając natomiast wpływ obecności jonów metali w centrum pierścienia udowodniono, że szybciej rozkładają się związki metalowane. Badając wpływ podstawników peryferyjnych na stabilność wykazano również, że podstawniki elektronobiorcze (np. $-CN$) działają stabilizująco. Z kolei podstawniki które zwiększały gęstość elektronów w obrębie pierścienia, przyczyniały się do spadku odporności na działanie promieniowania. Okazało się ponadto, że znamienny wpływ na szybkość fotodegradacji ma rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika [27].

Wieloletnie badania dotyczące właściwości fotochemicznych fotouczulaczy, pozwalają sformułować kilka podstawowych reguł według których zachodzi proces fotodegradacji:

- w większości przypadków początkowe etapy fotodegradacji przebiegają zgodnie z reakcją kinetyczną pierwszego rzędu; obserwowano jednak reakcje drugorzędowe oraz mieszany rząd reakcji,
- fotodegradacja jest reakcją oksydacji i przebiega znacznie wolniej w warunkach beztlenowych,
- ze względu na trudności z izolacją, nie udało się jednoznacznie zidentyfikować wielu produktów fotomodifikacji; sugeruje się jednak, że powstają one w wyniku reakcji cykloaddycji typu $2\pi + 2\pi$ lub cykloaddycji tlenu singletowego $2\pi + 4\pi$,
- w odniesieniu do ftalocyjanin rzadko obserwuje się zjawisko fotomodifikacji, głównie ze względu na fakt, że powstające produkty są bardzo nietrwałe,
- produktami właściwego fotowycielania ftalocyjanin są najczęściej związki o charakterze amidów,
- bardziej podatne na rozkład są fotouczulacze posiadające w centrum jony metali, posiadające niski potencjał utleniający, takie jak $Mg(II)$ lub $Zn(II)$ [27].

Cząsteczki ftalocyjanin z reguły ulegają samounicestwieniu, rozkładając się oksydacyjnie pod wpływem tlenu singletowego, który same generują. Rozkład fotoredukcyjny przypisuje się z kolei porfirazynom. Zauważono też, że rozpuszczalniki takie jak DMF, DMSO i pirydyna słabiej chronią pierścień przed atakiem oksydacyjnym [27].

III. CEL I ZAKRES PRACY

Terapia fotodynamiczna to jedna z najintensywniej rozwijających się metod leczenia we współczesnej onkologii. Do głównych zalet PDT, jako metody alternatywnej dla chirurgii, należy mała inwazyjność i związany z tym wzrost bezpieczeństwa pacjenta. Ponadto ze względu na ogromny postęp fizyki w zakresie budowy i doskonalenia systemów laserowych oraz osiągnięcia chemii w dziedzinie syntezy nowych barwników fotouczulających, metodę fotodynamiczną wykorzystuje się w wielu różnych specjalnościach medycyny. Oprócz terapii przeciwnowotworowej prowadzone są badania, obejmujące leczenie takich schorzeń jak zmiany miażdżycowe w naczyniach wieńcowych, AIDS oraz choroby autoimmunologiczne. Wraz z pojawieniem się fotosensybilizatorów drugiej generacji, które rzadziej wywołują długotrwałą fototoksyczność, wzrosło zainteresowanie techniką PDT w dermatologii, tj. głównie w leczeniu trądziku oraz łuszczycy. Ze względu na ogromne zróżnicowanie występujących jednostek chorobowych, nie otrzymano jak dotąd fotosensybilizatora o charakterze uniwersalnym. Z tego względu wciąż prowadzone są badania, których celem jest synteza nowych fotouczulaczy o pożądanych właściwościach fotofizycznych, wykazujących większą selektywność i bezpieczeństwo stosowania. Ze względu na korzystne właściwości elektronowe, optyczne oraz zadowalającą trwałość chemiczną i termiczną, barwniki ftalocyjaninowe, porfirazynowe oraz subftalocyjaninowe cieszą się coraz większym zainteresowaniem. Przegląd literatury dotyczący aktualnego stanu wiedzy na temat PDT, potwierdza szczególnie korzystne właściwości tzw. metalowanych porfirynoidów, posiadających w centrum cząsteczki jony metali takie jak Zn(II) lub Mg(II) [4,5,7,9,10,17,27,37,67,68,131].

Uwzględniając dotychczasowe doniesienia piśmiennictwa, w ramach niniejszej pracy ustalono następujący program badań:

1. Porównanie właściwości spektroskopowych wybranych barwników fotouczulających. Zaplanowano przeprowadzenie oceny właściwości absorpcyjnych oraz charakterystykę emisyjną.

2. Ocenę zdolności generowania tlenu singletowego analizowanych barwników w atmosferze tlenowej, jak również po odtlenowaniu gazem obojętnym.
3. Ocenę trwałości fotochemicznej fotouczulaczy w warunkach zdefiniowanych w pierwszej wersji przewodnika ICH. W przypadku stwierdzenia fotolabilności, wyznaczenie parametrów kinetycznych zachodzących procesów.
4. Pomiar absorpcji przejściowej celem oceny dynamiki stanów wzbudzonych fotouczulaczy.
5. Ocenę właściwości biologicznych z wykorzystaniem kultur komórkowych nowotworu kolczystkomórkowego (*Human Squamous Carcinoma*; HSC-3).

IV. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

A. APARATURA, ODCZYNNIKI I SUBSTANCJE DO BADAŃ

1. Aparatura

- spektrofotometr UV-160 A, *Shimadzu*, z oprogramowaniem *PC 160 Plus*
- spektrofotometr Cary 50 Scan, *Varian*
- spektrofluorymetr Cary Eclipse, *Varian*
- stół pomiarowy do analizowania absorpcji przejściowej, *Department of Physical Chemistry, University of Geneva, Switzerland*
- chromatograf cieczowy model 1200 - *Agilent*, wyposażony w detektor fotodiodowy – Photodiode Array 1200, *Agilent Technologies*
- wysokociśnieniowa łukowa lampa ksenonowa z palnikiem XBO-150 W/1, *Optel*
- radiometr RD 0,2/2 z sondą TD, *Optel*
- luksomierz TES 1335, *TES Electrical Electronic Corp.*
- monochromator M 250, *Optel*
- waga analityczna, *Sartorius RC 210 D*
- żarówka wolframowa Dura Max 75W Med 120V A19 CI/LL 20W; *Philips Electronics North America Corporation, Andover, MA, USA*
- mikroskop kontrastowy z odwróconą fazą TMSF 211741, *Nikon*
- płytki do hodowli komórek 48-dółkowe, MICROTTEST™ 96, *Becton Dickinson Labware*
- filtry szklane odcinające *HCC-16* oraz *KC-11*
- kuwety kwarcowe o grubości warstwy $l = 1$ cm oraz $l = 0,5$ cm, *Hellma*
- cylindryczna kuweta kwarcowa o grubości warstwy $l = 1$ cm, *Hellma*

2. Odczynniki

- rozpuszczalniki:
 - do chromatografii cieczowej:
 - metanol, *J. T. Baker*
 - tetrahydrofuran, *POCH*
 - dichlorometan, *POCH*

- do spektrofotometrii:

- DMSO, ACS spectrophotometric grade $\geq 99,9\%$, *Sigma Aldrich*
- DMSO, for UV spectroscopy, *Fluka*
- tetrahydrofuran (THF), spectrophotometric grade 99,5+%,
Sigma Aldrich
- N,N-dimetyloformamid (DMF), ACS spectrophotometric grade
99,8% *Sigma Aldrich*
- metanol, *Sigma Aldrich*
- acetonitryl, *Merck*
- eter dietylowy, *Merck*
- octan etylu, *POCH*
- heksan, *Merck*
- cykloheksan, *Merck*
- izopropanol, *POCH*
- trietyloamina, *Sigma Aldrich*
- 1,4-dioksan, *Merck*
- N,N-dimetyloacetamid (DMA), *Sigma Aldrich*
- chloroform, *Merck*

➤ odczynniki do badań biologicznych:

- University of California San Francisco, Cell Culture Facility:

- DMEM
(*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- czerwień fenolowa
- penicylina (100 U/cm³)
- streptomycyna (100 µg/cm³)
- L-glutamina
- kompleks trypsyna-EDTA
- DMSO, *Sigma-Aldrich*

- inne odczynniki:

- błękit Alamar (Alamarblue™), *Biosource International, Inc.*
(Camarillo, CA)
- FBS, *Gibco Life Technologies*
- PBS (*phosphate buffer solution*)

➤ substancje wzorcowe:

- ftalocyjanina cynkowa, *Sigma Aldrich*
zawartość w próbce: 97 %
- 1,3-difenyloizobenzofuran, *Sigma Aldrich*
zawartość w próbce: 97 %

3. Substancje do badań

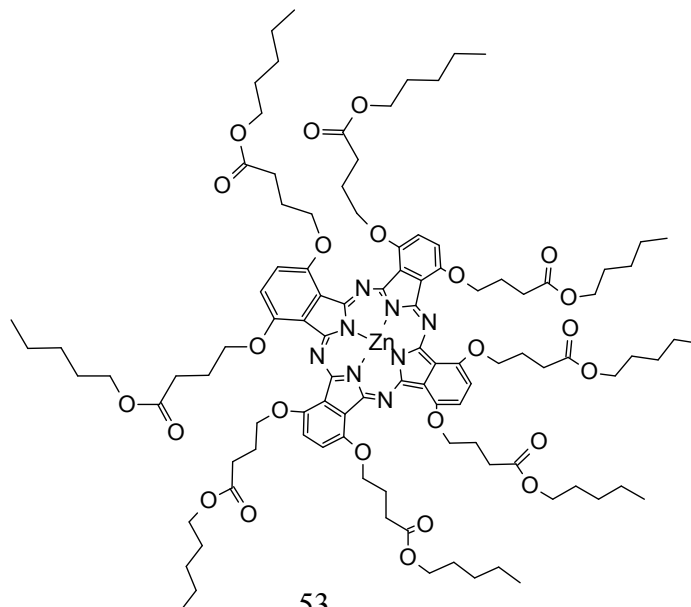
Ftalocyjaniny TG-I-161 i TG-I-162 oraz porfirazyna TG-I-123 zostały zsyntetyzowane i udostępnione do badań przez dr Tomasza Goślińskiego oraz dr Marcina Wierzchowskiego z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

➤ **oktakispentylu cynk(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(4-butyloksy) ftalocyjanina**

- w pracy określana jako ftalocyjanina **TG-I-161**

Wzór sumaryczny: $C_{103}H_{143}N_8O_{24}Zn$

Masa molowa: 1955,704 g/mol

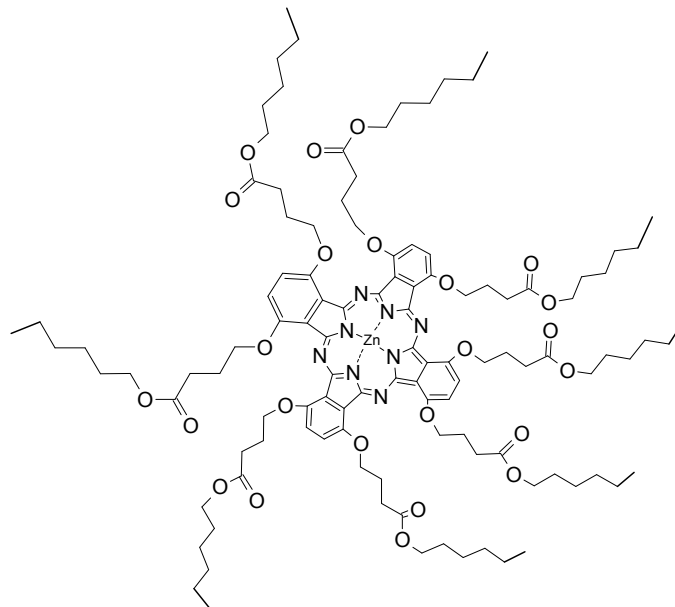


➤ **oktakisheksylu cynk(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(4-butyloksy)ftalocyjanina**

- w pracy określana jako ftalocyjanina **TG-I-162**

Wzór sumaryczny: $C_{112}H_{160}N_8O_{24}Zn$

Masa molowa: 2067,917 g/mol



➤ **cynk (II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktabutoksy-29H,31H-ftalocyjanina**

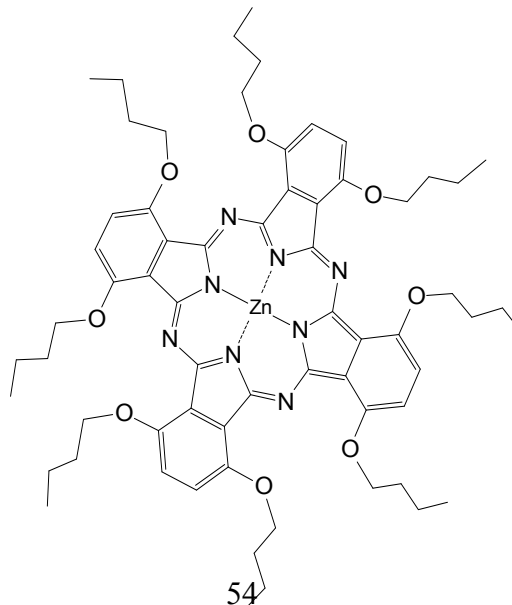
(Sigma Aldrich)

- w pracy określana jako ftalocyjanina **TG-TO-1**

Wzór sumaryczny: $C_{64}H_{80}N_8O_8Zn$

Masa molowa: 1154,760 g/mol

Zawartość w próbce: 97 %

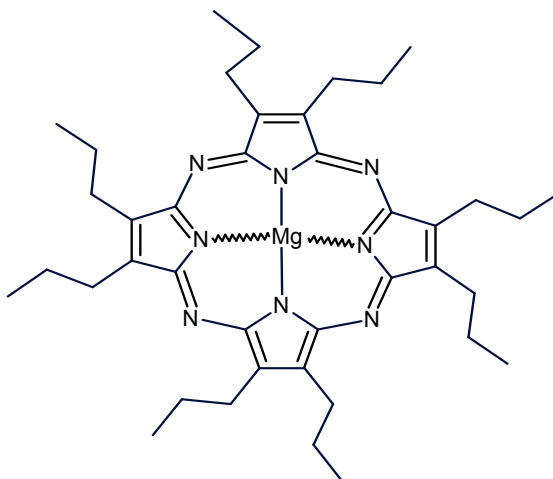


➤ **magnez(II) 2,3,7,8,12,13,17,18-oktapropyloporfirazyna**

- w pracy określana jako porfirazyna **TG-I-123**

Wzór sumaryczny: $C_{40}H_{56}N_8Mg$

Masa molowa: 673,232 g/mol



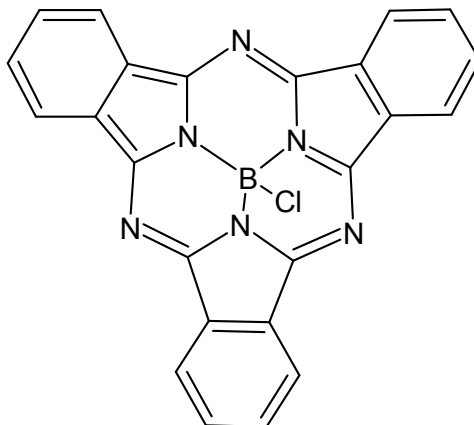
➤ **kompleks chloro subftalocyjanino boru (III) (Sigma Aldrich)**

- w pracy określana jako subftalocyjanina **SubPc**

Wzór sumaryczny: $C_{24}H_{12}BClN_6$

Masa molowa: 430,660 g/mol

Zawartość w próbce: 85 %



B. METODYKA I WYNIKI BADAŃ

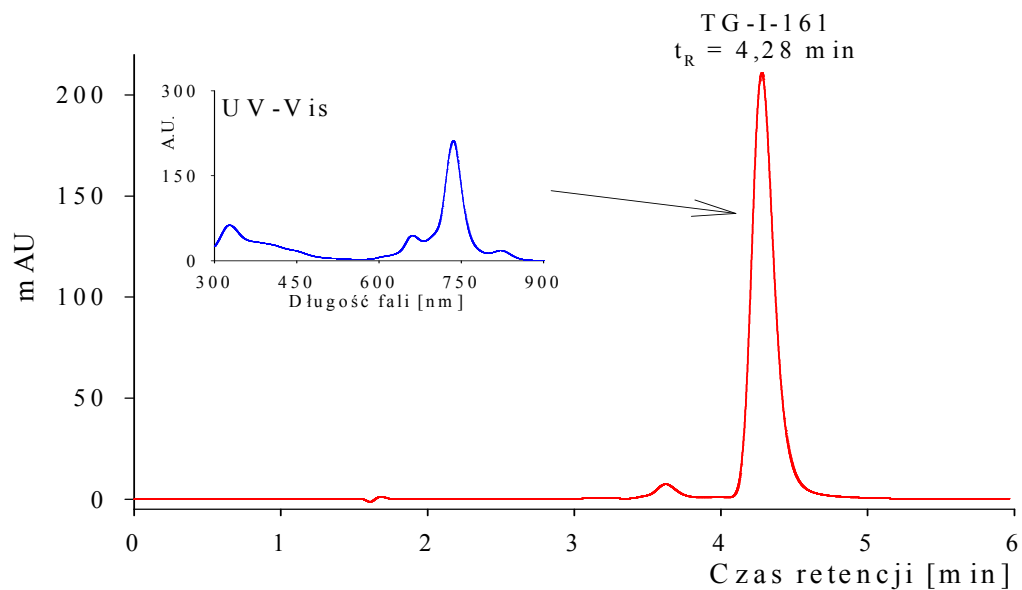
1. Ocena jednorodności próbek ftalocyjanin TG-I-161, TG-I-162 oraz porfirazyny TG-I-123

Zawartość badanych substancji sprawdzono z wykorzystaniem metody HPLC. Zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy Agilent, typ 1200 firmy *Agilent Technologies Inc.* (USA), składający się z czterech pomp, detektora spektralnego z matrycą diodową, degazera próżniowego (typ Agilent 1200) oraz autosamplera (typ Agilent 1100). Rozdzielenie chromatograficzne przeprowadzono w układzie odwróconych faz na kolumnie Eclipse XDB-C18, firmy *Agilent* o długości 150 mm i średnicy 4,6 mm, wypełnionej złożem o średniej wielkości ziarna 5 μm . Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 cm^3/min . Próbki nastrzykiwano na kolumnę w objętości 50 μl . Proces prowadzono w temperaturze pokojowej. Skład fazy ruchomej, długość fali detekcji oraz procentową zawartość badanych substancji przedstawiono w tabeli 2.

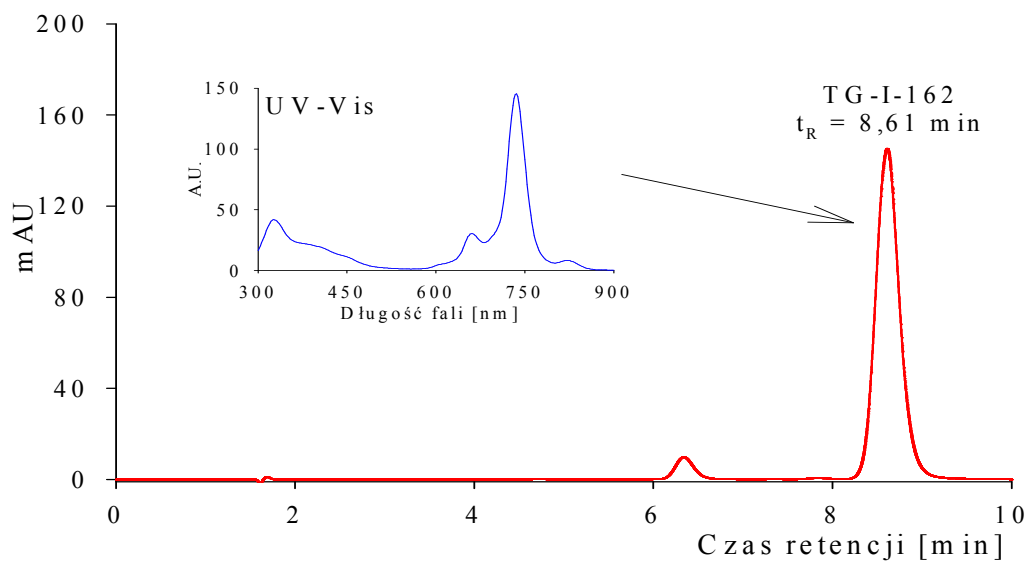
Tabela 2. Parametry chromatograficzne analizowanych związków TG-I-161, TG-I-162, TG-I-123

Związek	Skład fazy ruchomej	Długość fali detekcji [nm]	Zawartość substancji w próbce [%]
TG-I-161	metanol : THF : dichlorometan 80 : 10 : 10 (v/v)	735	96,81
TG-I-162	metanol : THF : dichlorometan 80 : 10 : 10 (v/v)	735	95,02
TG-I-123	metanol : THF 85 : 15 (v/v)	598	97,80

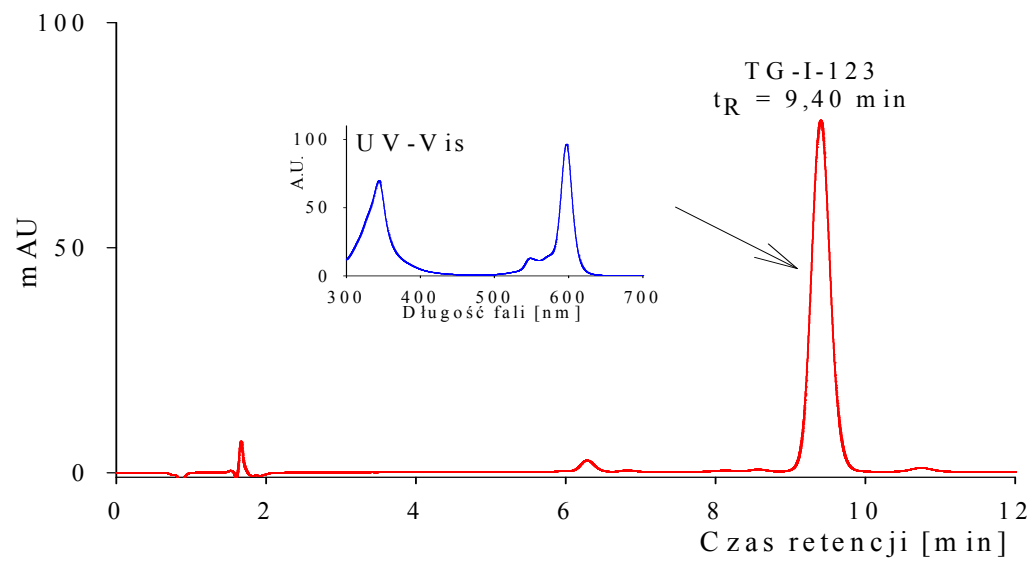
Natomiast uzyskane chromatogramy oraz widma UV-Vis analizowanych próbek przedstawiono na ryc. 7-9.



Ryc. 7. Chromatogram oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161



Ryc. 8. Chromatogram oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162



Ryc. 9. Chromatogram oraz widmo UV-Vis porfirazyny **TG-I-123**

2. Analiza spektralna

2.1. Efekty solwatochromowe

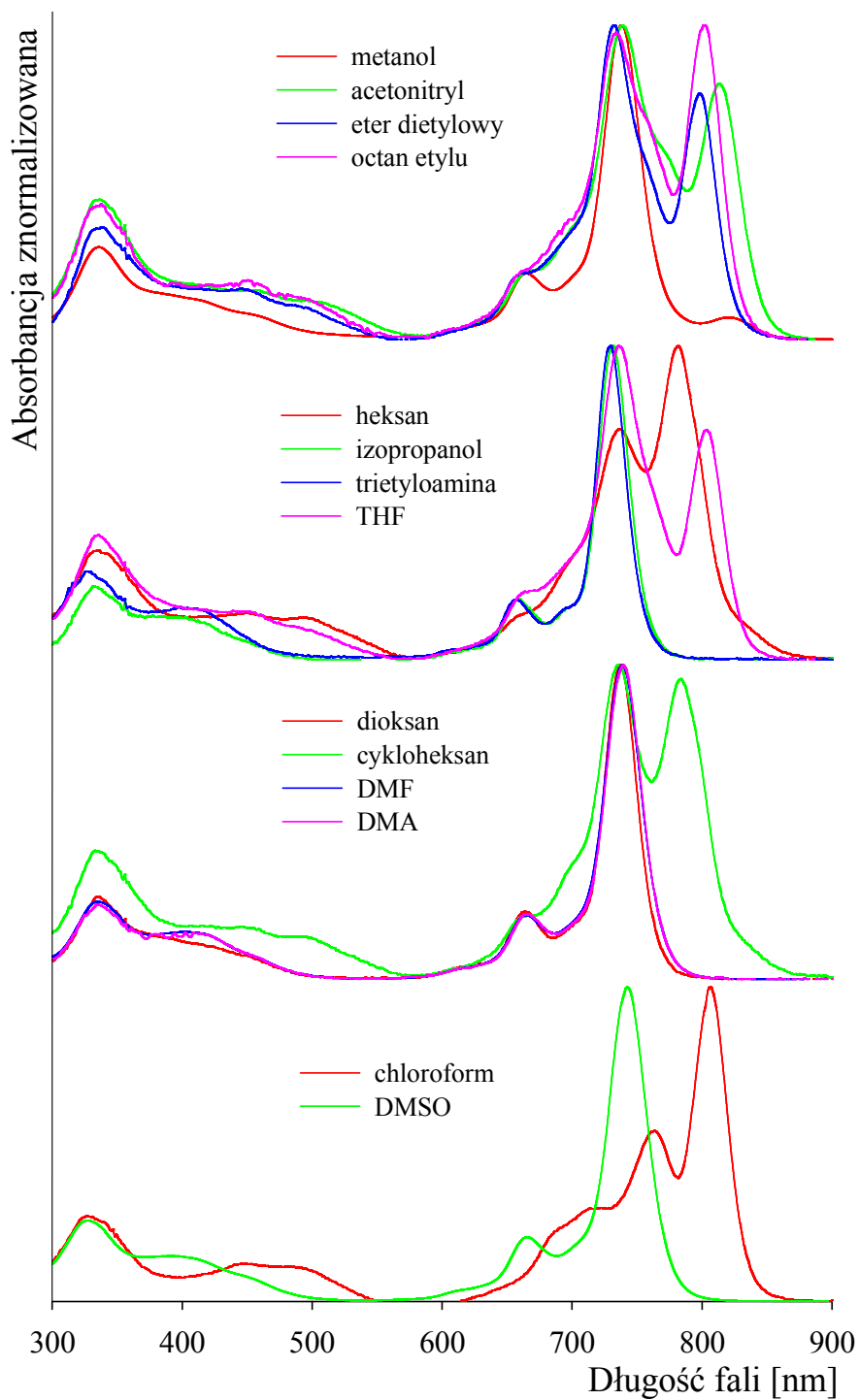
Widma elektronowe badanych związków wykreślono w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Stężenia analizowanych substancji dobierano w taki sposób, aby absorbancja najbardziej intensywnego pasma uzyskiwała wartość w zakresie od 0,3 do 0,6. Widma przedstawiono w formie znormalizowanej, odpowiednio na rycinach:

ryc. 10	TG-I-161
ryc. 12	TG-I-162
ryc. 14	TG-TO-1
ryc. 16	TG-I-123
ryc. 18	SubPc

Długość fali odpowiadającej maksimum absorpcji badanych związków, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika, przedstawiono w tabelach 3-7.

W odniesieniu do wybranych rozpuszczalników analizowano również graficzną zależność analitycznej długości fali pasma Q (λ_{\max}), od parametru $(n^2-1)/(2n^2+1)$, gdzie n to wartość współczynnika załamania światła rozpuszczalnika. Wyniki przedstawiono odpowiednio na rycinach:

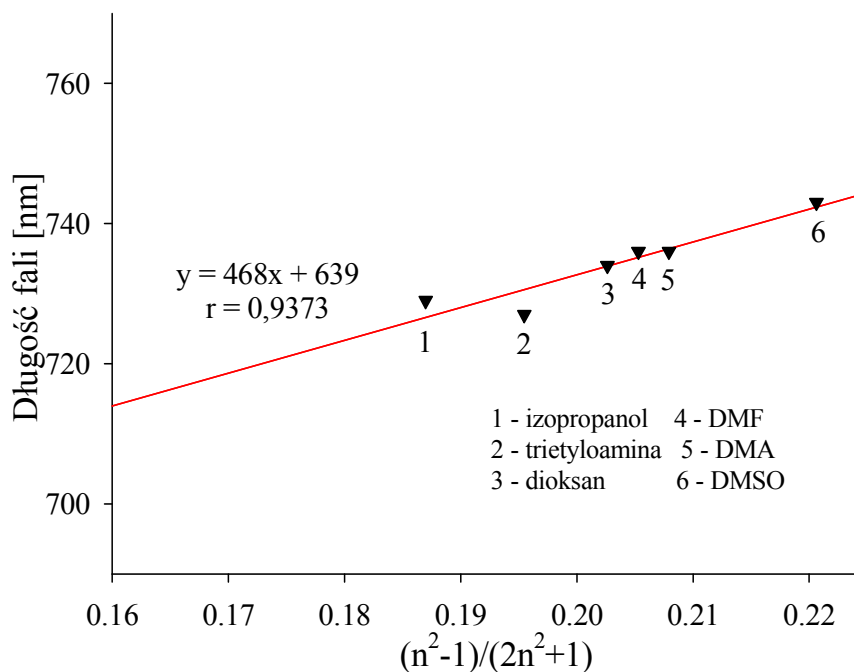
ryc. 11	TG-I-161
ryc. 13	TG-I-162
ryc. 15	TG-TO-1
ryc. 17	TG-I-123
ryc. 19	SubPc



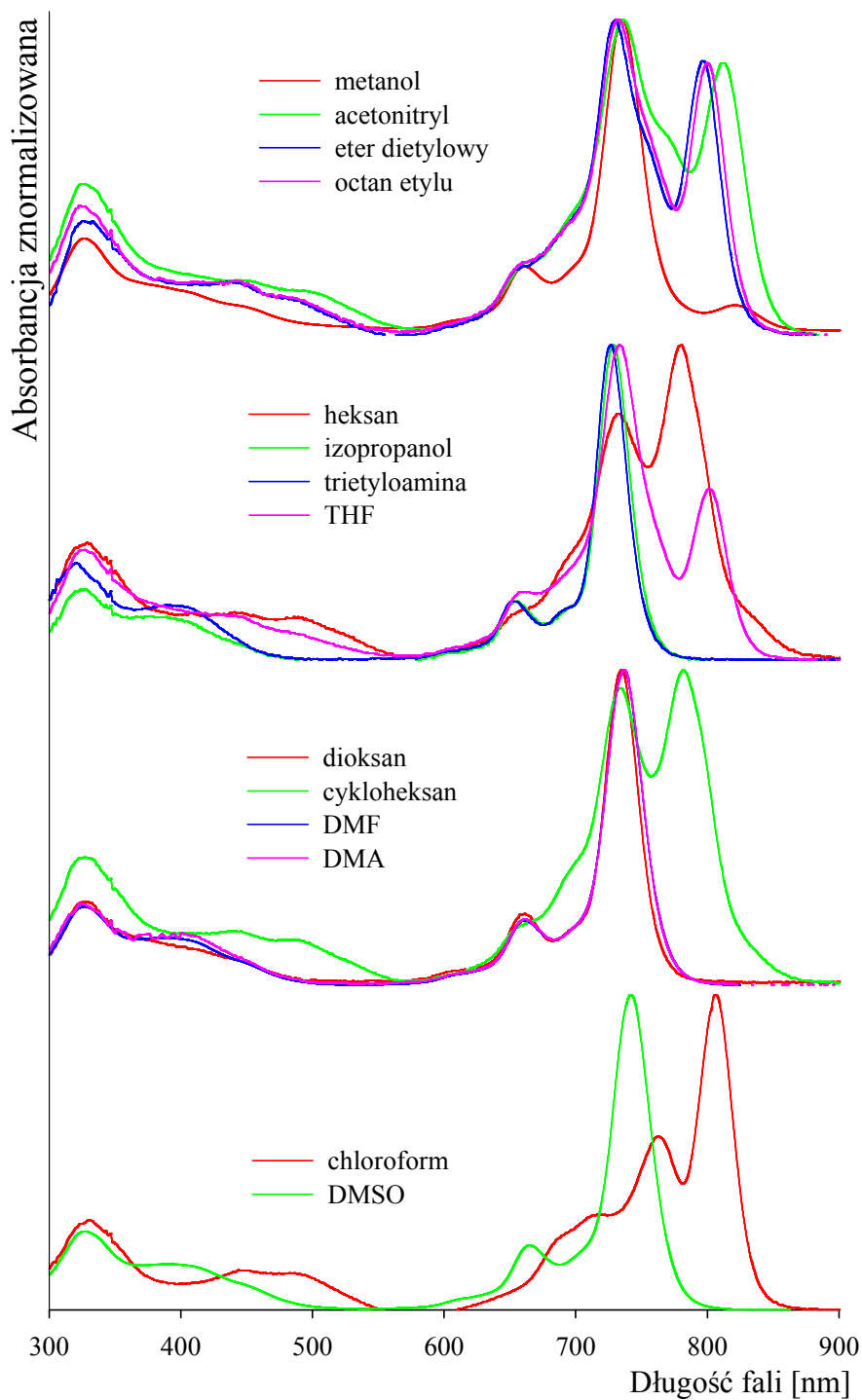
Ryc. 10. Widma elektronowe ftalocyjaniny **TG-I-161** w rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 3. Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-I-161 w zależności od rozpuszczalnika oraz współczynniki refrakcji i momenty dipolowe rozpuszczalników

Rozpuszczalnik	Współczynnik refrakcji (20°C) ^[89]	Moment dipolowy μ [D] ^[89]	Pasma Soreta [nm]	Pasma Q [nm]		
Metanol	1,328	1,70	326	660	735	820
Acetonitryl	1,344	3,92	327	---	736	811
Eter dietylowy	1,352	1,15	328	---	730	796
Octan etylu	1,372	1,78	328	---	731	799
Heksan	1,375	0,00	327	---	733	779
Izopropanol	1,377	1,56	322	655	729	---
Trietyloamina	1,401	0,66	318	651	727	---
THF	1,407	1,69	325	---	733	802
Dioksan	1,422	0,00	326	660	734	---
Cykloheksan	1,426	0,00	323	---	733	782
DMF	1,430	3,82	326	660	736	---
DMA	1,438	3,70	325	660	736	---
Chloroform	1,446	1,04	326	---	761	806
DMSO	1,478	1,80	327	665	743	---



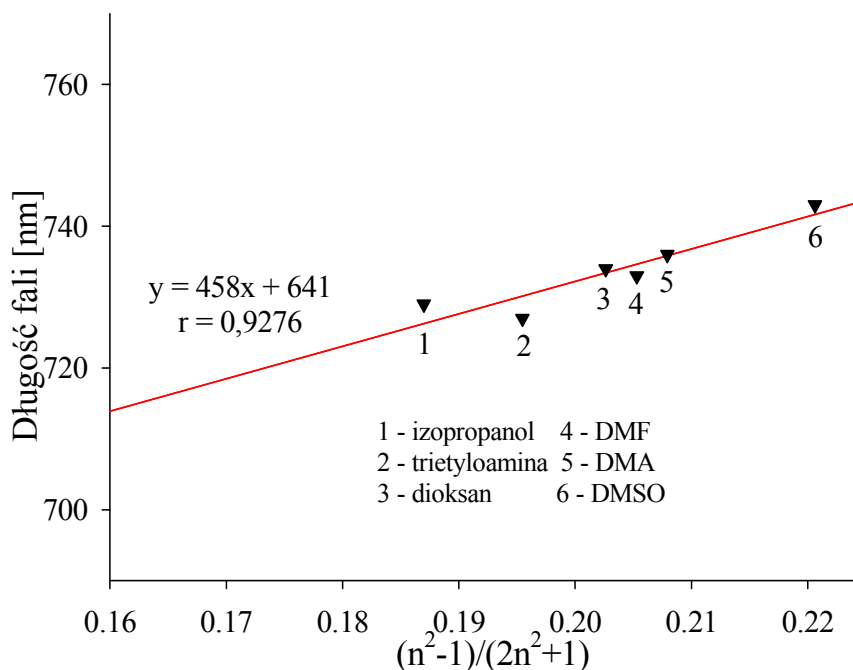
Ryc. 11. Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-I-161 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika



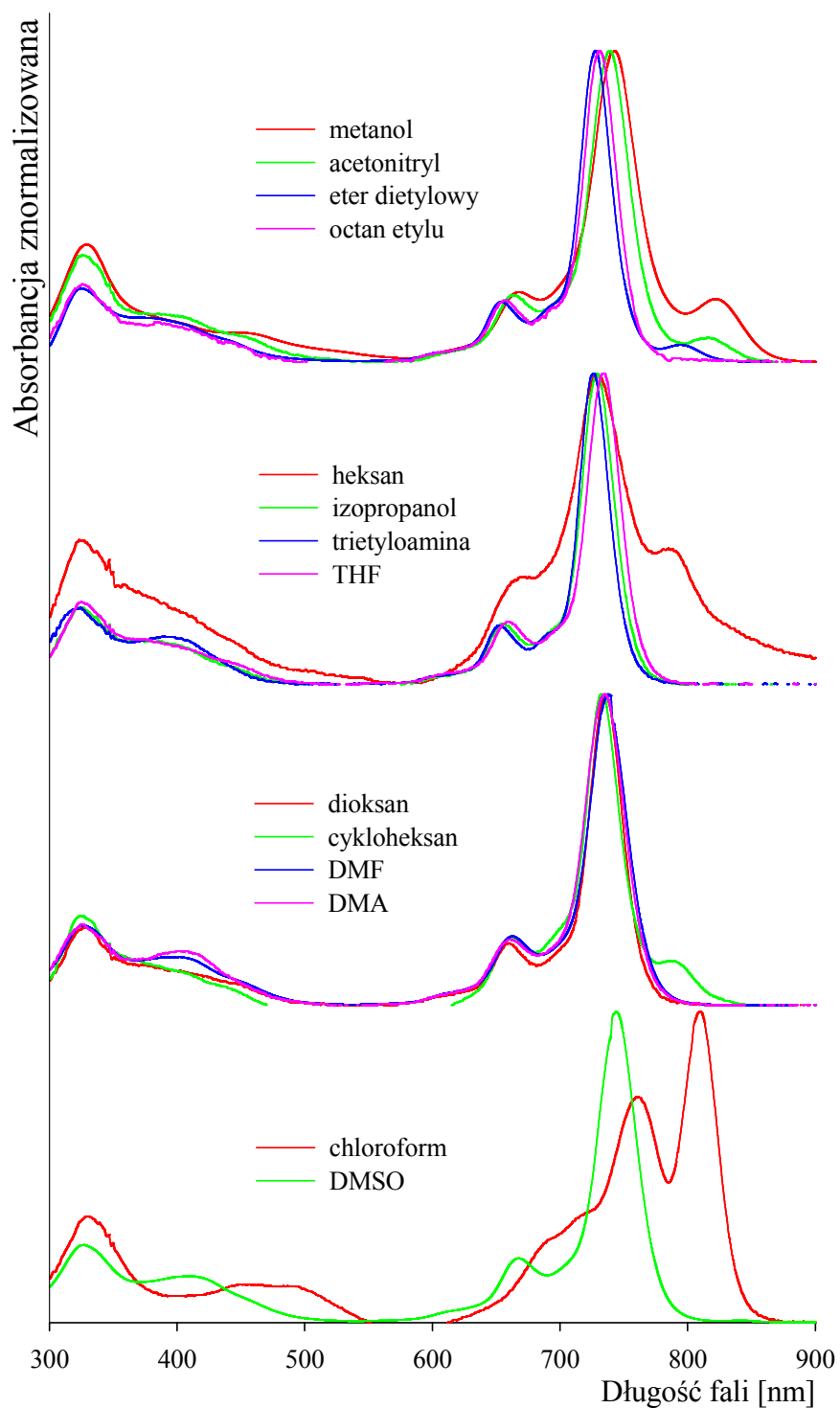
Ryc. 12. Widma elektronowe ftalocyjaniny TG-I-162 w rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 4. Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-I-162 w zależności od rozpuszczalnika

Rozpuszczalnik	Pasma Soreta [nm]	Pasma Q [nm]		
		660	735	820
Metanol	326	660	735	820
Acetonitryl	327	---	735	811
Eter dietylowy	326	---	730	797
Octan etylu	323	---	732	799
Heksan	329	---	732	780
Izopropanol	327	655	729	---
Trietyloamina	336	654	727	---
THF	327	---	734	801
Dioksan	326	661	734	---
Cykloheksan	326	---	733	781
DMF	327	661	733	---
DMA	323	660	736	---
Chloroform	330	---	762	806
DMSO	327	665	743	---



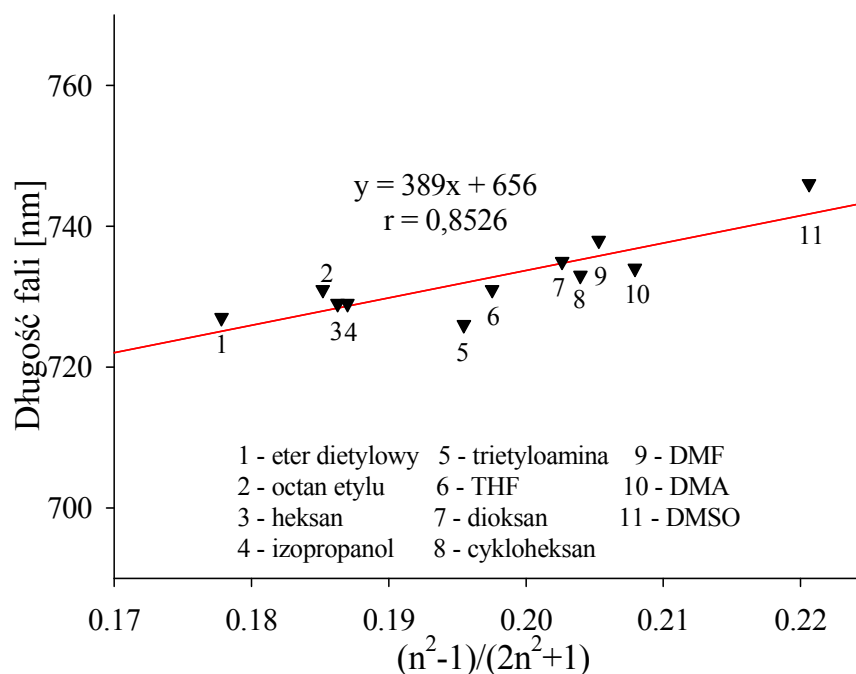
Ryc. 13. Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-I-162 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika



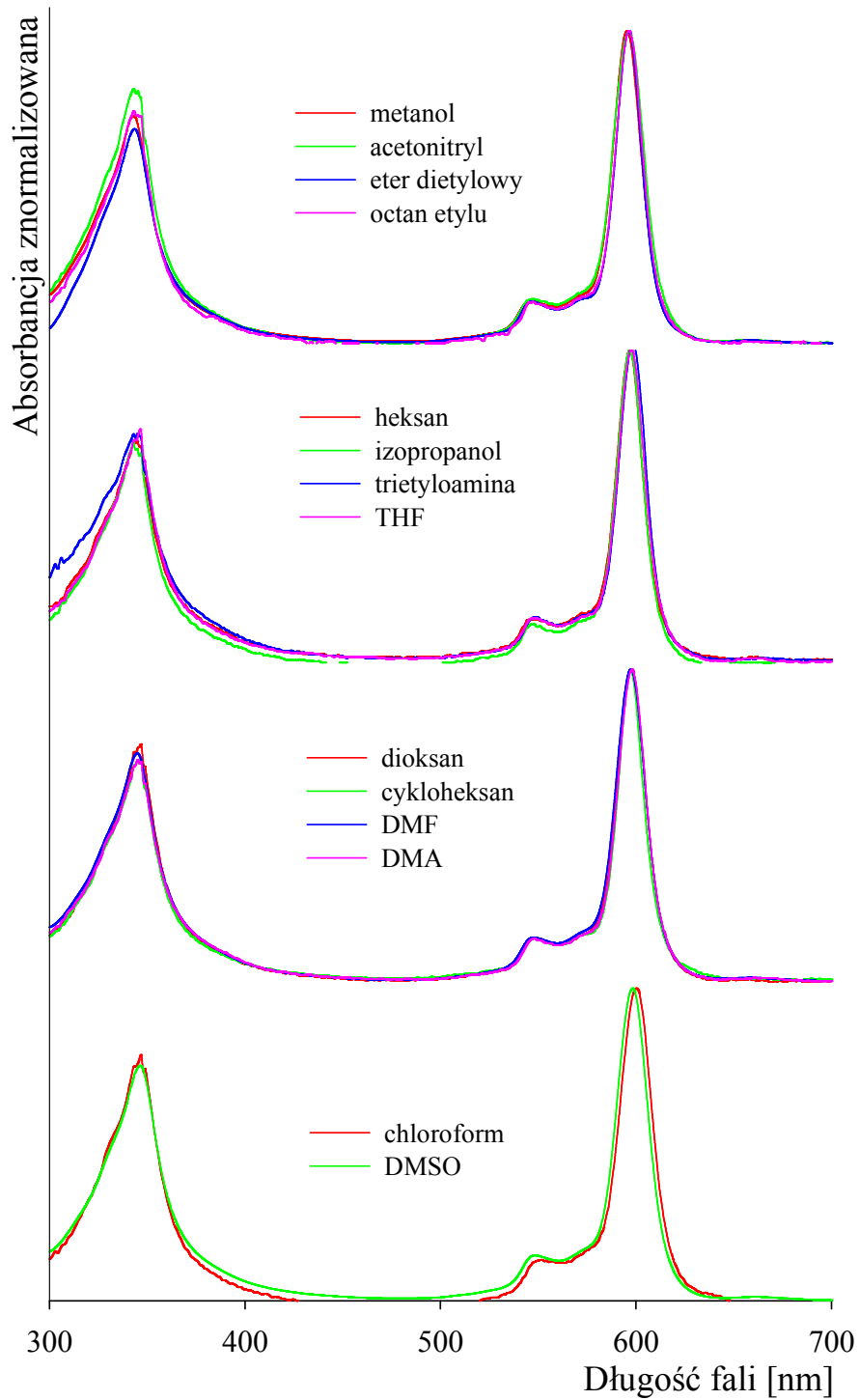
Ryc. 14. Widma elektronowe ftalocyjaniny TG-TO-1 w rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 5. Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-TO-1 w zależności od rozpuszczalnika

Rozpuszczalnik	Pasma Soreta		Pasma Q		
	[nm]		[nm]		
Metanol	329	668	742	822	
Acetonitryl	323	663	739	815	
Eter dietylowy	325	654	727	794	
Octan etylu	326	658	731	---	
Heksan	326	---	729	788	
Izopropanol	322	654	729	---	
Trietyloamina	321	652	726	---	
THF	325	658	731	---	
Dioksan	328	660	735	---	
Cykloheksan	326	661	733	789	
DMF	326	662	738	---	
DMA	325	661	734	---	
Chloroform	329	---	760	810	
DMSO	327	667	746	---	



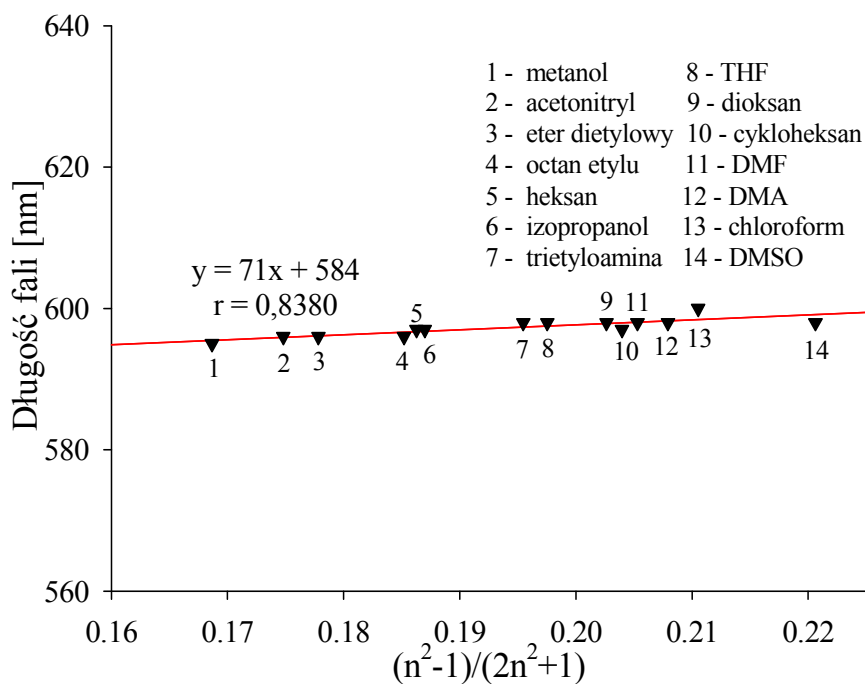
Ryc. 15. Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-TO-1 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika



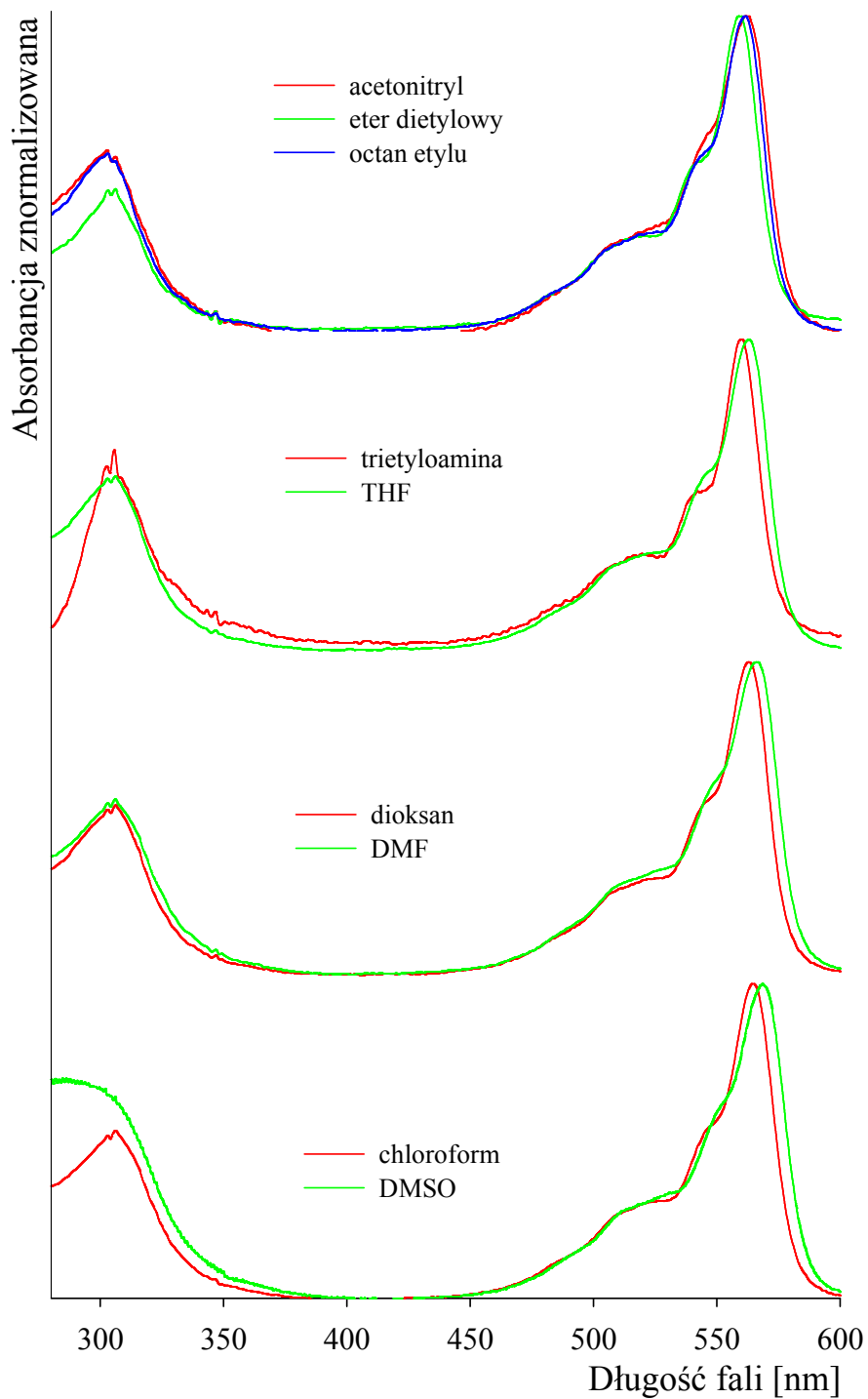
Ryc. 16. Widma elektronowe porfirazyny TG-I-123 w rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 6. Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q porfirazyny TG-I-123 w zależności od rozpuszczalnika

Rozpuszczalnik	Pasma Soreta [nm]	Pasma Q [nm]	
Metanol	343	546	595
Acetonitryl	343	550	596
Eter dietylowy	343	547	596
Octan etylu	345	547	596
Heksan	345	546	597
Izopropanol	343	548	597
Trietyloamina	347	548	598
THF	346	549	598
Dioksan	347	549	598
Cykloheksan	345	552	597
DMF	347	548	598
DMA	345	548	598
Chloroform	347	548	600
DMSO	346	548	598



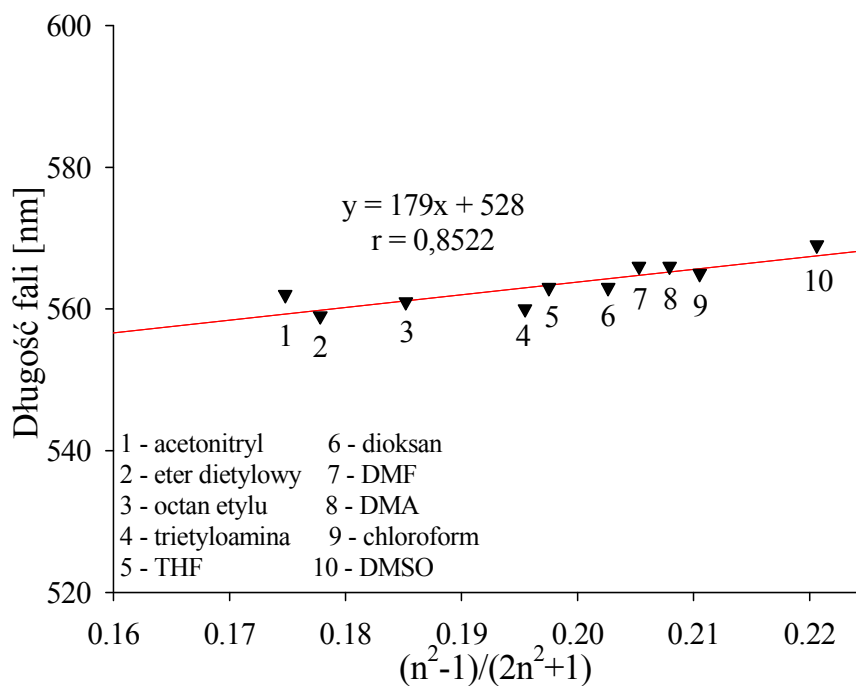
Ryc. 17. Zależność położenia λ_{\max} pasma Q porfirazyny TG-I-123 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika



Ryc. 18. Widma elektronowe subftalocyjaniny **SubPc** w rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 7. Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q subftalocyjaniny **SubPc** w zależności od rozpuszczalnika

Rozpuszczalnik	Pasma Soreta [nm]	Pasma Q [nm]
Metanol	związek nierozpuszczalny	
Acetonitryl	306	562
Eter dietylowy	306	559
Octan etylu	306	561
Heksan	związek nierozpuszczalny	
Izopropanol	związek nierozpuszczalny	
Trietyloamina	306	560
THF	306	563
Dioksan	306	563
Cykloheksan	związek nierozpuszczalny	
DMF	306	566
DMA	306	566
Chloroform	306	565
DMSO	283	569



Ryc. 19. Zależność położenia λ_{\max} pasma Q subftalocyjaniny **SubPc** od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika

2.2. Molowe współczynniki absorpcji

Molowe współczynniki absorpcji analizowanych związków wyznaczono w DMSO oraz DMF. Każdorazowo przygotowywano w łódeczkach aluminiowych po 3 odważki. Całość przenoszono do kolb miarowych i uzupełniano rozpuszczalnikiem do 10,0 cm³ otrzymując roztwory wzorcowe. Badane substancje odważano w ilości dokładnie ok. 1·10⁻⁶ g.

Wartość absorbancji przygotowanych roztworów mierzono w kuwetach $l = 0,5$ cm i wykorzystano do obliczenia molowych współczynników absorpcji, zgodnie z poniższym wzorem:

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

gdzie:

ε – molowy współczynnik absorpcji [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹]

A – absorbancja przy analizowanej długości fali

c – stężenie badanego roztworu [mol·dm⁻³]

l – długość drogi optycznej.

Średnie wartości molowych współczynników absorpcji oraz wartości logarytmiczne dla określonej długości fali przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wartości molowych współczynników absorpcji badanych porfirynoidów wyznaczone w DMSO oraz DMF

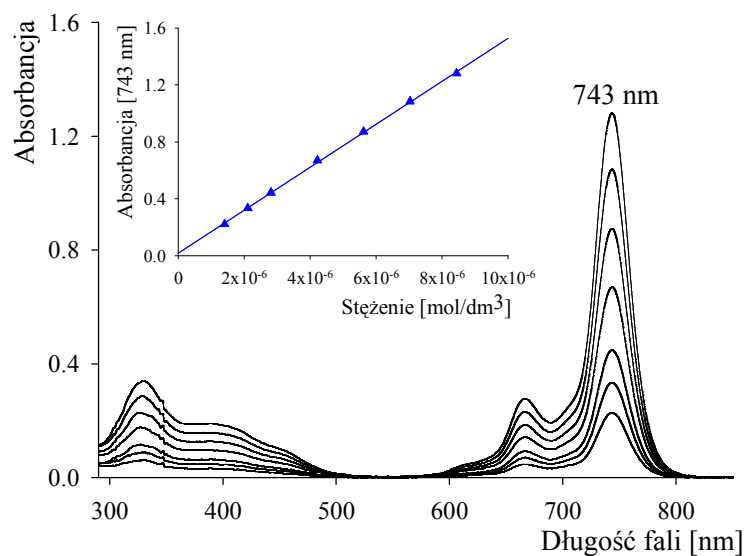
Rozpuszczalnik Związek	DMSO			DMF		
	λ_{\max} [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	log ϵ	λ_{\max} [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	log ϵ
TG-I-161	327	40200	4,60	326	39400	4,60
	665	32300	4,51	660	30900	4,49
	743	156200	5,20	736	157000	5,20
TG-I-162	327	46300	4,67	327	40600	4,61
	665	36300	4,56	661	33000	4,52
	743	176700	5,25	733	161800	5,20
TG-TO-1	327	44000	4,64	326	46000	4,66
	667	34800	4,54	662	36300	4,56
	746	189900	5,23	738	154500	5,24
TG-I-123	346	39000	3,59	347	51800	4,71
	548	7300	3,86	548	9400	3,97
	598	52000	4,72	598	69100	4,84
SubPc	283	6900	3,84	306	34600	4,54
	569	9900	4,00	566	57500	4,76
ZnPc	343	35700	4,56	340	33300	4,52
	609	18800	4,27	604	22000	4,34
	671	141700	5,12	670	135200	5,19
DPBF	417	19900	4,30	417	21800	4,34

2.3. Ocena właściwości agregacyjnych

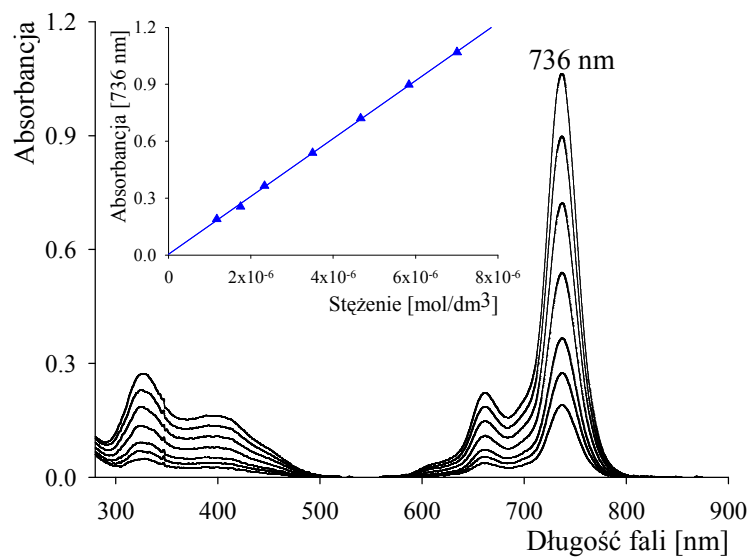
W celu oceny tendencji do agregacji, analizowano zależność absorbancji od stężenia porfirynoidów w roztworze DMSO oraz DMF. Substancje odważano z dokładnością do 10^{-6} g w łódeczkach aluminiowych. Następnie przygotowywano serię roztworów o stężeniach jak podano w tabeli 9 i wykreślano widma UV-Vis. Mierzono wartość absorbancji (A) przy długości fali w maksimum pasma Q. Parametry krzywych opisujących zależność $A = f(c)$ oraz ocenę statystyczną zamieszczono w tabeli 10.

Tabela 9. Stężenia porfirynoidów wykorzystane do analizy zależności $A = f(c)$

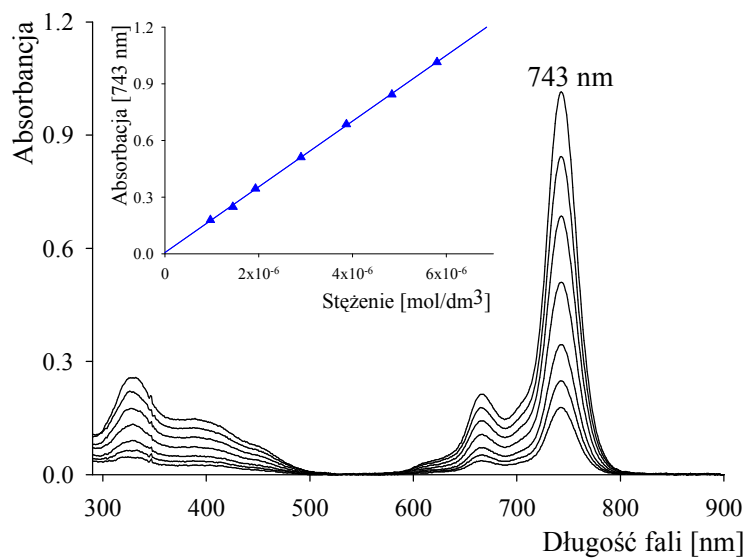
Rozpuszczalnik	Związek	Wielkość odważki [mg]	Stężenie $10^6 \cdot c$ [mol/dm ³]	Rycina
DMSO	TG-I-161	0,165	1,41 - 8,44	20
	TG-I-162	0,120	0,97 - 5,80	22
	TG-TO-1	0,106	1,15 - 4,59	24
	TG-I-123	0,120	2,55 - 17,82	26
	SubPc	0,450	20,90 - 104,49	28
	ZnPc	0,240	0,81 - 8,04	30
DMF	TG-I-161	0,137	1,17 - 7,01	21
	TG-I-162	0,178	1,43 - 8,61	23
	TG-TO-1	0,132	1,91 - 8,79	25
	TG-I-123	0,124	3,07 - 18,42	27
	SubPc	0,248	3,84 - 19,20	29
	ZnPc	0,151	2,38 - 8,71	31



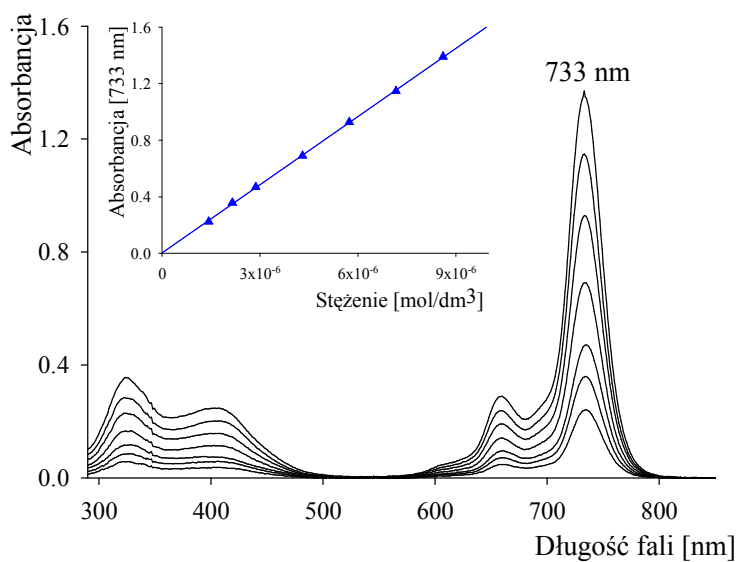
Ryc. 20. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO; pomiary przy $\lambda=743$ nm



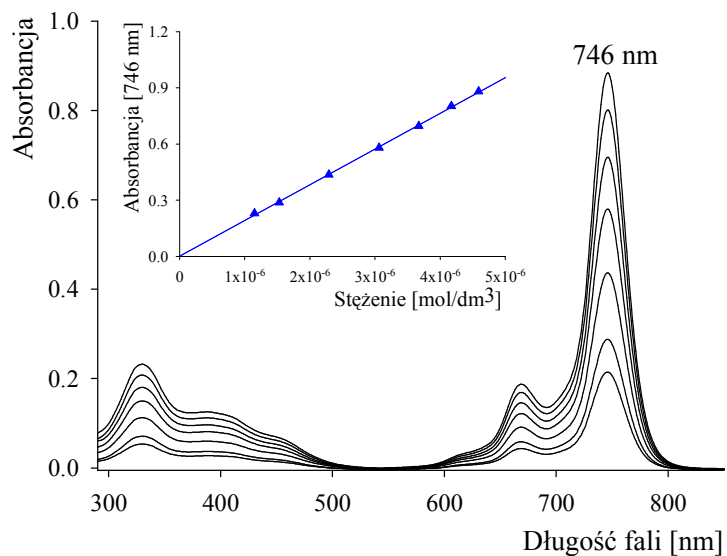
Ryc. 21. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161 w DMF; pomiary przy $\lambda=736$ nm



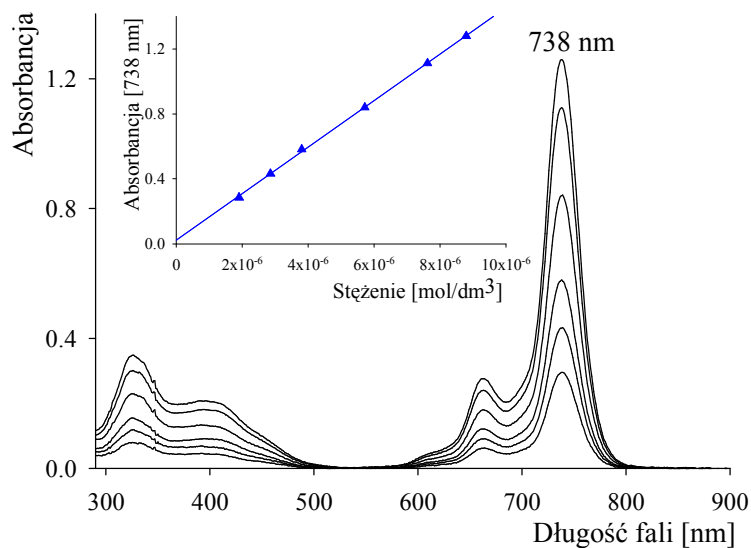
Ryc. 22. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162 w DMSO; pomiary przy $\lambda=743$ nm



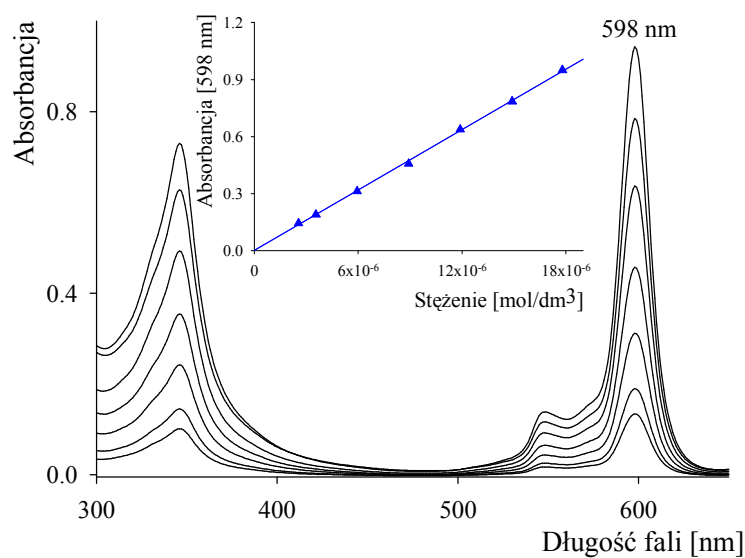
Ryc. 23. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162 w DMF; pomiary przy $\lambda=733$ nm



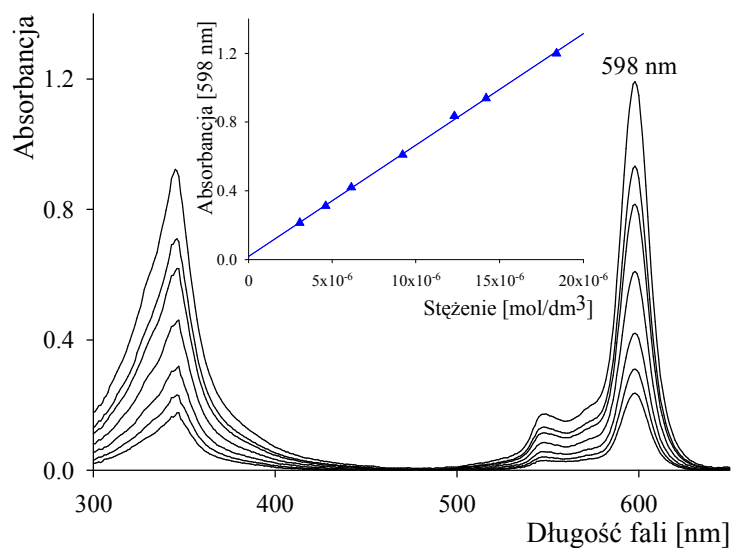
Ryc. 24. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO; pomiary przy $\lambda=746$ nm



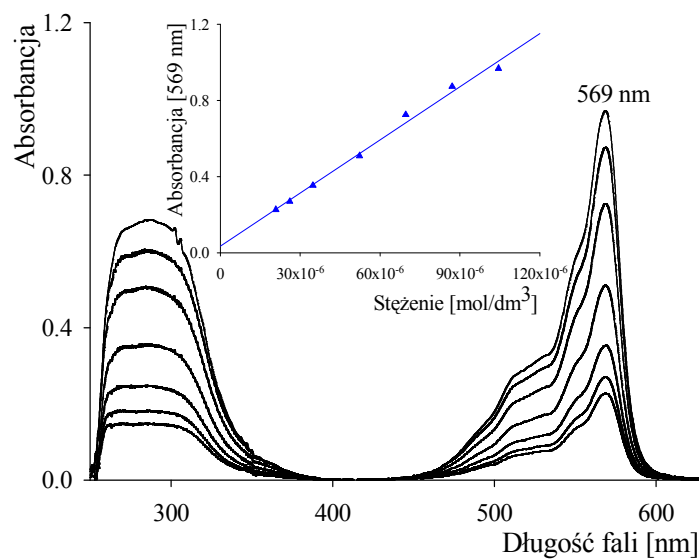
Ryc. 25. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMF; pomiary przy $\lambda=738$ nm



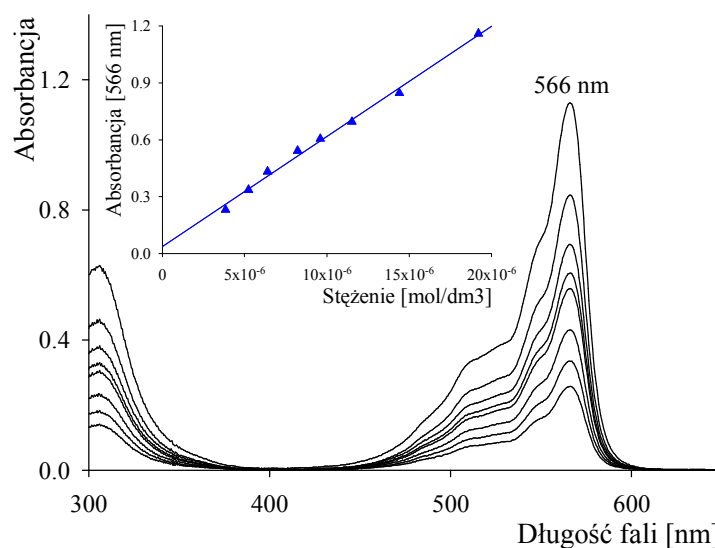
Ryc. 26. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis porfirazyny TG-I-123 w DMSO; pomiary przy $\lambda=598$ nm



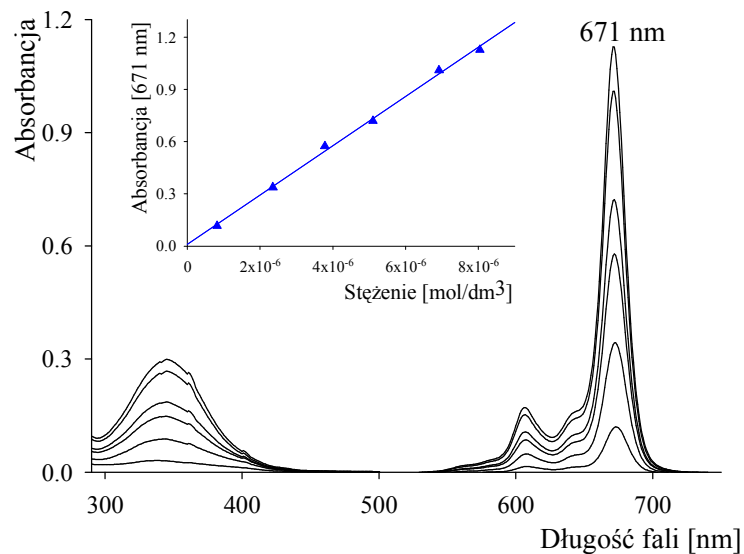
Ryc. 27. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis porfirazyny TG-I-123 w DMF; pomiary przy $\lambda=598$ nm



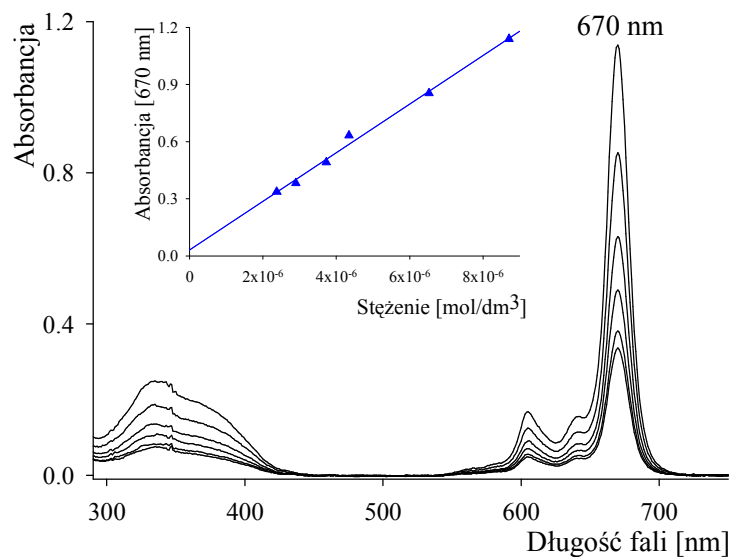
Ryc. 28. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO; pomiary przy $\lambda=569$ nm



Ryc. 29. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis subftalocyjaniny **SubPc** w DMF; pomiary przy $\lambda=566$ nm



Ryc. 30. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny **ZnPc** w DMSO; pomiary przy $\lambda=671$ nm



Ryc. 31. Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny **ZnPc** w DMF; pomiary przy $\lambda=670$ nm

Tabela. 10. Parametry zależności $A = f(c)$ badanych związków w DMSO i DMF oraz ocena statystyczna

Rozpuszczalnik	Związek	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	S_a	S_b	t_b	r	n
DMSO	TG-I-161	$(1,51 \pm 0,04) \cdot 10^5$	$1,79 \cdot 10^{-2} \pm 1,98 \cdot 10^{-2}$	$1,51 \cdot 10^3$	$0,77 \cdot 10^{-2}$	2,313	0,9998	7
	TG-I-162	$(1,74 \pm 0,03) \cdot 10^5$	$5,10 \cdot 10^{-3} \pm 1,23 \cdot 10^{-2}$	$1,36 \cdot 10^3$	$0,48 \cdot 10^{-2}$	1,069	0,9998	7
	TG-TO-1	$(1,91 \pm 0,05) \cdot 10^5$	$0,08 \cdot 10^{-2} \pm 1,57 \cdot 10^{-2}$	$1,93 \cdot 10^3$	$0,61 \cdot 10^{-2}$	0,130	0,9997	7
	TG-I-123	$(0,53 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$0,01 \cdot 10^{-2} \pm 1,75 \cdot 10^{-2}$	$0,63 \cdot 10^3$	$0,68 \cdot 10^{-2}$	0,021	0,9996	7
	SubPc	$(0,93 \pm 0,10) \cdot 10^4$	$3,54 \cdot 10^{-2} \pm 6,12 \cdot 10^{-2}$	$0,37 \cdot 10^3$	$2,38 \cdot 10^{-2}$	1,491	0,9960	7
	ZnPc	$(1,41 \pm 0,10) \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^{-2} \pm 5,10 \cdot 10^{-2}$	$0,36 \cdot 10^3$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	0,563	0,9987	6
DMF	TG-I-161	$(1,53 \pm 0,04) \cdot 10^5$	$4,30 \cdot 10^{-3} \pm 1,85 \cdot 10^{-2}$	$1,68 \cdot 10^3$	$0,72 \cdot 10^{-2}$	0,596	0,9997	7
	TG-I-162	$(1,61 \pm 0,03) \cdot 10^5$	$2,30 \cdot 10^{-3} \pm 1,59 \cdot 10^{-2}$	$1,18 \cdot 10^3$	$0,62 \cdot 10^{-2}$	0,379	0,9998	7
	TG-TO-1	$(1,43 \pm 0,04) \cdot 10^5$	$2,14 \cdot 10^{-2} \pm 2,22 \cdot 10^{-2}$	$1,40 \cdot 10^3$	$0,80 \cdot 10^{-2}$	2,676	0,9998	6
	TG-I-123	$(6,48 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$1,79 \cdot 10^{-2} \pm 2,31 \cdot 10^{-2}$	$0,82 \cdot 10^3$	$0,90 \cdot 10^{-2}$	1,997	0,9996	7
	SubPc	$(0,58 \pm 0,40) \cdot 10^5$	$3,67 \cdot 10^{-2} \pm 4,50 \cdot 10^{-2}$	$0,17 \cdot 10^3$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	1,989	0,9975	8
	ZnPc	$(1,27 \pm 0,14) \cdot 10^5$	$3,14 \cdot 10^{-2} \pm 7,25 \cdot 10^{-2}$	$0,50 \cdot 10^3$	$2,61 \cdot 10^{-2}$	1,202	0,9969	6
<p>a - współczynnik kierunkowy prostej $y = ax + b$ Δa - przedział ufności współczynnika kierunkowego prostej b - wartość rzędnej dla $x = 0$ Δb - przedział ufności współczynnika b S_a - błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej S_b - błąd standardowy współczynnika b t_b - parametr t obliczony empirycznie dla współczynnika b r - współczynnik regresji n - liczba pomiarów</p>								

2.4. Właściwości emisyjne i wydajność kwantowa fluorescencji

Właściwości emisyjne badanych fotouczulaczy oceniono wykreślając widma fluorescencji w DMSO. Roztwory do badań przygotowywano w ten sposób, aby wartość absorbancji przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q, była mniejsza od 0,1. Pomiary wykonano w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Związki wzbudzano promieniowaniem o długości fali z zakresu pasma Soreta oraz pasma Q.

Widma fluorescencji rejestrowane w wyniku wzbudzenia promieniowaniem z zakresu pasma Q oraz widma absorpcji badanych związków przedstawiono odpowiednio na ryc. 32-37:

ryc. 32	TG-I-161
ryc. 33	TG-I-162
ryc. 34	TG-TO-1
ryc. 35	TG-I-123
ryc. 36	SubPc
ryc. 37	ZnPc

Natomiast długość fali wzbudzenia, długość fali odpowiadającej maksimum widm fluorescencji oraz wartości przesunięć Stoke'asa zamieszczono w tabeli 11.

Wydajność kwantową fluorescencji (Φ_f) badanych związków wyznaczono metodą porównawczą, zgodnie z równaniem:

$$\Phi_{fp} = \frac{\int F_p(\lambda)}{\int F_{qc}(\lambda)} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{qc}}}{1 - 10^{-A_p}} \cdot \Phi_{fqc}$$

gdzie:

Φ_{fp} - wydajność kwantowa fluorescencji substancji badanej

Φ_{fqc} - wydajność kwantowa fluorescencji wzorca

F_p - natężenie fluorescencji substancji badanej

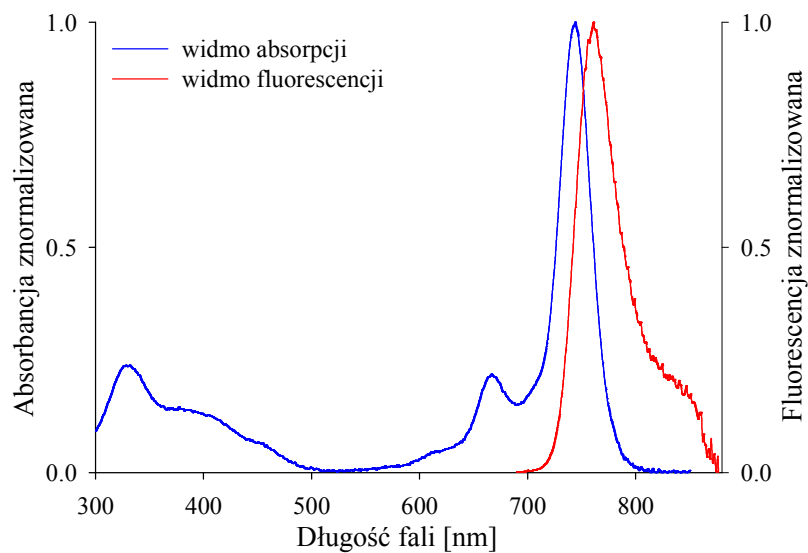
F_{qc} - natężenie fluorescencji wzorca

A_p - wartość absorbancji substancji badanej przy długości fali wzbudzenia

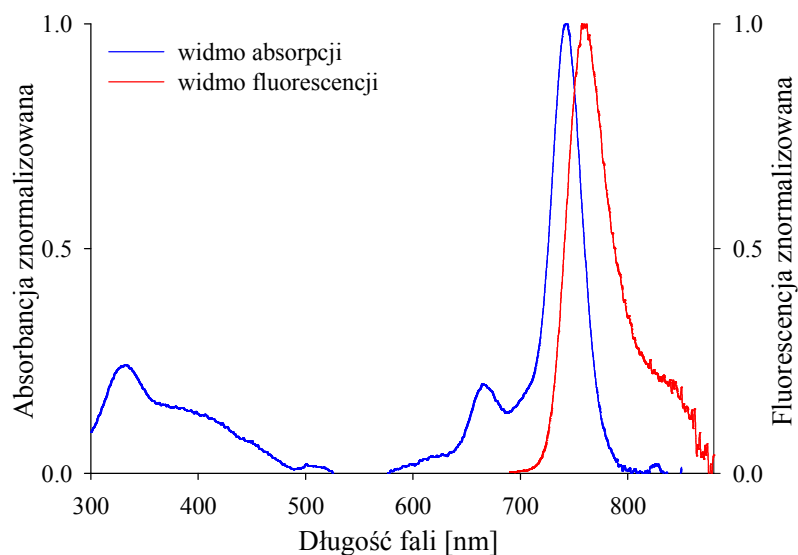
A_{qc} - wartość absorbancji wzorca przy długości fali wzbudzenia [24].

Jako substancję wzorcową wykorzystano ftalocyjaninę cynkową, której wydajność kwantową fluorescencji (Φ_{fqc}) zaczerpnięto z piśmiennictwa i przyjęto jako $0,20 \pm 0,03$ [114].

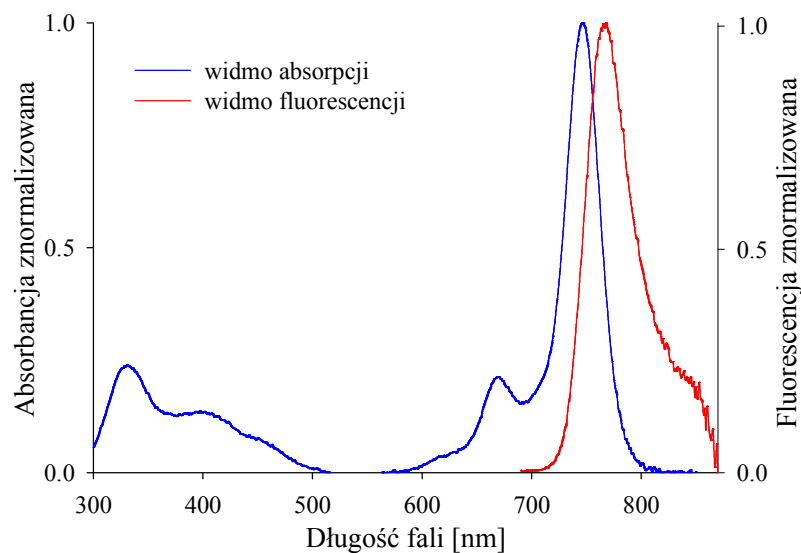
Wartości wydajności kwantowych fluorescencji, uzyskane dla wzbudzeń w paśmie Soreta oraz paśmie Q przedstawiono w tabeli 12.



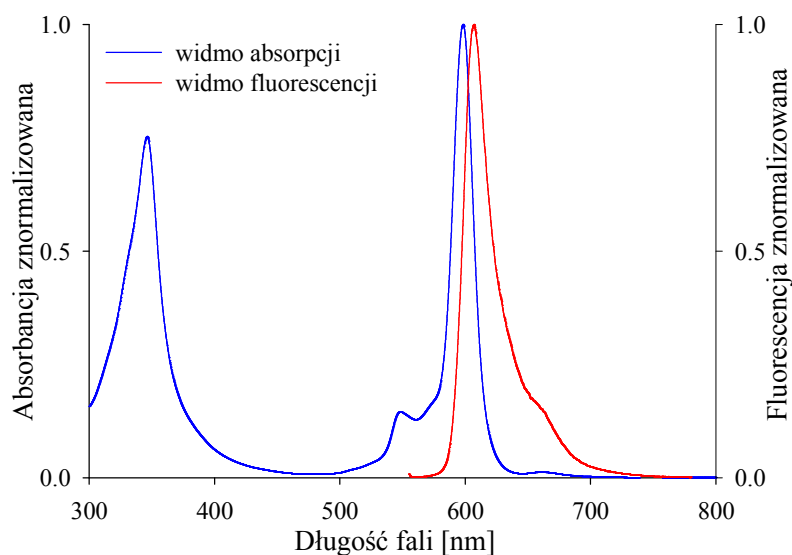
Ryc. 32. Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny **TG-I-161** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm



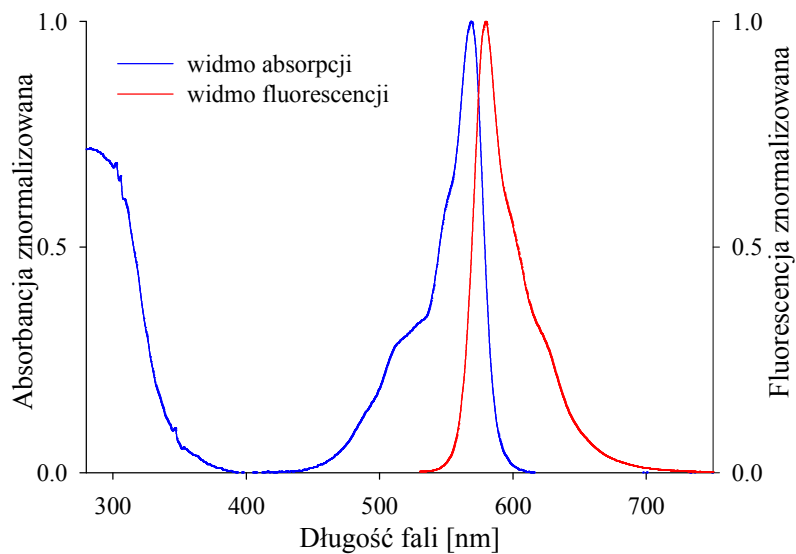
Ryc. 33. Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny **TG-I-162** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm



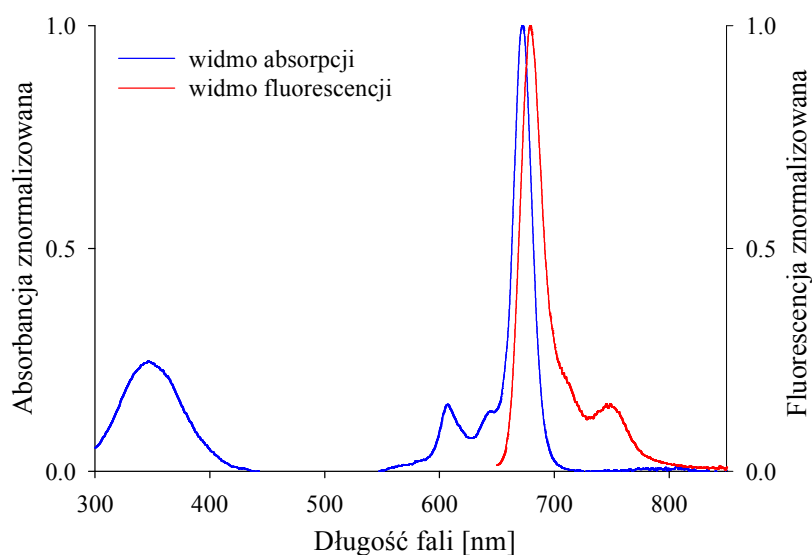
Ryc. 34. Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny **TG-TO-1** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm



Ryc. 35. Widmo absorpcji i fluorescencji porfirazyny **TG-I-123** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 550 nm



Ryc. 36. Widmo absorpcji i fluorescencji subftalocyjaniny **SubPc** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 520 nm



Ryc. 37. Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny **ZnPc** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 645 nm

Tabela 11. Długość fali odpowiadająca maksimum widm emisji oraz wartości przesunięć Stokes'a badanych porfirynoidów

Związek	λ wzbudzenia [nm]	λ_{\max} emisji [nm]	Przesunięcie Stokes'a [nm]
TG-I-161	670	761	18
TG-I-162	670	761	18
TG-TO-1	670	767	21
PzMg	550	607	9
SubPc	520	580	11
ZnPc	645	678	7

Związek	Wydajność kwantowa fluorescencji po wzbudzeniu w paśmie	
	Soreta	Q
TG-I-161	$0,066 \pm 0,011$	$0,05 \pm 0,02$
TG-I-162	$0,067 \pm 0,011$	$0,07 \pm 0,02$
TG-TO-1	$0,066 \pm 0,012$	$0,05 \pm 0,02$
ZnPc	---	$0,20 \pm 0,03$ [114]

Tabela 12. Wydajność kwantowa fluorescencji badanych porfirynoidów wyznaczona po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q

3. Ocena zdolności generowania tlenu singletowego

3.1. Metodyka pomiaru

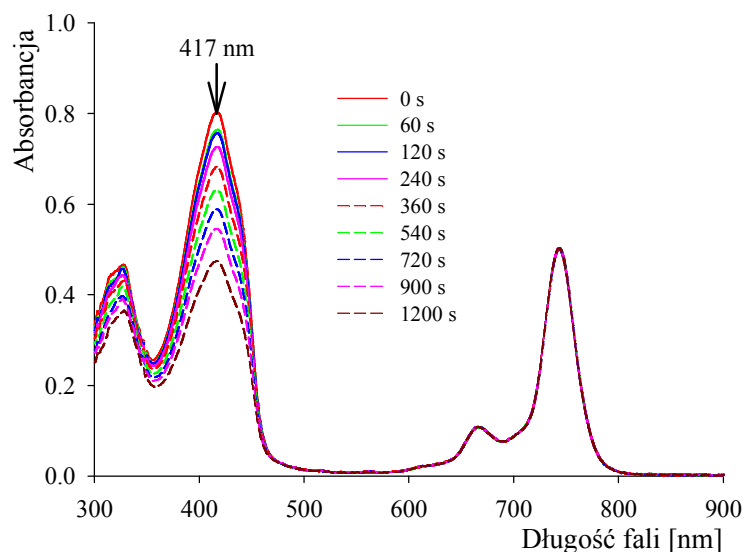
Zdolność badanych porfirynoidów do generowania tlenu singletowego analizowano w DMSO oraz DMF. Wykorzystano układ składający się z wysokociśnieniowej łukowej lampy ksenonowej o mocy 150 W oraz monochromatora. Jako wygaszacz tlenu singletowego zastosowano 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF). Przygotowywano dwa roztwory:

(a) zawierający DPBF o stężeniu $\sim 6,0 \times 10^{-5}$ mol/dm³

(b) roztwory fotouczulaczy, których stężenie dobierano w ten sposób, aby wartość absorbancji przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q, wynosiła $\sim 1,0$.

Uzyskane roztwory (a) i (b) mieszano w proporcji objętościowej 1:1, a następnie przenoszono do kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Próbkę naświetlano promieniowaniem monochromatycznym (± 2 nm) o natężeniu $\sim 1,0$ mW/cm². Maksymalny czas ekspozycji wynosił 1200 s. Długość fali promieniowania padającego na kuwetę, odpowiadała maksimum absorpcji danego fotouczulacza w paśmie Q. Rozkład DPBF monitorowano wykreślając widma UV-Vis w określonych odstępach czasu i mierzono wartość absorbancji przy 417 nm. Pomiar wykonywano w temperaturze pokojowej w warunkach tlenowych, jak również po 20 min odtlenowaniu roztworów azotem.

Na ryc. 38 przedstawiono zmiany przebiegu widma UV-Vis, odpowiadające różnym czasom naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz DPBF w DMSO, w warunkach tlenowych.



Ryc. 38. Zmiany przebiegu widm UV-Vis w wyniku naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz DPBF w DMSO (warunki tlenowe)

3.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych oraz wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego wyznaczono metodą porównawczą. Jako wzorzec zastosowano ftalocyjaninę cynkową (**ZnPc**), której wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego, zgodnie z danymi z piśmiennictwa wynosi: 0,67 w DMSO oraz 0,56 w DMF [114].

Zmiany zachodzące podczas naświetlania mieszanin badanych porfirynoidów z DPBF, analizowano jako zależność absorbancji przy 417 nm od czasu ekspozycji na promieniowanie, zgodnie z liniowym równaniem reakcji kinetycznej pierwszego rzędu:

$$\ln(A_0/A) = f(t)$$

gdzie: A_0 i A – wartość absorbancji przy 417 nm odpowiednio przed i po ekspozycji na promieniowanie

t – czas naświetlania [s].

Przebieg prostej opisującej zależność $\ln(A_0/A) = f(t)$ ustalono metodą najmniejszych kwadratów. Stałą szybkości rozkładu DPBF obliczono wg wzoru:

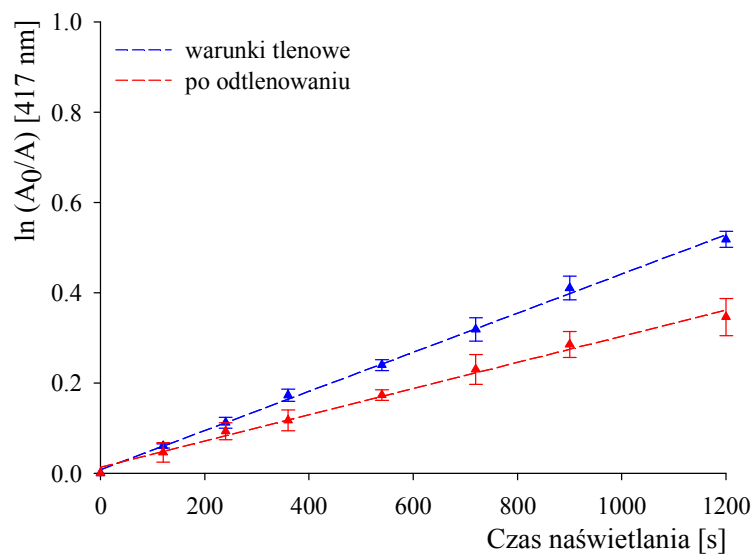
$$k = \operatorname{tg} \alpha = a$$

gdzie: a – współczynnik kierunkowy prostej, opisującej zależność: $\ln(A_0/A) = f(t)$.

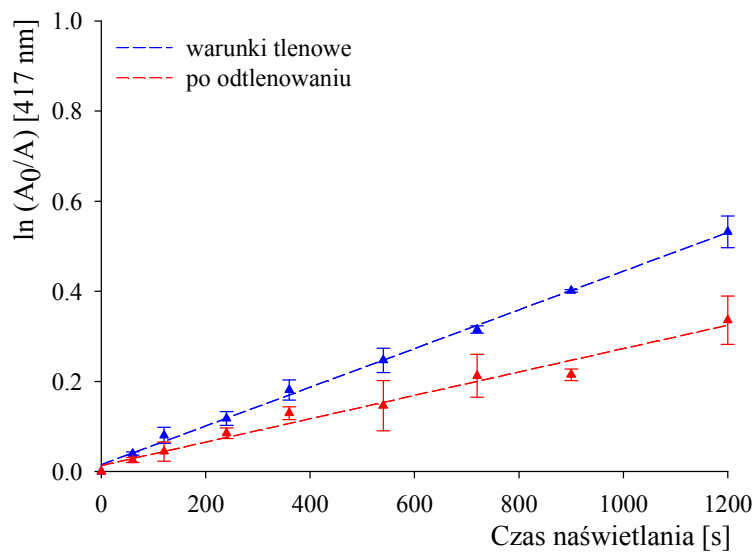
Wartości stałych k zależności $\ln(A_0/A) = f(t)$ dla badanych fotouczulaczy porównywano z wartościami uzyskanymi dla **ZnPc** (tabela 13). Wartości wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego zamieszczono w tabeli 14.

Zależność $\ln(A_0/A) = f(t)$ dla badanych związków w warunkach tlenowych i po odtlenowaniu przedstawiono odpowiednio na rycinach:

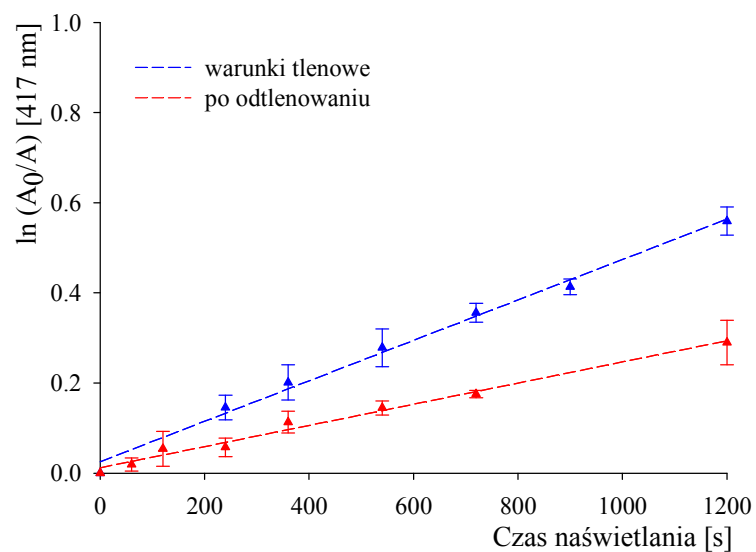
	ryc. 39	TG-I-161
	ryc. 40	TG-I-162
DMSO	ryc. 41	TG-TO-1
	ryc. 42	TG-I-123
	ryc. 43	SubPc
	ryc. 44	ZnPc
	ryc. 45	TG-I-161
	ryc. 46	TG-I-162
DMF	ryc. 47	TG-TO-1
	ryc. 48	TG-I-123
	ryc. 49	SubPc
	ryc. 50	ZnPc



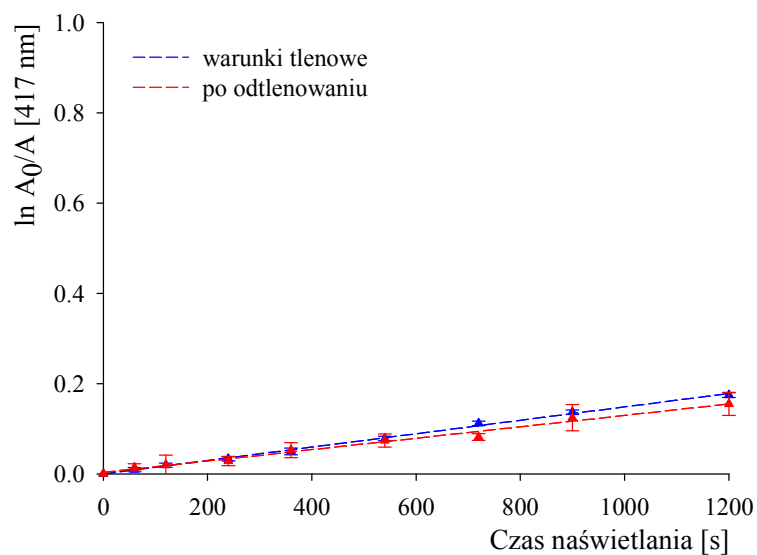
Ryc. 39. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-161 oraz DPBF w DMSO



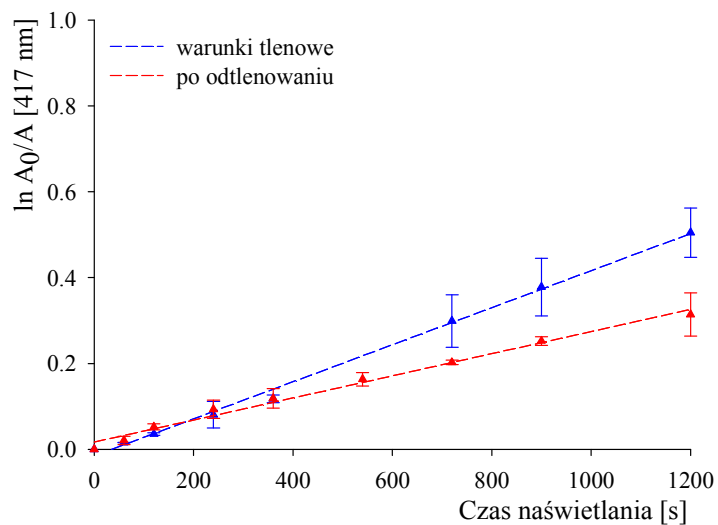
Ryc. 40. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-162 oraz DPBF w DMSO



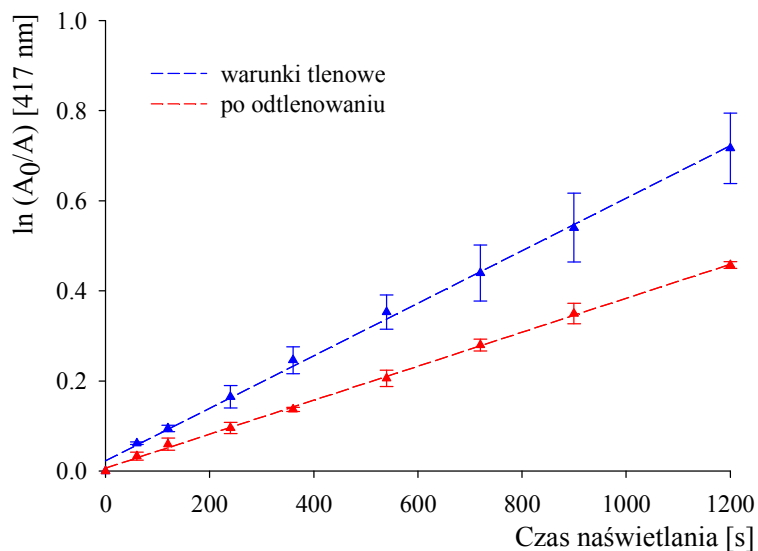
Ryc. 41. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny **TG-TO-1** oraz DPBF w DMSO



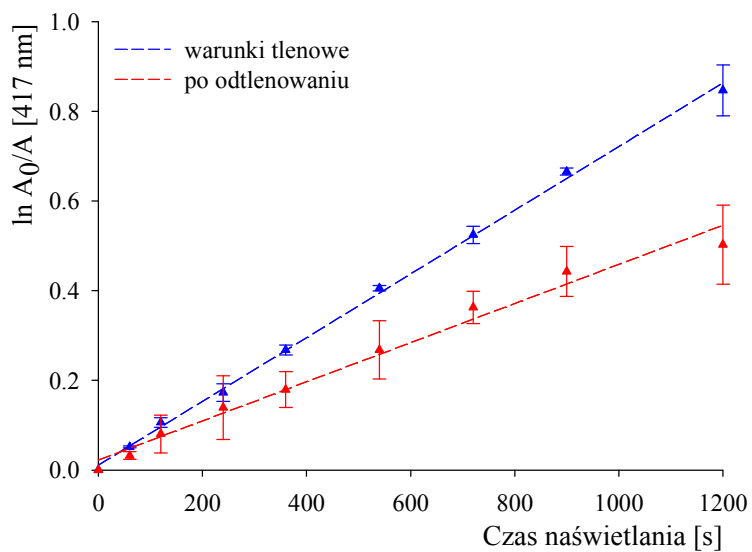
Ryc. 42. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny porfirazyny **TG-I-123** oraz DPBF w DMSO



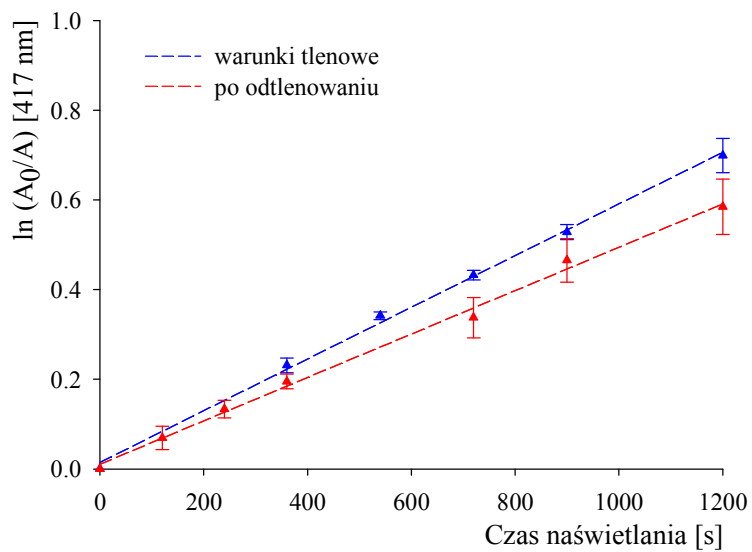
Ryc. 43. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszanki subftalocyjaniny **SubPc** oraz DPBF w DMSO



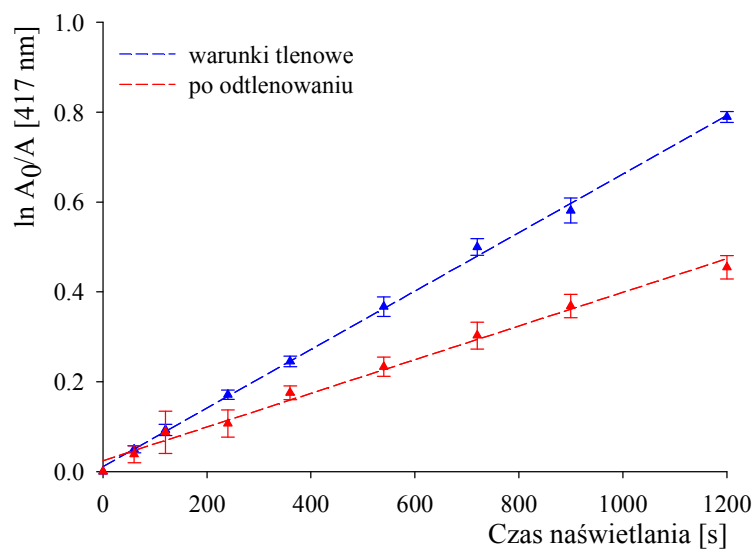
Ryc. 44. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszanki ftalocyjaniny **ZnPc** oraz DPBF w DMSO



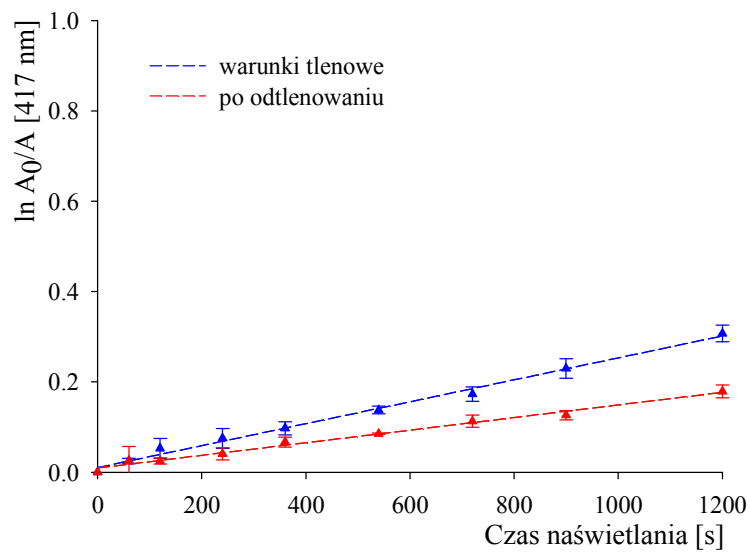
Ryc. 45. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-161 oraz DPBF w DMF



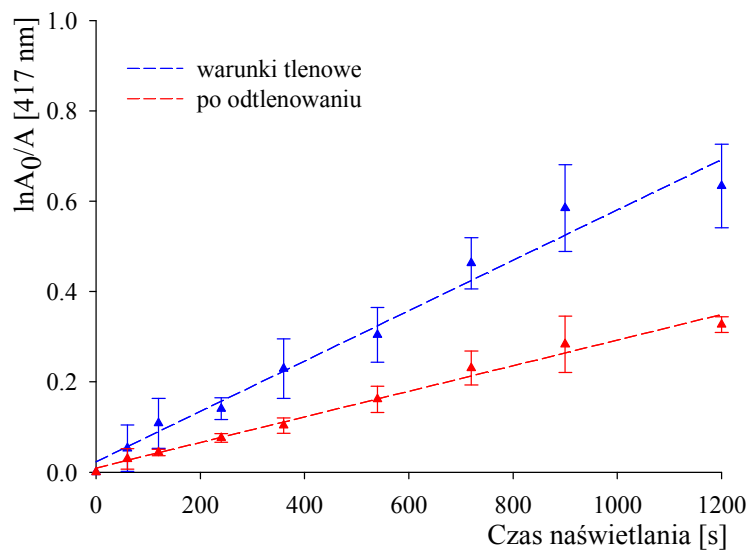
Ryc. 46. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-162 oraz DPBF w DMF



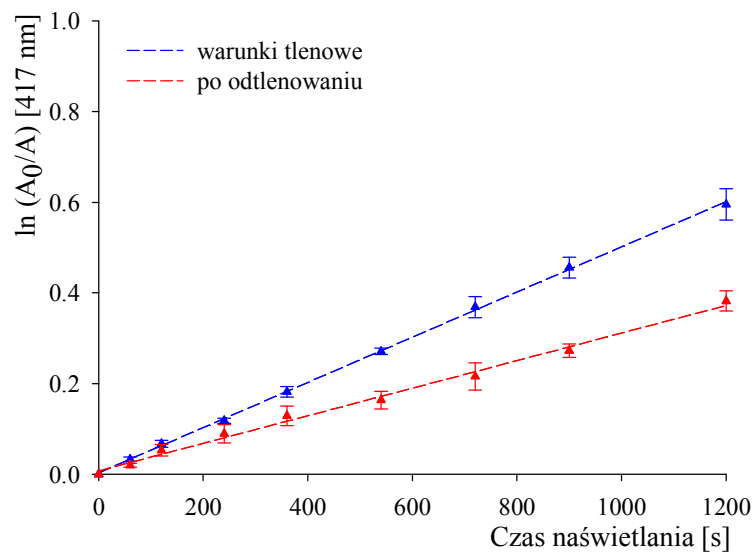
Ryc. 47. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny **TG-TO-1** oraz DPBF w DMF



Ryc. 48. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny porfirazyny **TG-I-123** oraz DPBF w DMF



Ryc. 49. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszanki subftalocyjaniny **SubPc** oraz DPBF w DMF



Ryc. 50. Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszanki ftalocyjaniny **ZnPc** oraz DPBF w DMF

WARUNKI TLENOWE								
Rozpuszczalnik	Związek	$10^4 \times (k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	$(b \pm \Delta b)$	S_k	S_b	t_b	r	n
DMSO	TG-I-161	$4,34 \pm 0,20$	$7,81 \cdot 10^{-3} \pm 1,28 \cdot 10^{-2}$	$8,40 \cdot 10^{-6}$	$0,54 \cdot 10^{-2}$	1,455	0,9959	9
	TG-I-162	$4,29 \pm 0,21$	$1,50 \cdot 10^{-2} \pm 1,28 \cdot 10^{-2}$	$8,92 \cdot 10^{-6}$	$0,54 \cdot 10^{-2}$	2,792	0,9947	9
	TG-TO-1	$4,48 \pm 0,43$	$2,53 \cdot 10^{-2} \pm 2,91 \cdot 10^{-2}$	$1,66 \cdot 10^{-5}$	$1,13 \cdot 10^{-2}$	2,241	0,9873	7
	TG-I-123	$1,48 \pm 0,06$	$-6,55 \cdot 10^{-2} \pm 0,35 \cdot 10^{-2}$	$2,55 \cdot 10^{-6}$	$0,15 \cdot 10^{-2}$	-0,043	0,9963	9
	SubPc	$4,31 \pm 0,43$	$-1,51 \cdot 10^{-2} \pm 2,62 \cdot 10^{-2}$	$1,76 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-2}$	-1,409	0,9822	8
	ZnPc	$5,83 \pm 0,47$	$2,27 \cdot 10^{-2} \pm 2,84 \cdot 10^{-2}$	$1,99 \cdot 10^{-5}$	$1,20 \cdot 10^{-2}$	1,885	0,9856	9
DMF	TG-I-161	$7,10 \pm 0,25$	$1,09 \cdot 10^{-2} \pm 1,51 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$0,64 \cdot 10^{-2}$	1,726	0,9972	9
	TG-I-162	$5,76 \pm 0,34$	$1,46 \cdot 10^{-2} \pm 2,47 \cdot 10^{-2}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$	$0,89 \cdot 10^{-2}$	1,651	0,9965	6
	TG-TO-1	$6,49 \pm 0,23$	$1,27 \cdot 10^{-2} \pm 1,49 \cdot 10^{-2}$	$9,57 \cdot 10^{-6}$	$0,61 \cdot 10^{-2}$	2,073	0,9976	8
	TG-I-123	$2,43 \pm 0,19$	$1,03 \cdot 10^{-2} \pm 1,11 \cdot 10^{-2}$	$7,85 \cdot 10^{-6}$	$0,47 \cdot 10^{-2}$	2,180	0,9872	9
	SubPc	$5,58 \pm 0,74$	$2,30 \cdot 10^{-2} \pm 4,47 \cdot 10^{-2}$	$3,14 \cdot 10^{-5}$	$1,89 \cdot 10^{-2}$	1,216	0,9625	9
	ZnPc	$4,99 \pm 0,18$	$2,93 \cdot 10^{-3} \pm 1,06 \cdot 10^{-2}$	$7,41 \cdot 10^{-6}$	$0,45 \cdot 10^{-2}$	0,657	0,9973	9
PO ODTLENOWANIU								
DMSO	TG-I-161	$2,90 \pm 0,30$	$1,32 \cdot 10^{-2} \pm 1,89 \cdot 10^{-2}$	$1,25 \cdot 10^{-5}$	$0,80 \cdot 10^{-2}$	1,645	0,9801	9
	TG-I-162	$2,59 \pm 0,37$	$1,33 \cdot 10^{-2} \pm 2,22 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-5}$	$0,94 \cdot 10^{-2}$	1,406	0,9574	9
	TG-TO-1	$2,35 \pm 0,33$	$1,16 \cdot 10^{-2} \pm 1,81 \cdot 10^{-2}$	$1,33 \cdot 10^{-5}$	$0,74 \cdot 10^{-2}$	1,566	0,9663	8
	TG-I-123	$1,27 \pm 0,18$	$2,88 \cdot 10^{-3} \pm 1,11 \cdot 10^{-2}$	$7,79 \cdot 10^{-6}$	$0,47 \cdot 10^{-2}$	0,614	0,9558	9
	SubPc	$2,58 \pm 0,24$	$1,67 \cdot 10^{-2} \pm 1,47 \cdot 10^{-2}$	$1,03 \cdot 10^{-5}$	$0,62 \cdot 10^{-2}$	2,693	0,9806	9
	ZnPc	$3,77 \pm 0,14$	$6,29 \cdot 10^{-3} \pm 8,51 \cdot 10^{-2}$	$5,90 \cdot 10^{-6}$	$0,36 \cdot 10^{-2}$	1,772	0,9969	9
DMF	TG-I-161	$4,36 \pm 0,59$	$2,23 \cdot 10^{-2} \pm 3,55 \cdot 10^{-2}$	$2,48 \cdot 10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^{-2}$	1,489	0,9618	9
	TG-I-162	$4,84 \pm 0,47$	$1,02 \cdot 10^{-2} \pm 3,06 \cdot 10^{-2}$	$1,83 \cdot 10^{-5}$	$1,19 \cdot 10^{-2}$	0,857	0,9867	7
	TG-TO-1	$3,75 \pm 0,32$	$2,40 \cdot 10^{-2} \pm 1,92 \cdot 10^{-2}$	$1,34 \cdot 10^{-5}$	$0,81 \cdot 10^{-2}$	2,976	0,9843	9
	TG-I-123	$1,40 \pm 0,16$	$9,32 \cdot 10^{-3} \pm 0,95 \cdot 10^{-2}$	$6,65 \cdot 10^{-6}$	$0,40 \cdot 10^{-2}$	2,328	0,9728	9
	SubPc	$2,83 \pm 0,33$	$9,10 \cdot 10^{-3} \pm 2,00 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-5}$	$0,82 \cdot 10^{-2}$	1,116	0,9726	9
	ZnPc	$3,04 \pm 0,21$	$7,18 \cdot 10^{-3} \pm 1,28 \cdot 10^{-2}$	$8,97 \cdot 10^{-6}$	$0,54 \cdot 10^{-2}$	1,328	0,9893	9

Tabela 13. Parametry prostych opisujących zależność $\ln(A_0/A) = f(t)$ wyznaczone dla badanych związków w warunkach tlenowych i po odtlenowaniu oraz ocena statystyczna

Tabela 14. Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez badane związki w roztworach DMSO oraz DMF; naświetlanie w warunkach tlenowych

Rozpuszczalnik	Związek	Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego; Φ_{Δ}
DMSO	TG-I-161	$0,49 \pm 0,04$
	TG-I-162	$0,49 \pm 0,04$
	TG-TO-1	$0,51 \pm 0,07$
	TG-I-123	$0,17 \pm 0,02$
	SubPc	$0,49 \pm 0,06$
DMF	TG-I-161	$0,79 \pm 0,04$
	TG-I-162	$0,65 \pm 0,05$
	TG-TO-1	$0,73 \pm 0,04$
	TG-I-123	$0,27 \pm 0,02$
	SubPc	$0,63 \pm 0,09$

4. Ocena trwałości fotochemicznej

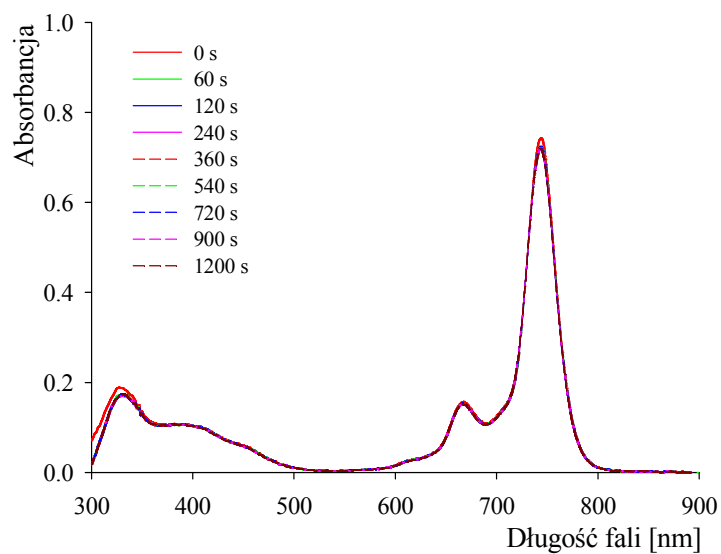
4.1. Metodyka pomiaru

Fotodegradacji poddano roztwory fotouczulaczy w DMSO oraz DMF. Stężenia poszczególnych związków zostały ustalone w ten sposób, aby wartość absorbancji przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q w danym rozpuszczalniku, wynosiła od 0,7 do 0,8. Analizowane roztwory przeniesiono do kuwety cylindrycznej o poj. 2,8 cm³ i długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Naświetlanie prowadzono z wykorzystaniem wysokociśnieniowej łukowej lampy UV-Vis z palnikiem ksenonowym XBO-50, wyposażonej w filtr szklany. Natężenie promieniowania padającego na próbkę wynosiło ~ 130 klux.

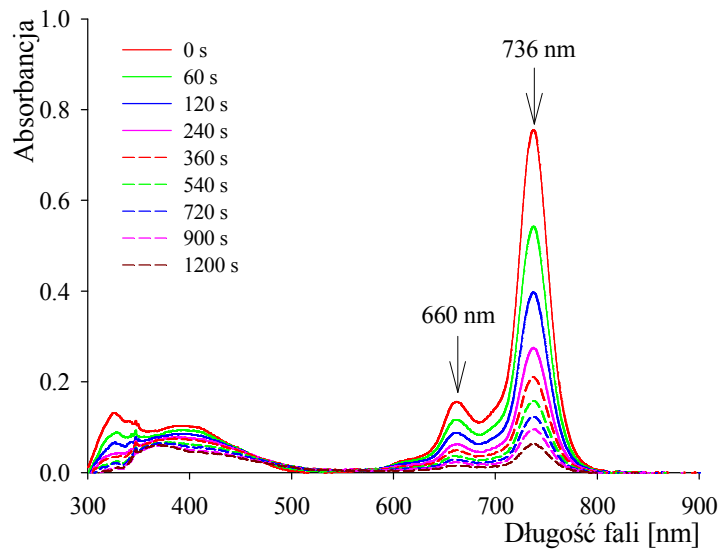
4.2. Ocena jakościowa rozkładu fotochemicznego

Ocena fotodegradacji metodą spektrofotometryczną polegała na wykreślaniu widm UV-Vis. Obserwowane zmiany przebiegu widm absorpcji w zależności od czasu ekspozycji na promieniowanie, przedstawiono odpowiednio na ryc. 51-62:

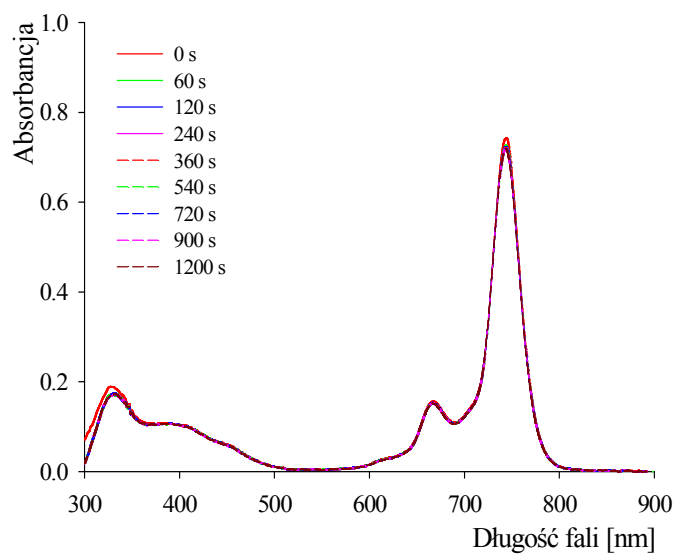
	ryc. 51	TG-I-161
	ryc. 53	TG-I-162
DMSO	ryc. 55	TG-TO-1
	ryc. 57	TG-I-123
	ryc. 59	SubPc
	ryc. 61	ZnPc
	ryc. 52	TG-I-161
	ryc. 54	TG-I-162
DMF	ryc. 56	TG-TO-1
	ryc. 58	TG-I-123
	ryc. 60	SubPc
	ryc. 62	ZnPc



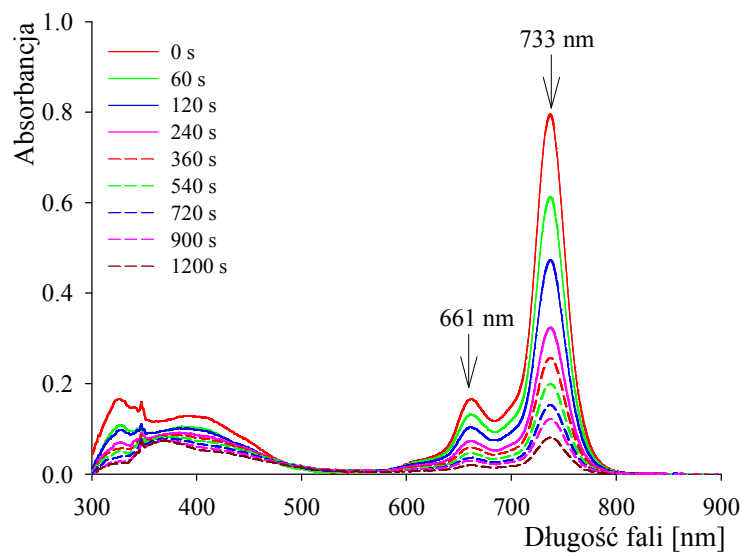
Ryc. 51. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-I-161** w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania



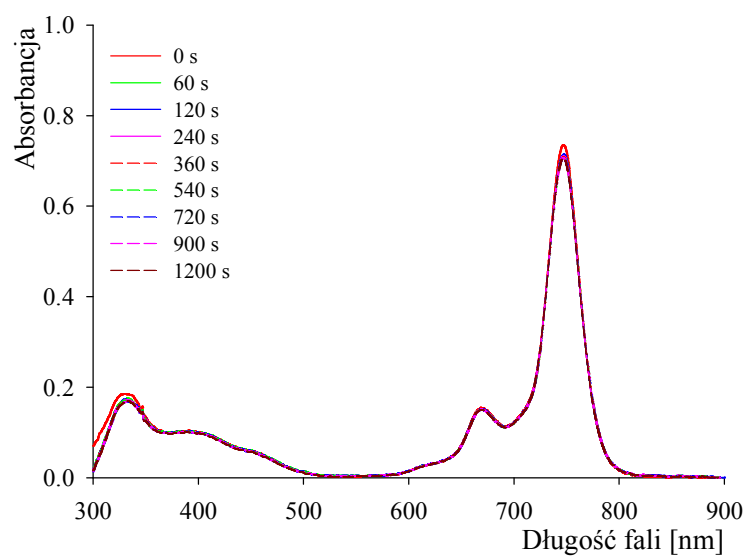
Ryc. 52. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-I-161** w DMF po odpowiednim czasie naświetlania



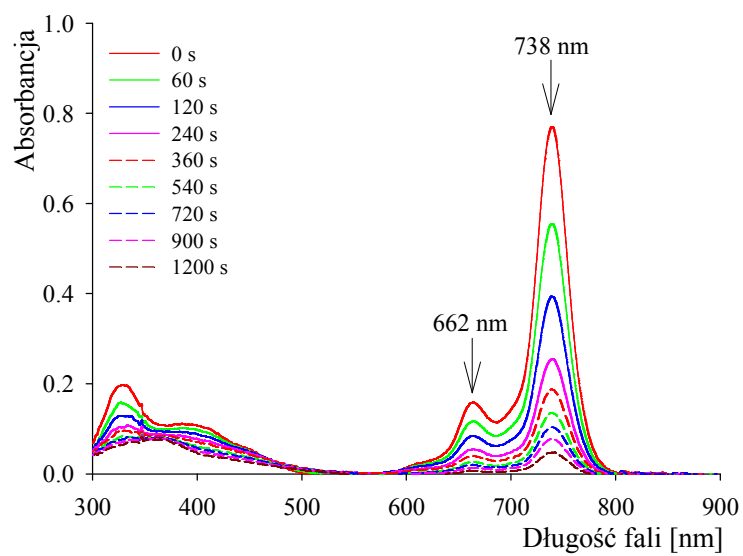
Ryc. 53. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-I-162** w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania



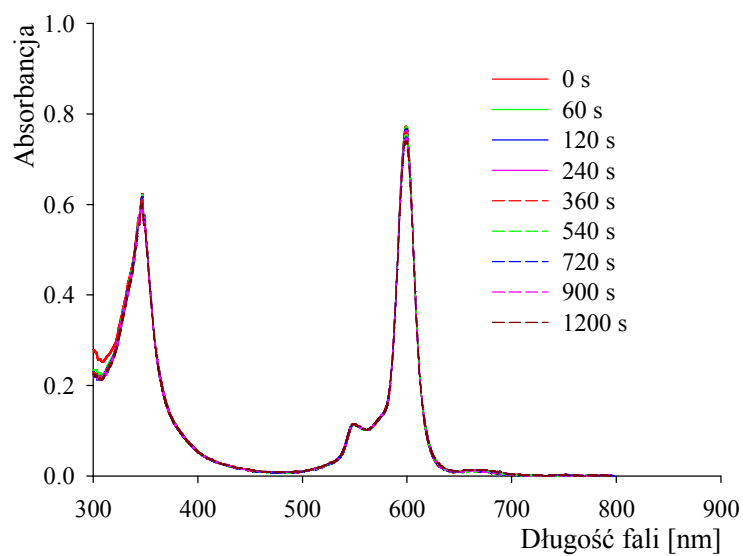
Ryc. 54. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-I-162** w DMF po odpowiednim czasie naświetlania



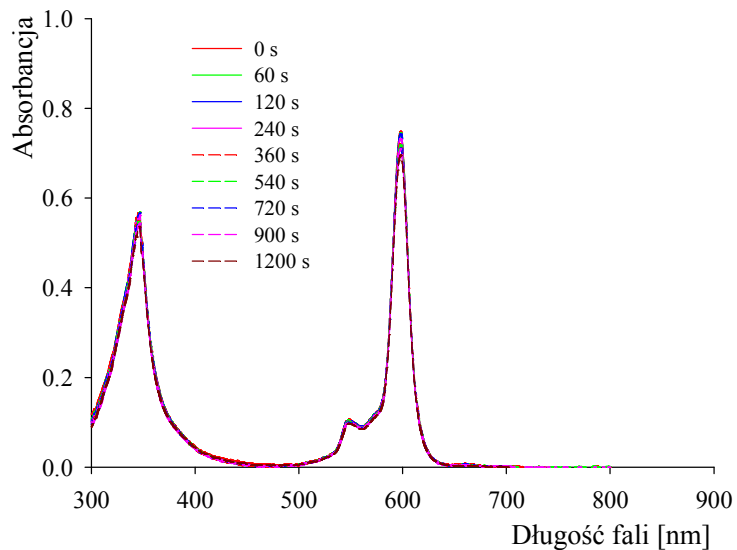
Ryc. 55. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-TO-1** w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania



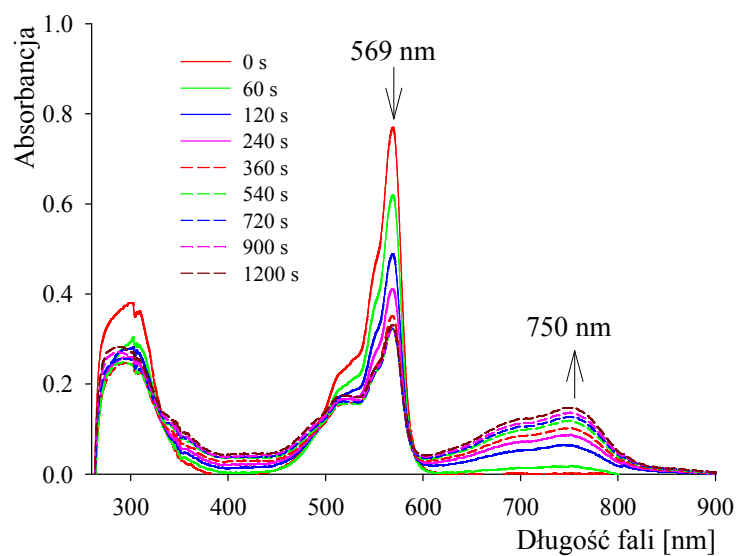
Ryc. 56. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **TG-TO-1** w DMF po odpowiednim czasie naświetlania



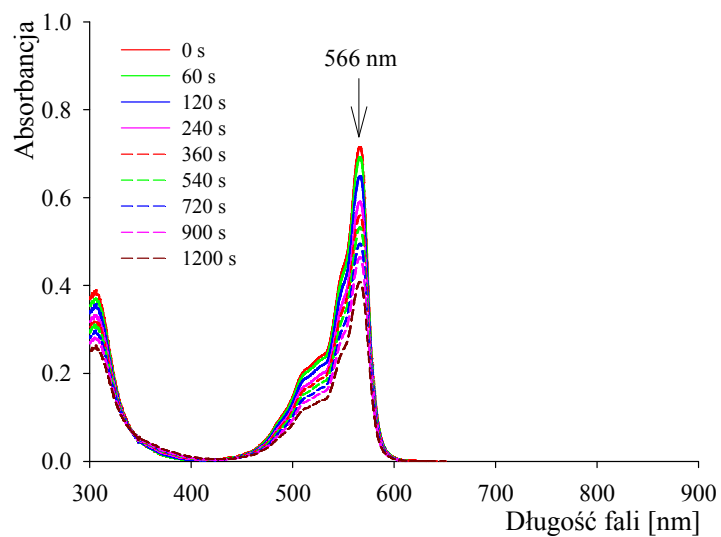
Ryc. 57. Elektronowe widma absorpcji porfirazyny **TG-I-123** w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania



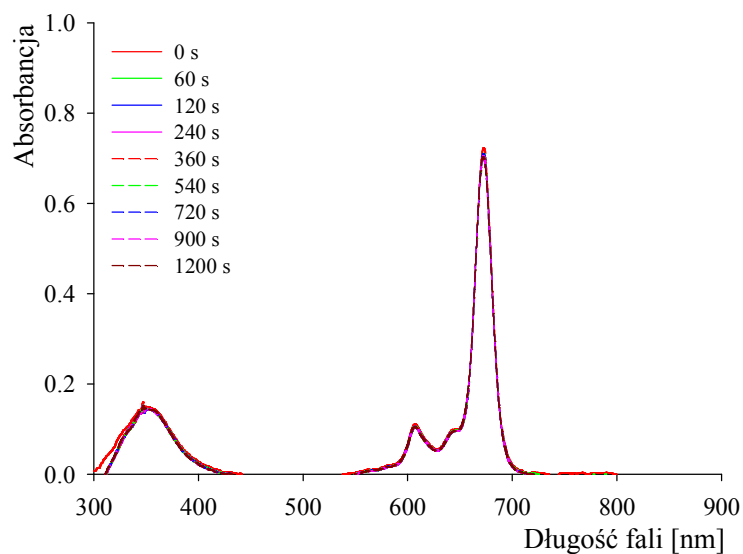
Ryc. 58. Elektronowe widma absorpcji porfirazyny **TG-I-123** w DMF po odpowiednim czasie naświetlania



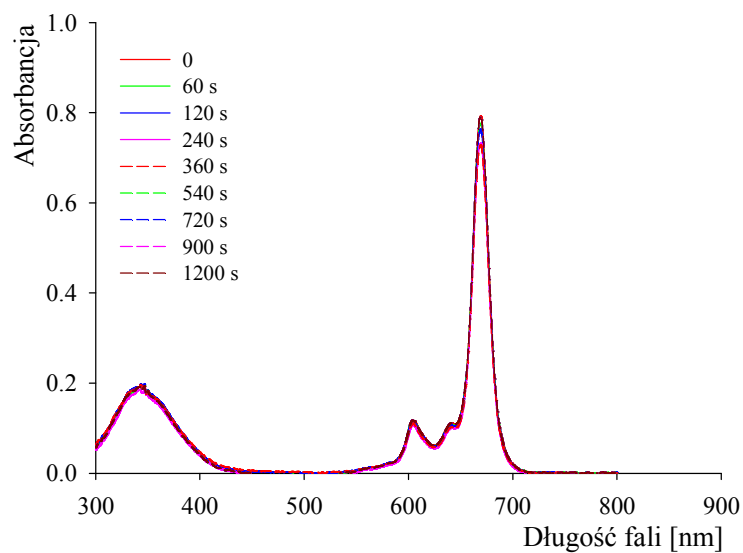
Ryc. 59. Elektronowe widma absorpcji subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO odpowiednim czasie naświetlania



Ryc. 60. Elektronowe widma absorpcji subftalocyjaniny **SubPc** w DMF odpowiednim czasie naświetlania



Ryc. 61. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **ZnPc** w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania



Ryc. 62. Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **ZnPc** w DMF po odpowiednim czasie naświetlania

4.3. Wyznaczenie parametrów kinetycznych rozkładu fotochemicznego

Ilościowa ocena rozkładu fotochemicznego porfirynoidów obejmowała analizę zależności absorbancji w maksimum pasma Q, od czasu ekspozycji na promieniowanie, zgodnie z liniowym równaniem reakcji kinetycznej pierwszego rzędu:

$$\ln A = \ln A_0 - k \cdot t$$

gdzie: A – absorbancja po określonym czasie naświetlania

A_0 – absorbancja przed naświetlaniem

k – stała szybkości fotodegradacji [s^{-1}]

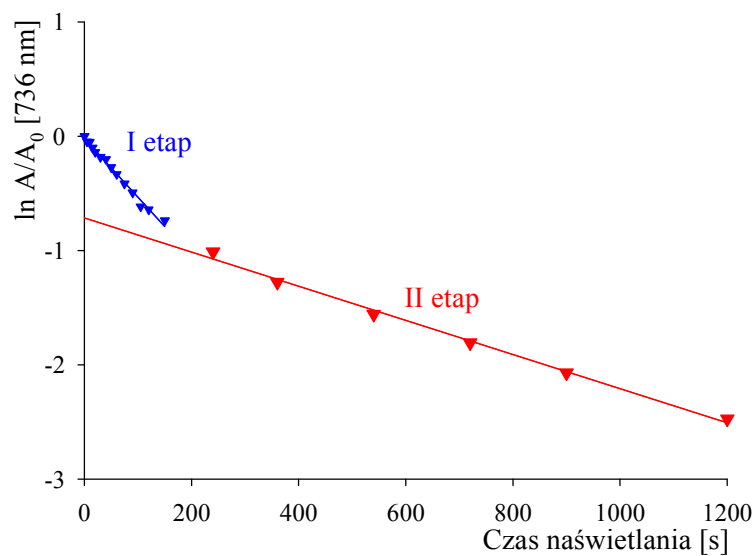
t – czas naświetlania [s].

Przebieg prostych na wykresie zależności $\ln A/A_0 = f(t)$ ustalono metodą najmniejszych kwadratów. Stałe szybkości rozkładu obliczono wg wzoru:

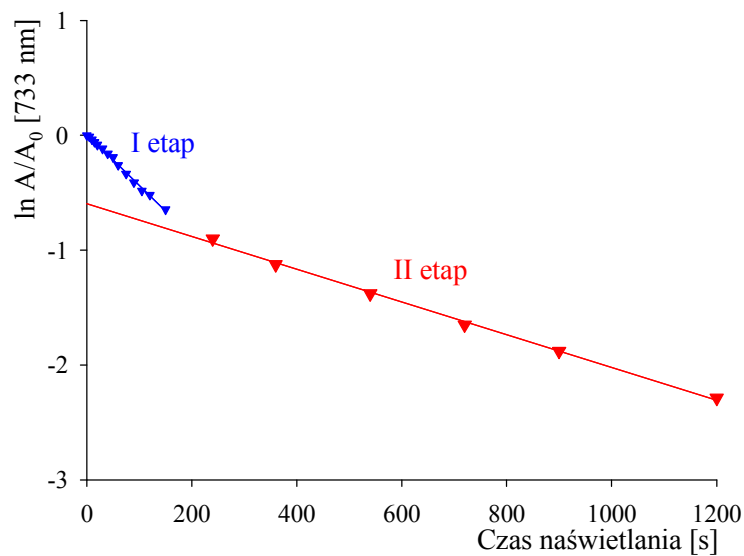
$$k = \operatorname{tg} \alpha = -a$$

gdzie: a – współczynnik kierunkowy prostej, opisującej zależność $\ln A/A_0 = f(t)$.

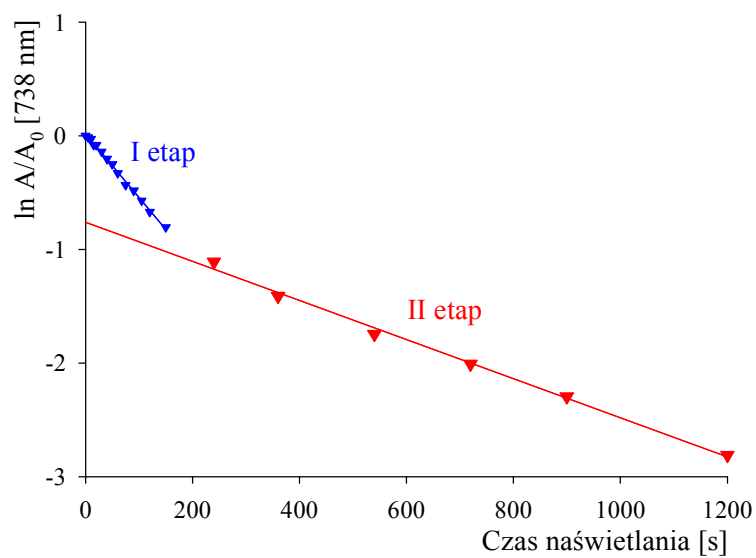
Parametry kinetyczne drugiego etapu fotodegradacji wyznaczono techniką odejmowania. Krzywe kinetyczne rozkładu fotochemicznego badanych fotouczulaczy przedstawiono na ryc. 63-67, a kinetyczne stałe szybkości zamieszczono w tabeli 15.



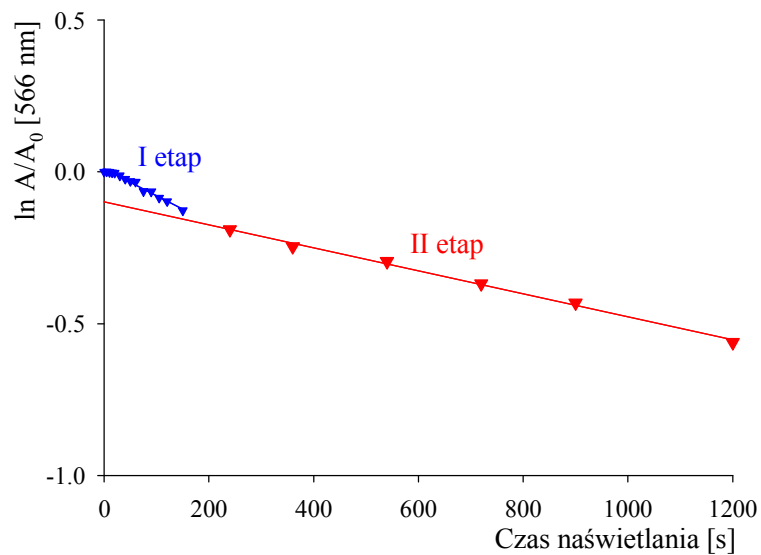
Ryc. 63. Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny **TG-I-161** w DMF; pomiary przy $\lambda=736$ nm



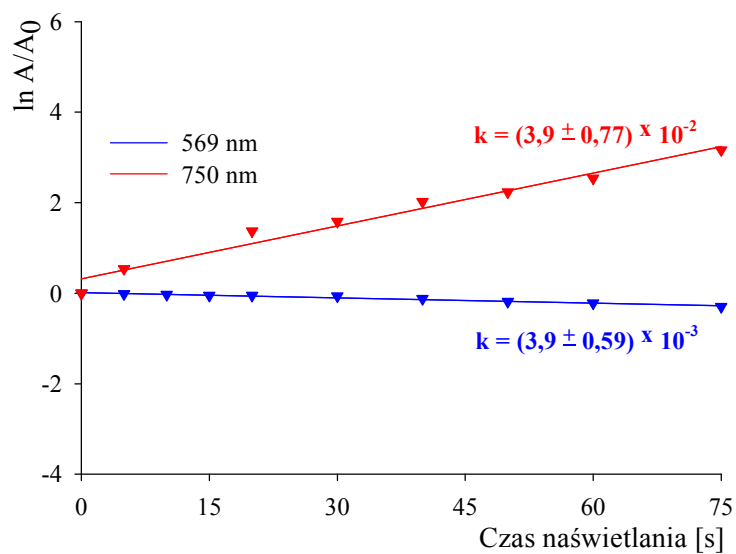
Ryc. 64. Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny **TG-I-162** w DMF; pomiary przy $\lambda=733$ nm



Ryc. 65. Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny **TG-TO-1** w DMF; pomiary przy $\lambda=738$ nm



Ryc. 66. Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ subftalocyjaniny **SubPc** w DMF; pomiary przy $\lambda= 566$ nm



Ryc. 67. Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO; pomiary przy $\lambda = 569$ oraz 750 nm

Tabela 15. Kinetyczne stałe szybkości fotodegradacji ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1** oraz subftalocyjaniny **SubPc** w DMF

Związek	I etap $10^2 (k \pm \Delta k) [s^{-1}]$	II etap $10^3 \times (k \pm \Delta k) [s^{-1}]$
TG-I-161	$1,22 \pm 0,10$	$1,49 \pm 0,01$
TG-I-162	$1,14 \pm 0,09$	$1,43 \pm 0,09$
TG-TO-1	$1,20 \pm 0,09$	$1,72 \pm 0,16$
SubPc	$0,84 \pm 0,16$	$0,38 \pm 0,03$

5. Pomiar absorpcji przejściowej

Pomiar absorpcji przejściowej został wykonany z wykorzystaniem zestawu funkcjonującego w oparciu o szafirowy wzmacniacz femtosekundowy, pracujący przy częstotliwości repetycji 1 kHz. Próbkę wzbudzano w paśmie Q oraz paśmie Soreta. Zastosowano impulsy generowane, odpowiednio przez niewspółliniowy optyczny generator parametryczny (NOPA) lub przez podwajanie częstotliwości impulsów fundamentalnych. W obu przypadkach energia impulsów pompujących była równa 2-3 μJ .

Absorpcja przejściowa była próbkowana impulsami superkontinuum światła białego, generowanymi w płytce CaF_2 o grubości 3 mm. Użyteczny zakres superkontinuum wynosił 380-780 nm. Między kierunkami polaryzacji wiązek promieniowania pompującego i próbkującego ustawiono kąt magiczny (54,7 deg), który zapewnia niezależność wyników od dynamiki reorientacji cząsteczek. Wyniki skorygowano uwzględniając fakt, że zerowe opóźnienie jest inne dla różnych długości fali ze względu na duży *chirp* (świergot) impulsów superkontinuum.

Badania prowadzono w fazie ciekłej, stosując jako rozpuszczalnik DMSO. Próbkę przygotowano w temperaturze pokojowej. Stężenie związków dobierano w taki sposób, aby wartości absorbancji przy obu długościach fal wzbudzenia były zawarte w zakresie 0,15-0,20. Wyjątek stanowiła ftalocyjanina cynkowa (**ZnPc**), dla której absorbancja przy 400 nm wynosiła 0,03. Przygotowane roztwory umieszczano w kwarcowej kuwecie o długości drogi optycznej $l = 1$ mm. Następnie w trakcie pomiaru oraz 20 min przed rozpoczęciem badania, przez próbki przepuszczano azot. Widma absorpcji przejściowej, rejestrowane po różnych opóźnieniach czasowych, przedstawiono na rycinach:

ryc. 68	ZnPc
ryc. 71	TG-I-161
ryc. 73	TG-I-162
ryc. 75	TG-TO-1
ryc. 78	TG-I-123
ryc. 81	SubPc

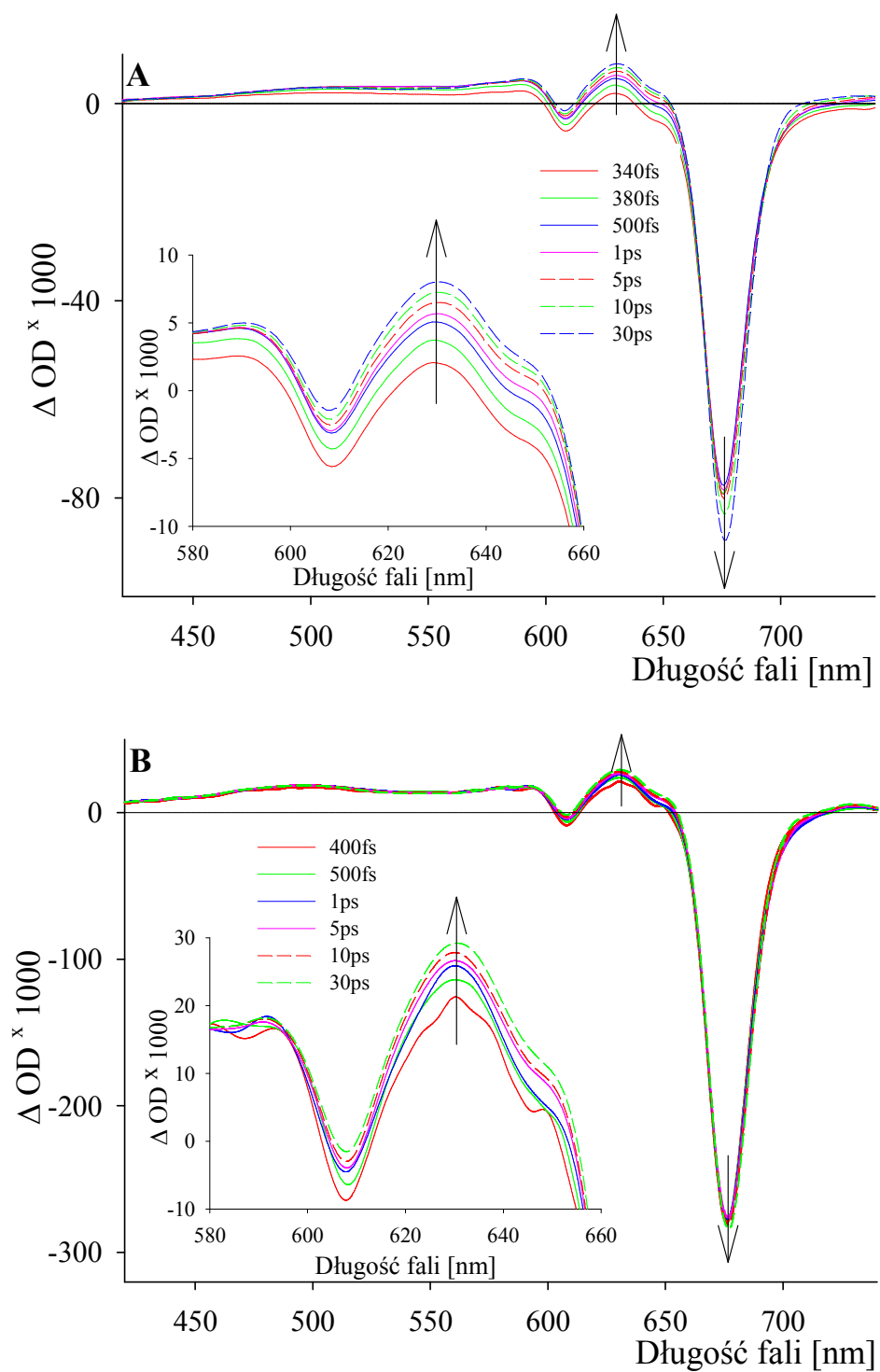
Opóźnienia w zakresie 1–10 ps określano jako krótkie, natomiast długie przypisano zakresowi 10 ps–1,8 ns.

Analizowano również zmiany absorpcji przejściowej przy określonych długościach fal, w zależności od opóźnienia czasowego. Uzyskane wyniki przedstawiono odpowiednio na rycinach:

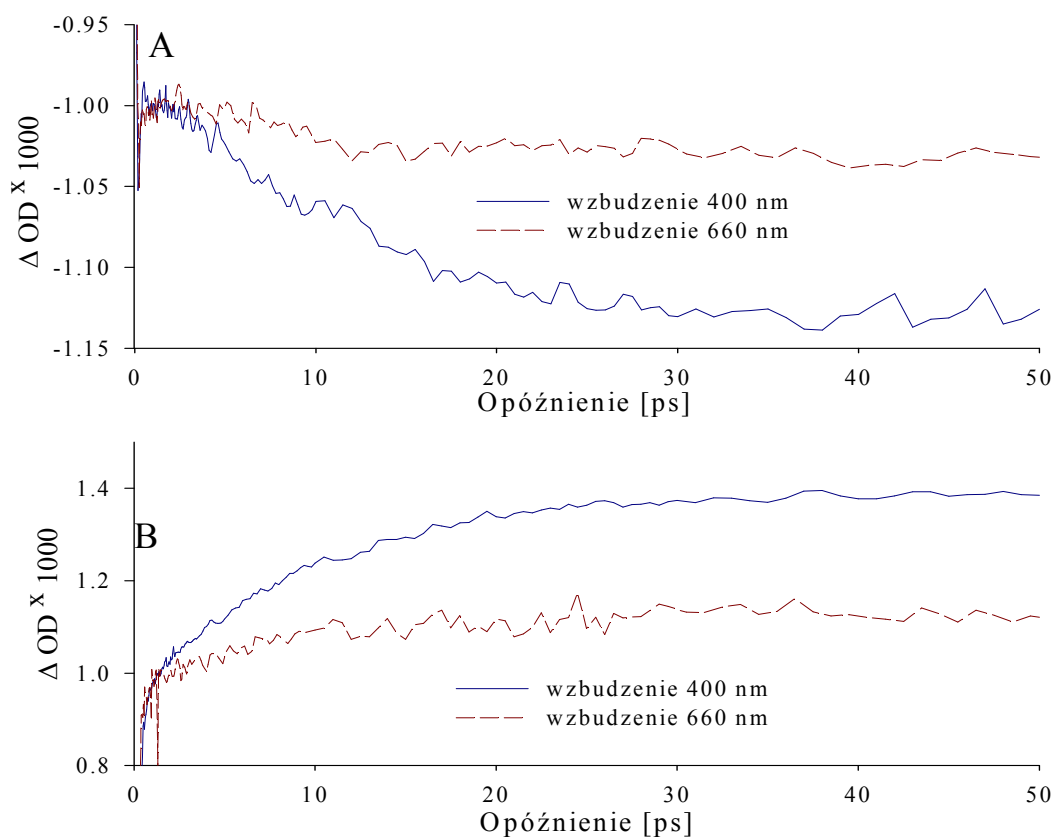
ryc. 69	ZnPc
ryc. 72	TG-I-161
ryc. 74	TG-I-162
ryc. 76	TG-TO-1
ryc. 80	TG-I-123
ryc. 82	SubPc

Widma różnicowe związane z zanikiem – DADS (ang. *decay associated difference spectra*) oraz czasy zaniku, uzyskano na drodze analizy globalnej z widm absorpcji przejściowej (ryc. 70,77,79). Wartości czasów zaniku (τ_1 , τ_2 , τ_3) wyznaczone przy różnych długościach fali wzbudzenia przedstawiono w tabeli 16.

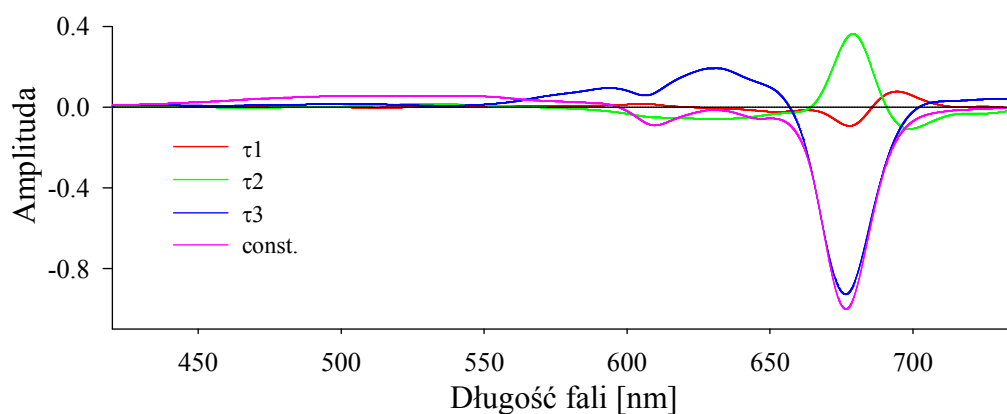
Obliczono również wartości radiacyjnych stałych szybkości zaniku stanu wzbudzonego. W tym celu zastosowano równanie Stricklera-Berga [145]. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 17.



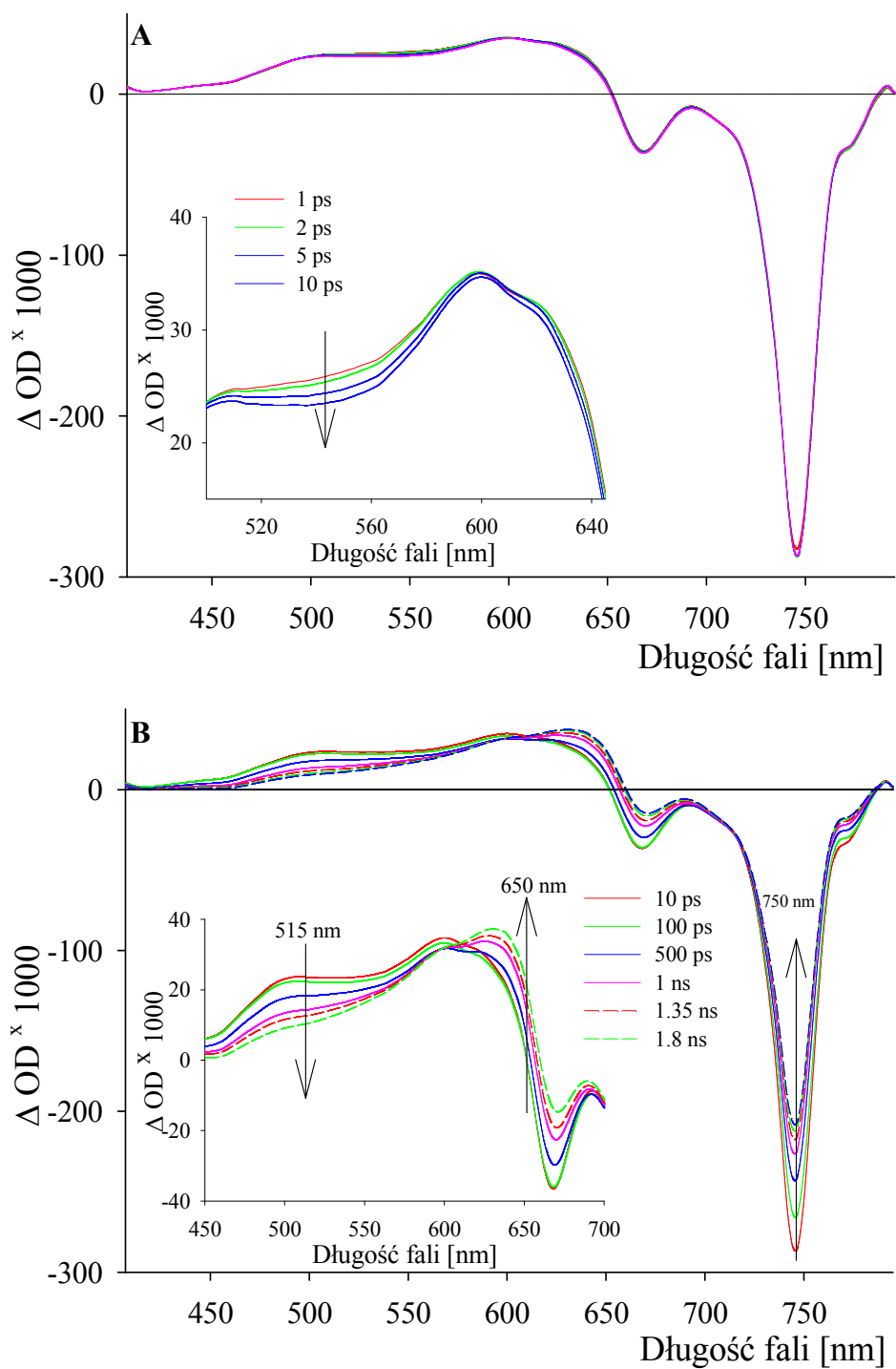
Ryc. 68. Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **ZnPc** w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Soreta (A) oraz paśmie Q (B)



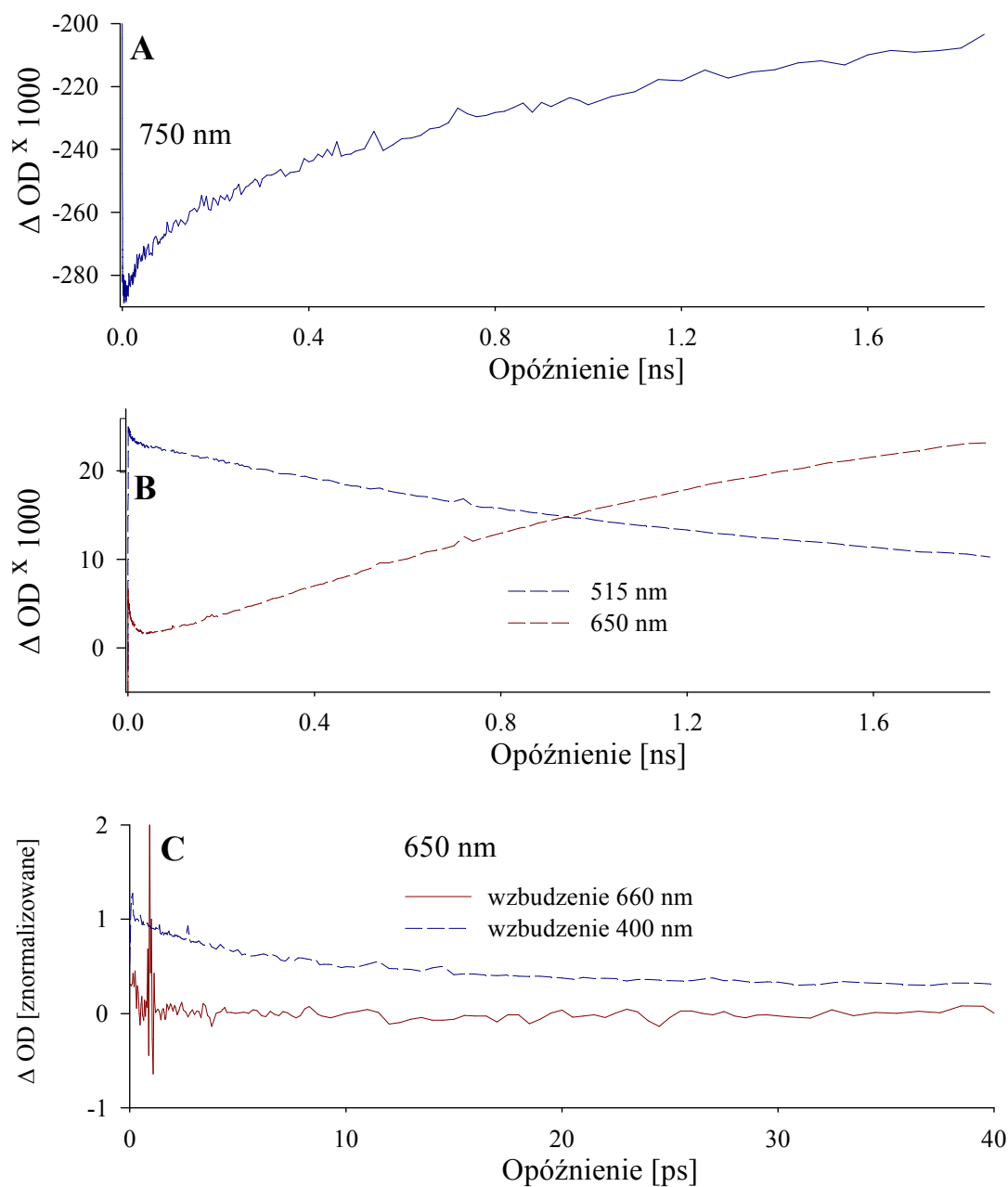
Ryc. 69. Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **ZnPc** w DMSO rejestrowana przy 675 nm (A) i 630 nm (B)



Ryc. 70. Widma DADS oraz czasy zaniku wyznaczone dla ftalocyjaniny **ZnPc** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm



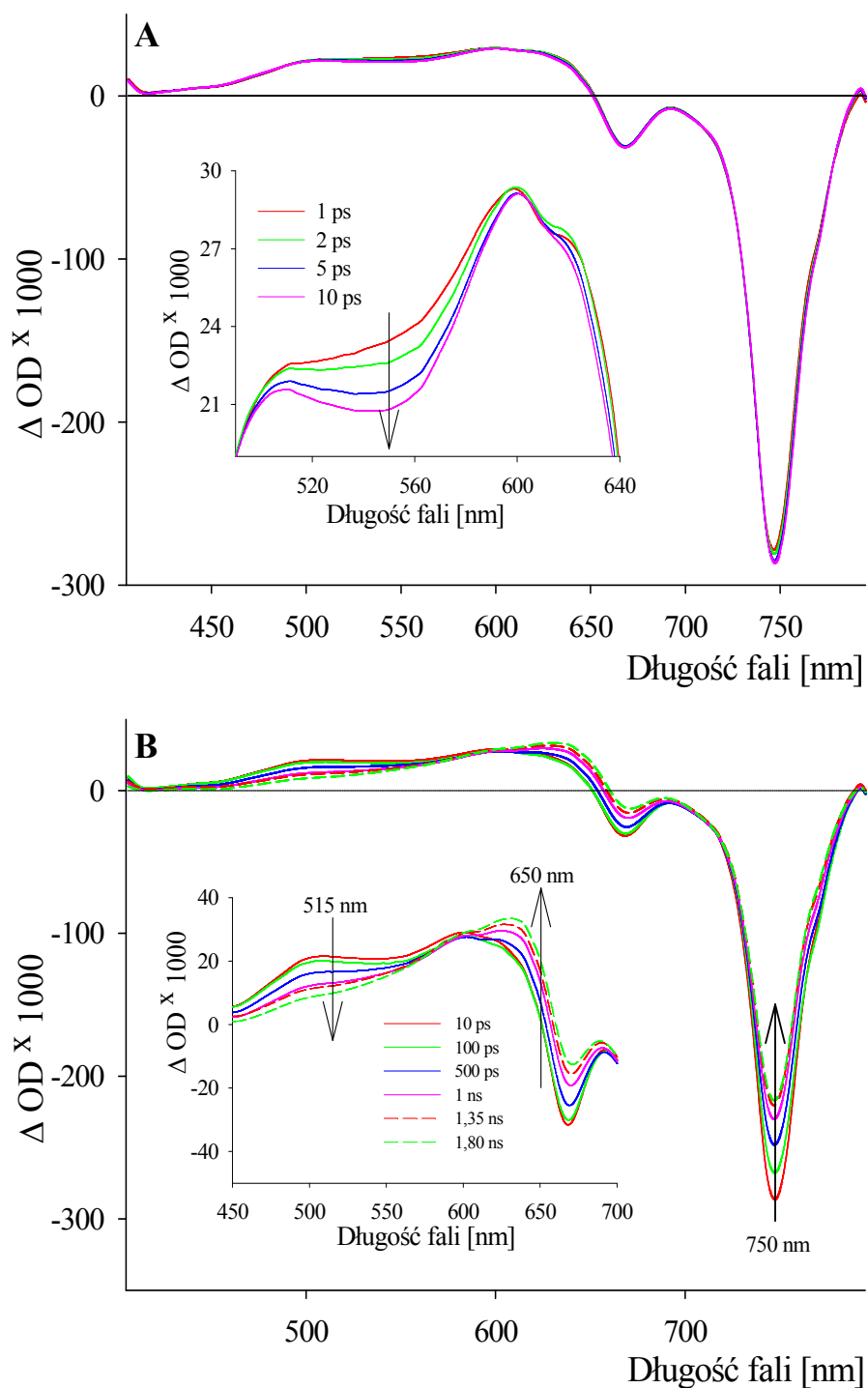
Ryc. 71. Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm
A – krótkie opóźnienia
B – długie opóźnienia



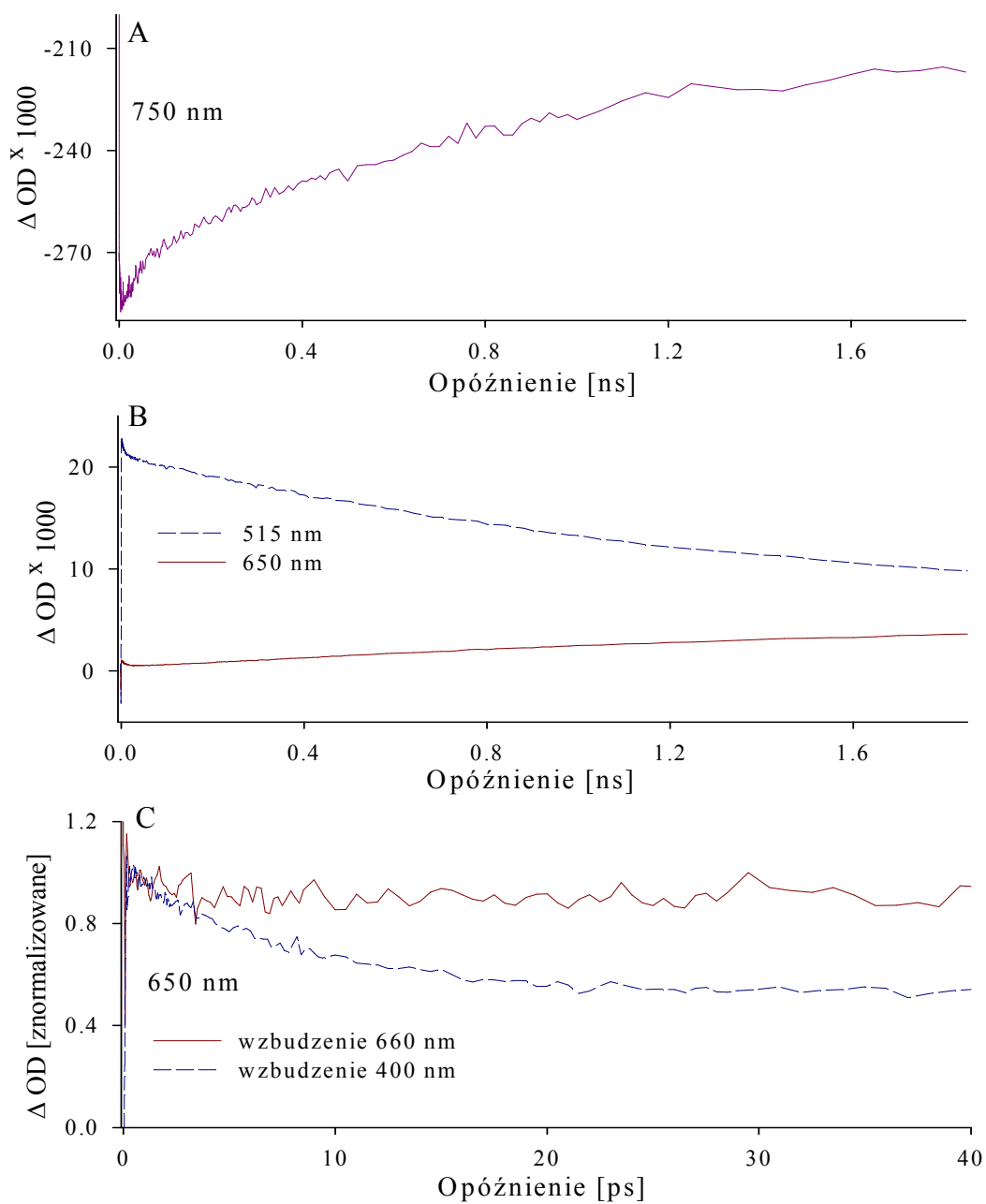
Ryc. 72. Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **TG-I-161** w DMSO

A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm

C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q



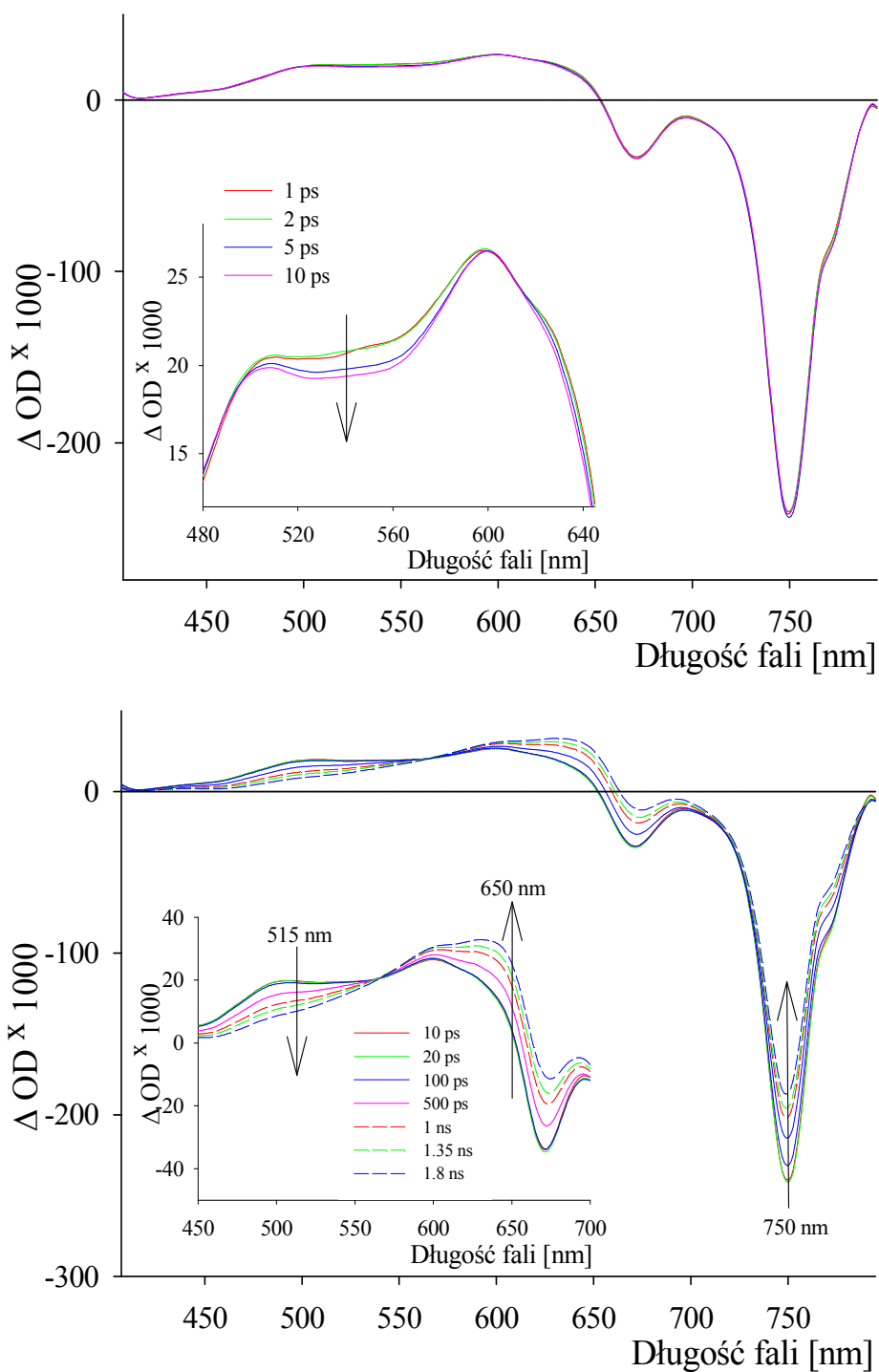
Ryc. 73. Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **TG-I-162** w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm
 A – krótkie opóźnienia
 B – długie opóźnienia



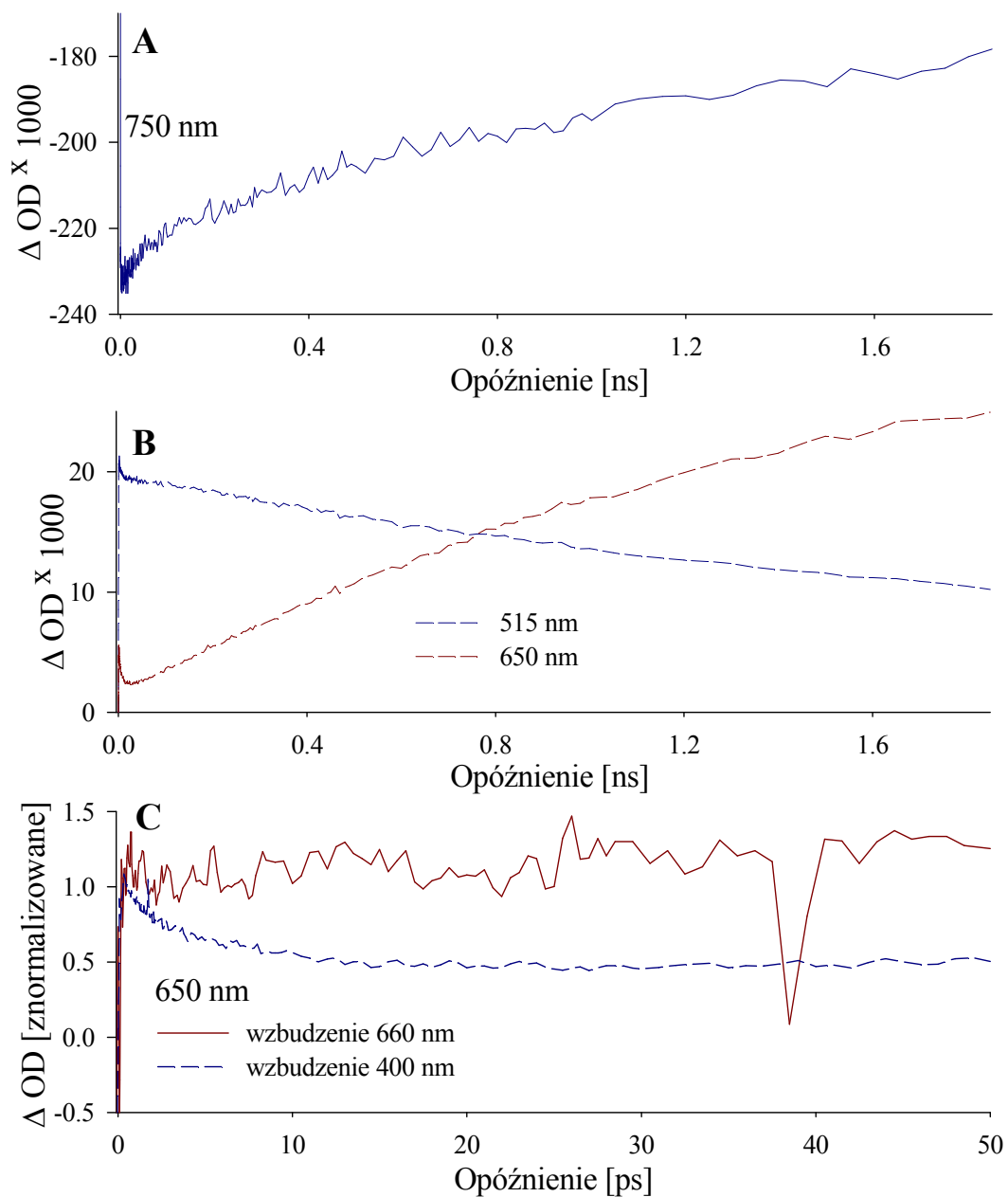
Ryc. 74. Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **TG-I-162** w DMSO

A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm

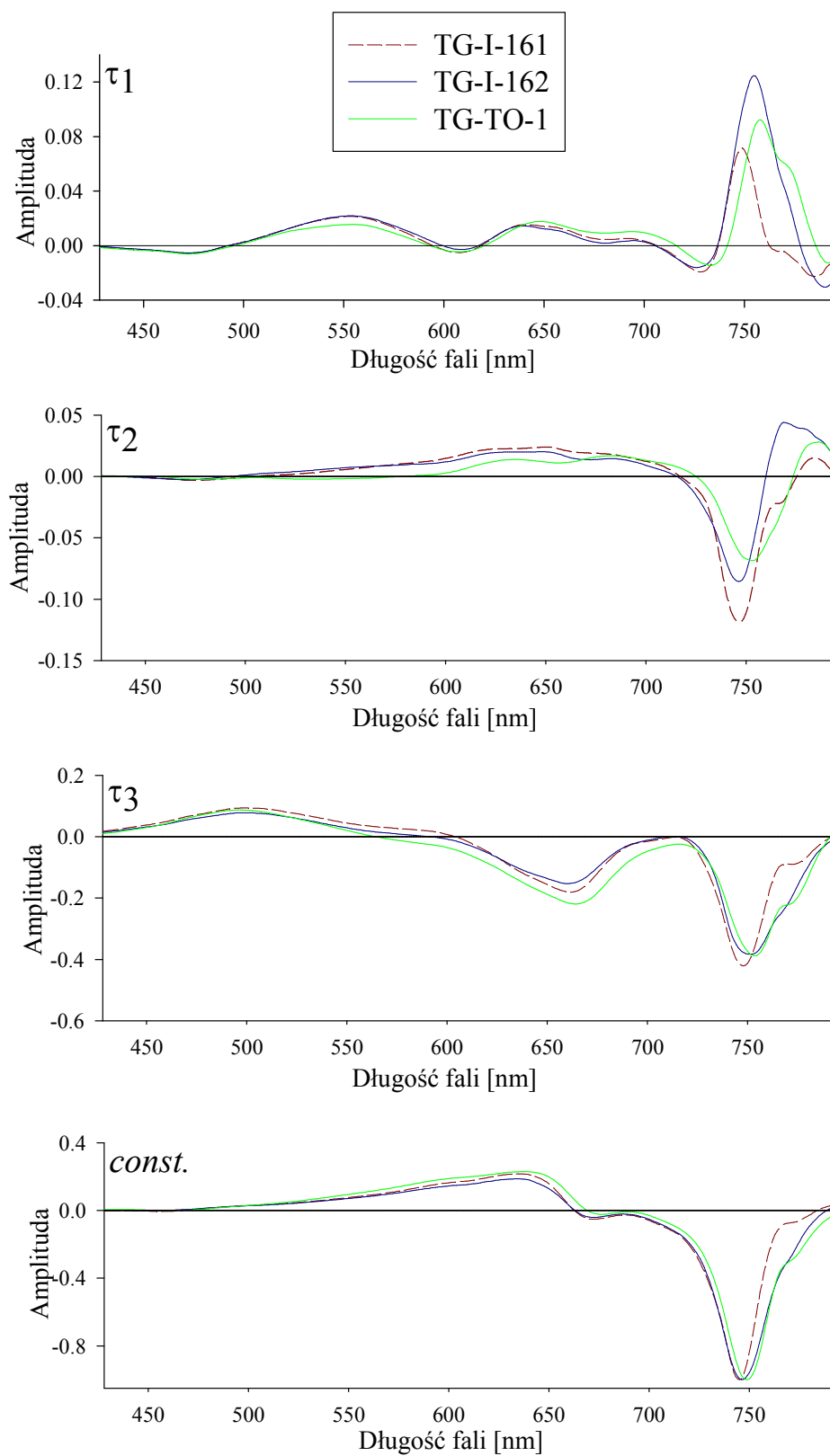
C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q



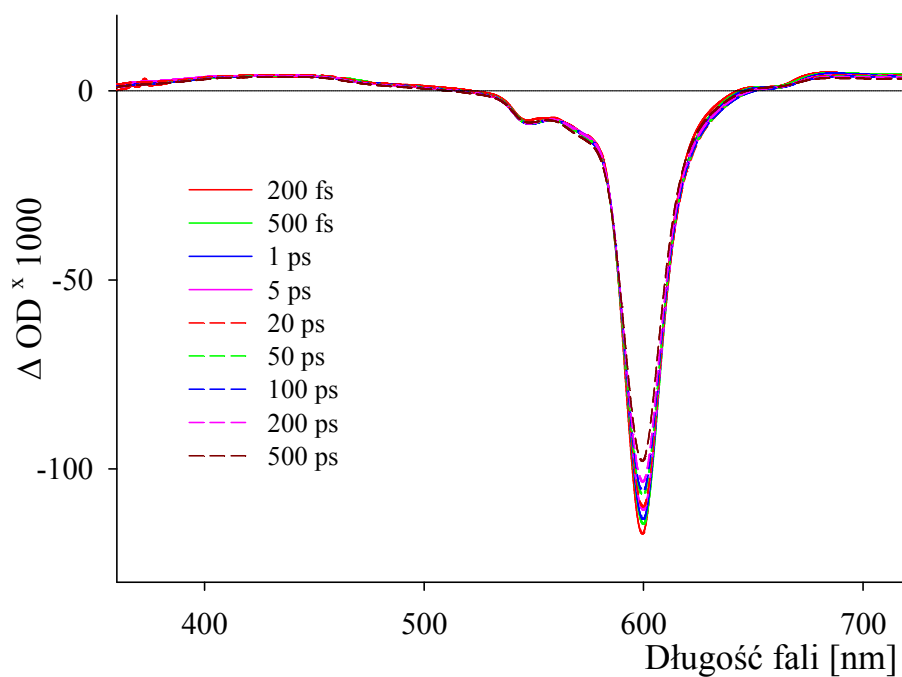
Ryc. 75. Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm
A – krótkie opóźnienia
B – długie opóźnienia



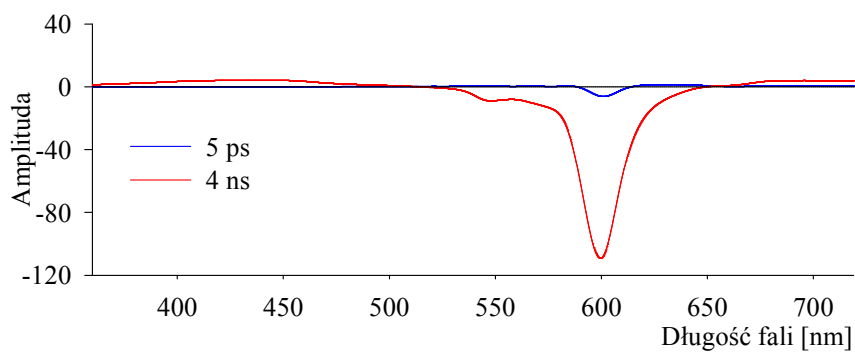
Ryc. 76. Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **TG-TO-1** w DMSO
A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm
C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q



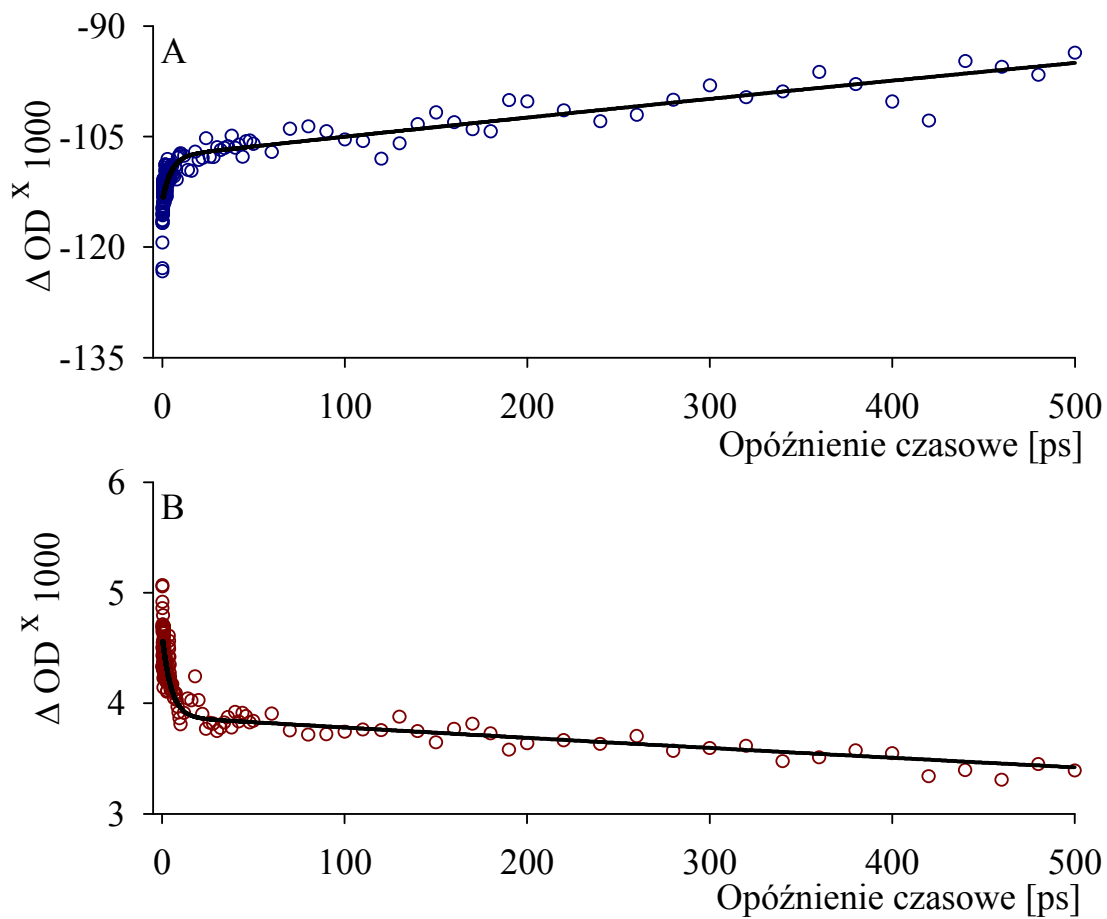
Ryc. 77. Widma DADS oraz czasy zaniku uzyskane dla ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1** przy wzbudzeniu $\lambda=400$ nm



Ryc. 78. Widma absorpcji przejściowej porfirazyny **TG-I-123** w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Q



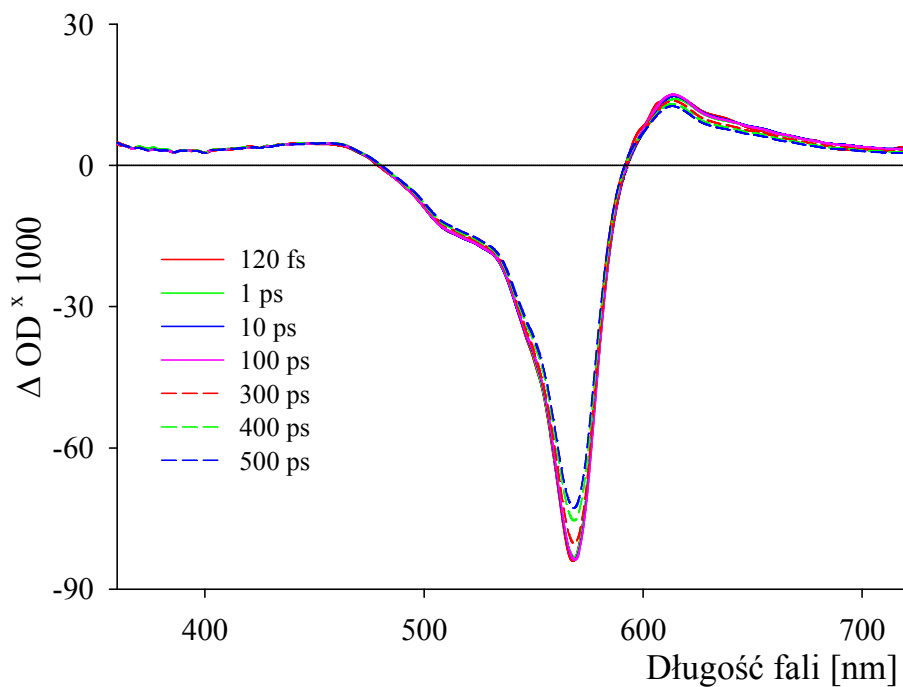
Ryc. 79. Widma DADS oraz czasy zaniku wyznaczone dla porfirazyny **TG-I-123** przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 590 nm



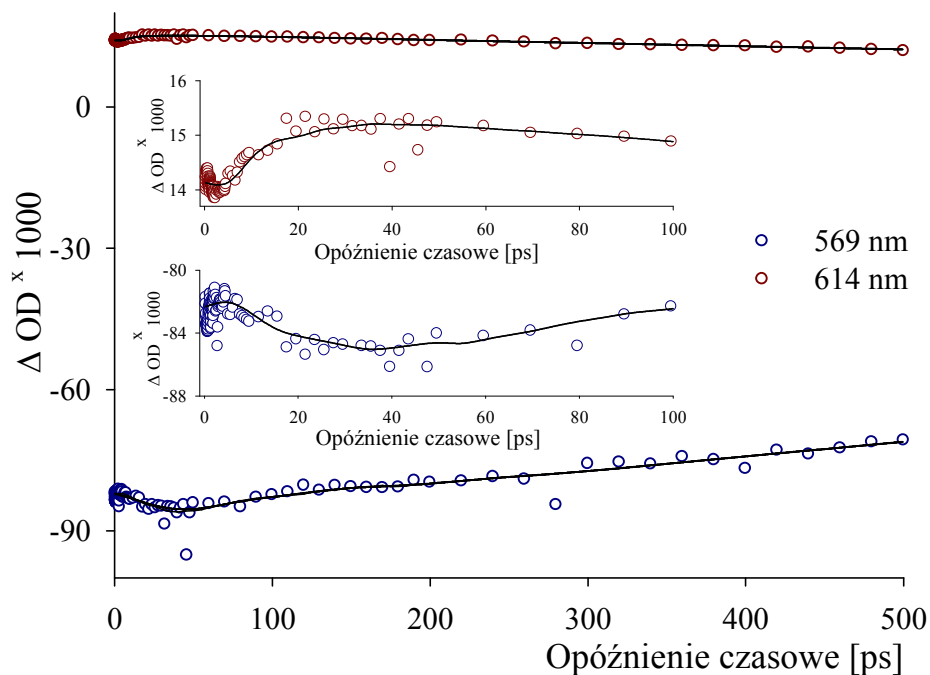
Ryc. 80. Kinetyka zmian absorpcji przejściowej porfirazyny **TG-I-123** odpowiadająca maksimum:

A - wybielania przy $\lambda=600$ nm

B - absorpcji ze stanu wzbudzonego przy $\lambda=687$ nm



Ryc. 81. Widma absorpcji przejściowej subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Q



Ryc. 82. Zmiany absorpcji przy $\lambda=569$ nm (proces wybielania) oraz absorpcji ze stanu wzbudzonego (614 nm) dla subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO

Związek	Długość fali wzbudzenia [nm]	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]	τ_3 [ns]
TG-I-161	400	2,5	51	1,2
	660	2,3	28	1,2
TG-I-162	400	2,0	57	1,2
	660	2,8	41	1,2
TG-TO-1	400	2,7	56	1,3
	660	3,8	26	1,3
ZnPc	400	2,2	10	3,3
	660	1,7	11	3,3

Tabela 16. Czasy zaniku (τ_1 , τ_2 , τ_3) wyznaczone dla ftalocyjanin metodą globalnej analizy danych z absorpcji przejściowej przy różnych długościach fali wzbudzenia

Związek	k_r [ns ⁻¹]
TG-I-161	6,8 ± 0,9
TG-I-162	6,3 ± 0,8
TG-TO-1	6,1 ± 0,8
TG-I-123	16,0 ± 2,4
SubPc	19,0 ± 2,9
ZnPc	5,5 ± 0,6

Tabela 17. Radiacyjne stałe zaniku stanu wzbudzonego obliczone wg równania Stricklera-Berga

6. Ocena fototoksyczności ftalocyjaniny TG-I-161

6.1. Przygotowanie kultur komórkowych

Do badań wykorzystano komórki nowotworu koleczystkomórkowego (*Human Squamous Carcinoma*; HSC-3) wyizolowane z języka [101]. Hodowle prowadzono w podłożu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) z dodatkiem 10% (v/v) termicznie inaktywowanej płodowej surowicy cielej (FBS) oraz 100 j.m./cm³ penicyliny, 100 µg/cm³ streptomycyny i 4 mmol/dm³ roztworu L-glutaminy. Komórki inkubowano z nawilżaniem, w temperaturze 37 °C, w atmosferze 5% CO₂. Hodowle poddawano pasażowaniu 2 razy w ciągu tygodnia, używając roztworu kompleksu trypsyna-EDTA.

6.2. Ocena toksyczności ciemnej

Hodowle przeznaczone do badania toksyczności ciemnej przygotowano 24 h przed eksperymentem, wykorzystując płytki 48-doleczkowe. Początkowo gęstość komórek wynosiła każdorazowo $1,8 \times 10^5$ komórek / 1 cm³ podłoża, przy konfluencji ok. 80%. Następnie komórki przepłukano dwukrotnie buforem PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej). Do każdej studzienki dodano 1 cm³ podłoża zawierającego fotouczulacz o określonym stężeniu (tabela 18). W celu uniknięcia łączenia fotouczulaczy z białkami surowicy, zastosowano podłoże nie zawierające FBS. Komórki poddano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C, następnie przepłukano dwukrotnie buforem PBS. Ocenę przeżywalności przeprowadzono za pomocą testu z odczynnikiem AlamarBlueTM (rezazuryna). Hodowlę kontrolną stanowiły komórki inkubowane z DMEM lub DMEM zawierającym 0,5 % (v/v) DMSO. Przeżywalność komórek w obecności ftalocyjanin **ZnPc** oraz **TG-I-161** bez dostępu światła przedstawiono w tabeli 18.

Związek	Stężenie związku [μM]	Przeżywalność komórek [%]
ZnPc	0,0	100,0 \pm 3,6
	0,1	103,3 \pm 2,8
	5,0	96,9 \pm 2,8
TG-I-161	0,0	100,0 \pm 3,8
	0,1	110,8 \pm 1,5
	5,0	101,1 \pm 4,9

Tabela 18. Przeżywalność komórek HSC-3 w obecności ftalocyjanin **ZnPc** oraz **TG-I-161** bez dostępu światła

6.3. Ocena toksyczności w warunkach naświetlania

Hodowle przeznaczone do badania fototoksyczności przygotowano 24 h przed eksperymentem wykorzystując płytki 48-doleczkowe. Początkowo gęstość komórek wynosiła każdorazowo $1,8 \times 10^5$ komórek/1 cm^3 podłoża. Następnie komórki przepłukano dwukrotnie buforem PBS. Do każdej studzienki dodano 1 cm^3 podłoża zawierającego fotouczulacz w stężeniu 0,1 lub 5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Płytki z założonymi hodowlami inkubowano przez 24 h z nawilżaniem, w atmosferze o składzie: 5% CO_2 , 95% powietrza. Po inkubacji hodowle przepłukano dwukrotnie PBS, a następnie do każdej dodano 0,5 cm^3 podłoża DMEM. Tak przygotowane płytki ekspozycje na promieniowanie emitowane przez żarówkę wolframową o mocy 75 W (Dura Max, Philips Electronics North America Corporation). W celu eliminacji promieniowania o długości fali poniżej 650 nm zastosowano szklany filtr barwny *KC-11*. Udział promieniowania z zakresu IR wykluczono poprzez zastosowanie filtra wodnego o grubości 2 cm. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie, umieszczając źródło światła w odległości 5 cm oraz 10 cm. Natężenie światła padającego na komórki wynosiło odpowiednio 89 oraz 36 mW/cm^2 . Jako próby kontrolne stosowano kolonie komórek nie poddawane działaniu promieniowania. Po odpowiednich czasach naświetlania do komórek dodawano podłoże DMEM z dodatkiem 10% (v/v) FBS oraz 100 $\text{j.m.}/\text{cm}^3$ penicyliny, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ streptomycyny i 4 mmol/dm^3 roztworu L-glutaminy.

6.4. Ocena przeżywalności komórek

Morfologia komórek została oceniona z wykorzystaniem mikroskopu odwróconego z kontrastem fazowym z 25-krotnym powiększeniem. W celu oznaczenia liczby żywych komórek do każdej studzienki dodano 1,0 cm³ roztworu odczynnika AlamarBlue™ w DMEM [52,83]. Inkubację prowadzono w temp. 37 °C przez 1,5-3 h. Po odwirowaniu pobierano 200 µl supernatantu. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali odpowiednio 570 oraz 600 nm. Procentową przeżywalność komórek w obecności badanego fotouczulacza odniesiono do hodowli kontrolnych zgodnie z równaniem:

$$\% = \frac{A_{tc570} - A_{tc600}}{A_{cc570} - A_{cc600}} \times 100$$

gdzie:

- A_{tc570} - wartość absorbancji przy $\lambda=570$ nm zmierzona dla komórek po naświetlaniu,
- A_{tc600} - wartość absorbancji przy $\lambda=600$ nm zmierzona dla komórek po naświetlaniu,
- A_{cc570} - wartość absorbancji przy $\lambda=570$ nm zmierzona dla próby kontrolnej,
- A_{cc600} - wartość absorbancji przy $\lambda=600$ nm zmierzona dla próby kontrolnej.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 19.

6.5. Analiza statystyczna

Wyniki obejmujące toksyczność ciemną oraz przeżywalność komórek w trakcie naświetlania przedstawiono jako wartość średnią, obliczoną z sześciu pomiarów (\pm odchylenie standardowe). Różnice wartości średnich porównano testem t-Studenta z zastosowaniem oprogramowania StatView (*BrainPower Inc., Calabas, CA*). Znamienność statystyczną przyjęto dla wartości $p < 0,05$. Uzyskane wyniki porównano z właściwościami niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej – **ZnPc**.

Związek	Natężenie promieniowania [mW/cm ²]	Stężenie związku [μM]	Przeżywalność komórek [%]
TG-I-161	89	0,0	100,0 ± 6,5
		0,1	92,2 ± 1,8
		5,0	87,8 ± 1,8
	36	0,0	100,0 ± 8,0
		0,1	90,8 ± 7,7
		5,0	86,5 ± 6,1
ZnPc	89	0,0	100,0 ± 10,0
		0,1	70,5 ± 6,2
		5,0	0,0
	36	0,0	100,0 ± 2,3
		0,1	103,5 ± 11,9
		5,0	0,0

Tabela 19. Przeżywalność komórek HSC-3 poddanych naświetlaniu w obecności ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **ZnPc** (czas ekspozycji – 20 min)

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Jednym z warunków powodzenia fotodynamicznych metod leczenia - jest dobór właściwego fotosensybilizatora, posiadającego m. in. odpowiednie właściwości spektroskopowe, wysoką wydajność generowania tlenu singletowego oraz brak efektów fototoksycznych. Z tego względu badania dotyczące syntezy nowych barwników fotouczulających, są niezwykle istotnym aspektem warunkującym rozwój PDT [5,10]. Uzyskanie barwników spełniających możliwie najwięcej kryteriów, umożliwia odpowiednią modyfikację pierścienia makrocyclicznego. Cząsteczki porfirynoidów – stosowanych jako fotosensybilizatory - można modyfikować na dwa sposoby: poprzez podstawienie jonów metalu w centrum koordynacyjnym oraz wprowadzenie odpowiednich podstawników peryferyjnych [11,17,19,46,72,139].

Materiał do badań stanowiły wybrane fotouczulacze z grupy syntetycznych porfirynoidów. Ftalocyjaniny **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz porfirazyna **TG-I-123** to związki autorskie, których ogólny schemat syntezy barwników opierał się na reakcji makrocyclizacji Linstead'a. W odniesieniu do ftalocyjanin, jako główne substraty zastosowano odpowiednio podstawione dinitryle oraz octan cynku. Natomiast porfirazynę TG-I-123 otrzymano zgodnie z procedurą podaną przez Nie i wsp., zakładającą wykorzystanie 2,5-diiminopirolidyny oraz dipropylmaleonitryla w obecności butanolanu magnezu, która jest modyfikacją makrocyclizacji Linstead'a [108]. Tożsamość otrzymanych fotouczulaczy, potwierdzono z zastosowaniem takich metod analitycznych jak: spektroskopia UV-Vis, ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz spektrometria mas (MALDI-TOF).

Ocena jednorodności

Istotnym warunkiem umożliwiającym wykorzystanie fotouczulacza w PDT, jest odpowiednio wysoka zawartość w próbce lub gotowym preparacie. W odniesieniu do barwników stosowanych w lecznictwie takich jak temoporfina (Foscan) lub

werteporfina (Visudyne) procentowa zawartość wynosi 98 %. Obecnie zastosowanie znajdują zarówno preparaty pojedyncze, jak i złożone. Wykorzystanie pojedynczego, dobrze zdefiniowanego fotouczulacza umożliwi lepsze określenie zależności pomiędzy rodzajem substancji, a wywołanym efektem leczniczym [5]. Z drugiej jednak strony znany od lat preparat Photofrin, nadal znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu oraz stanowi przedmiot licznych prac badawczych pomimo, że pod względem chemicznym jest mieszaniną mono-, di- oraz oligomerów hematoporfiryny [5,8,97].

Obecnie na światowym rynku oferowanych jest bardzo wiele gotowych barwników fotouczulających. Szczególnie szeroką ofertę związków posiada firma Sigma-Aldrich, a deklarowana przez producenta zawartość np. dla pochodnych z grupy ftalocyjanin, mieści się najczęściej w zakresie ok. 93–98%.

W przypadku fotouczulaczy handlowych wykorzystanych w niniejszej pracy, zawartość w próbce wynosiła 97% oraz 85%, odpowiednio dla ftalocyjaniny **TG-TO-1** i subftalocyjaniny **SubPc**. Natomiast jednorodność próbek autorskich, tj. ftalocyjaniny **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz porfirazyny **TG-I-123**, oceniono metodą HPLC. Zawartość odczytywano jako procentowy udział powierzchni głównego piksu na chromatogramie (ryc. 7-9). Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 2, analizowane próbki zawierały badane związki w przedziale ok. 95–98%.

Analiza spektralna

Jednym z ważniejszych etapów analizy nowych fotouczulaczy jest charakterystyka spektralna. Jak wiadomo właściwości fotochemiczne barwników wynikają z różnych stanów wzbudzenia cząsteczek. Z kolei rodzaj wzbudzenia, zależy głównie od długości fali absorbowanego promieniowania. Niezbędnych informacji w tym zakresie, dostarcza przede wszystkim ocena przebiegu elektronowych widm absorpcji. Absorpcja promieniowania o długości fali odpowiadającej pasmu Q, prowadzi do wzbudzenia typu $\pi\text{-}\pi^*$, podczas gdy wzbudzenie stanów *charge transfer*, zależy od właściwości redoks jonu metalu w centrum pierścienia, a także rodzaju podstawników w części peryferyjnej [49,102,160]. Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, ocena położenia oraz intensywności poszczególnych pasm absorpcji, pozwala m. in. na określenie stopnia agregacji porfirynoidów. Pojedyncze, intensywne pasma są z reguły przypisywane formom monomerycznym, natomiast szerokie, o

niskiej intensywności wykształcają się w przypadku istnienia form zagregowanych [3,113,160].

Wielu autorów zjawisko agregacji tłumaczy koplanarną asocjacją pierścieni, jednocześnie podkreślając zależność od struktury podstawników, stężenia, temperatury, rodzaju rozpuszczalnika i jonu metalu w centrum pierścienia. W stanie zagregowanym struktura elektronowa pierścieni ulega zmianie, co pociąga za sobą różnice w energii poziomów podstawowych i wzbudzonych [2,100,112,114].

Z punktu widzenia zastosowań dla potrzeb PDT oraz wizualizacji tkanek ważne jest, aby fotouczulacz absorbował światło o odpowiednim zakresie długości fal; szczególnie istotne jest uzyskanie absorpcji powyżej 650 nm, co generuje właściwe położenie pasma Q w widmie UV-Vis [58,124]. Stosując odpowiednie podstawniki w położeniach peryferyjnych, można przesunąć absorpcję w kierunku fal dłuższych – nawet do wartości ok. 800 nm. Ten rodzaj modyfikacji jest bardzo ważny ponieważ dla promieniowania o tych długościach fali tkanki są transparentne, a zakłócenia od hemoglobiny i wody są minimalne. Dlatego też następny etap pracy obejmował analizę spektroskopową fotosensybilizatorów. W pierwszej kolejności zidentyfikowano dwa, charakterystyczne pasma absorpcji tj, Soreta oraz pasmo Q, których obecność w widmie elektronowym jest wymagana w odniesieniu do wszystkich barwników fotouczulających [3,81,90,99,134].

W przypadku widm ftalocyjanin **TG-I-161** oraz **TG-I-162** (ryc. 10 i 12), obecność pasma Soreta obserwowano w zakresie 300-400 nm, a pasma Q posiadającego znacznie większą intensywność w przedziale ok. 600-900 nm (tabela 3 i 4). Natomiast widma tych ftalocyjanin w izopropanolu, trietyloaminie, dioksanie, N,N-dimetyloformamidzie (DMF), N,N-dimetyloacetamidzie (DMA) i dimetylosulfotlenku (DMSO) posiadały intensywne pasmo Q, ulegające nieznacznemu rozszczepieniu z wytworzeniem składowej wstępującej, przesuniętej w kierunku fal krótszych ($\lambda_{\max}=655-665$ nm). Jednocześnie molowy współczynnik absorpcji pasma wstępującego, posiadał blisko trzykrotnie mniejszą wartość niż w przypadku głównej składowej pasma Q. Taki kształt pasma Q wskazuje na niewielką liczbę cząsteczek występujących w formie zagregowanej. Obserwowane zależności są zgodne ze spostrzeżeniami Chidawanyika i wsp., którzy analizowali widma UV-Vis ftalocyjanin modyfikowanych peryferyjnie grupami fenoksyłowymi oraz butylofenoksyłowymi oraz z wbudowanym jodem kadmu(II) w centrum koordynacyjnym. W tym przypadku również odnotowano obecność dwóch składowych pasma Q, a mniejszą intensywnością odznaczała się

składowa przesunięta w kierunku fal krótszych. Wymienieni autorzy wykazali, że taki kształt widma elektronowego stanowi potwierdzenie obecności w roztworach form monomerycznych [36]. Natomiast Scalise i wsp. ocenili właściwości spektroskopowe ftalocyjanin cynkowych modyfikowanych peryferyjnie grupami pirydyloksylowymi. Również ten zespół autorów, prowadząc badania w roztworze DMF oraz metanolu, jako cechę typową dla fotouczulaczy występujących w formie monomerycznej, uznał kształt pasma Q, w którym składowa zlokalizowana po stronie długofalowej charakteryzuje się dużą intensywnością.

Zjawisko agregacji wpływa ujemnie na właściwości fizykochemiczne fotouczulaczy, obniża wydajność generowania tlenu singletowego, jak również znacznie osłabia fluorescencję związków. Tworzenie aglomeratów jest przede wszystkim rezultatem ograniczonej rozpuszczalności [3,149,152,160]. Obecnie opracowywane i stosowane są różne sposoby zmniejszania tendencji fotouczulaczy do agregacji. W tym celu wykorzystuje się różnego rodzaju nośniki, takie jak liposomy, nanocząstki lub stosuje się środki powierzchniowo czynne [21,41,106,122].

Innym często wykorzystywanym sposobem zwiększania rozpuszczalności ftalocyjanin, jest opracowanie odpowiednich metod syntezy, umożliwiających wprowadzenie do pierścienia makrocyclicznego podstawników peryferyjnych [49]. W tym zakresie szczególnie interesujące wydają się wyniki przedstawione przez Akkurt i wsp., którzy analizowali problem niewielkiej rozpuszczalności ftalocyjanin cynkowych, modyfikowanych grupami hydroksyetylosulfanilowymi. Udowodniono, że w wyniku reakcji estryfikacji można uzyskać pochodne, odznaczające się większą rozpuszczalnością niż związki wyjściowe. Zwrócono również uwagę na możliwość zwiększenia rozpuszczalności fotouczulaczy, poprzez wprowadzenie podstawników tert-butyłowych, heksyłowych, eterowych lub amidowych [3]. Z kolei Atilla i wsp. szczególnie podkreślili wpływ rozpuszczalnika na proces tworzenia aglomeratów. Badając ftalocyjaniny cynkowe modyfikowane peryferyjnie grupami trietyleno-oksylsulfanilowymi zauważyli, że analizowane związki nie agregowały w tetrahydrofuranie, chloroformie lub pirydynie. Natomiast w przypadku roztworów wodnych lub metanolowych, pasmo Q charakteryzowało się niską intensywnością oraz ulegało wyraźnemu poszerzeniu. Zaobserwowane zmiany przebiegu widma, przypisano zjawisku tworzenia aglomeratów [12].

Spośród zastosowanych rozpuszczalników tylko w przypadku metanolu, pasmo Q ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **TG-I-162** posiadało trzy składowe o zróżnicowanej

intensywności; główną ($\lambda_{\max}=735$ nm) oraz dwa mniejsze pasma, które wykształcały się zarówno po długo-, jak i krótkofalowej stronie pasma Q. Pasma przesunięte w kierunku fal dłuższych ($\lambda_{\max}=820$ nm), określa się jako tzw. pasmo X. Ogunsipe i wsp. analizowali właściwości ftalocyjanin cynkowych, modyfikowanych ośmioma grupami fenoksyłowymi i odnotowali obecność pasma X w przypadku roztworów w THF. Geneza pasma X, jak dotąd nie została dostatecznie wyjaśniona. Zakłada się, że jest wynikiem odkształcenia płaszczyzny pierścienia ftalocyjanin, na skutek oddziaływania tlenu obecnego w cząsteczce rozpuszczalnika z jonem cynku we wnętrzu makrocycła [114].

Interesujący przebieg posiadały widma ftalocyjanin **TG-I-161** i **TG-I-162** w chloroformie (ryc. 10 i 12). W tym przypadku obserwowano bardzo rozmyte, szerokie wstępujące ramię pasma Q, w którym można wyróżnić dwie składowe ($\lambda=761$ oraz 806 nm). Odnotowano również obecność dodatkowego pasma w zakresie 410-530 nm o niewielkiej intensywności. Jednocześnie w przypadku chloroformu oraz acetonitrylu, stwierdzono największe przesunięcie pasma Q w kierunku fal dłuższych. Natomiast w widmach wymienionych ftalocyjanin w eterze etylowym, octanie etylu, heksanie oraz cykloheksanie obserwowano wykształcanie szerokich pasm Q (w zakresie 600-870 nm), które rozszczepiały się na dwie składowe, posiadające zbliżoną intensywność.

Porównanie wyników w tabelach 3 oraz 4 wskazuje, że długość łańcucha węglowego podstawników peryferyjnych ftalocyjanin **TG-I-161** i **TG-I-162**, nie wywiera istotnego wpływu na przebieg widm elektronowych. Widma analizowanych związków, wykazywały tylko nieznaczne zmiany intensywności pasm, w zakresie odpowiadającym pasmu Soreta oraz Q.

W przypadku większości użytych rozpuszczalników, przebieg widm UV-Vis ftalocyjaniny **TG-TO-1**, nie wskazywał na tendencję do tworzenia agregatów – ryc. 14. Pasma Q ulegało nieznacznemu rozszczepieniu na dwie składowe, a intensywność składowej wstępującej, była około trzykrotnie mniejsza niż głównej. Natomiast w przypadku zastosowania heksanu, obserwowano wyraźne poszerzenie pasma Q, bez przesunięcia w kierunku długofalowym, a wykorzystanie chloroformu skutkowało wykształceniem dodatkowego pasma w zakresie 450–550 nm (tabela 5). Obserwowane zmiany w widmach UV-Vis można przypisać tendencji ftalocyjaniny **TG-TO-1** do tworzenia w chloroformie form zagregowanych (ryc. 14). Natomiast widma ftalocyjaniny w metanolu, acetonitrylu, eterze dietylowym oraz cykloheksanie wykazywały obecność dodatkowego pasma X.

Podsumowując można przyjąć, że obecność podstawników butoksylowych oraz łańcuchów estrowych w części peryferyjnej pierścienia ftalocyjanin cynkowych, odpowiada za przesunięcie maksimum pasma Q w kierunku fal dłuższych. W przypadku bowiem niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej (**ZnPc**), maksimum pasma Q jest zlokalizowane przy $\lambda_{\max} \sim 670$ nm – ryc. 30 oraz 31.

Jednym z ograniczeń rozwoju PDT jest możliwość leczenia głównie nowotworów zlokalizowanych powierzchniowo ponieważ głębokość przenikania promieniowania przez tkankę jest proporcjonalna do długości fali [4,5]. Ponadto maksimum absorpcji fotosensybilizatora nie powinno pokrywać się z pasmami absorpcji w obszarze widzialnym barwników endogennych, takich jak melanina, hemoglobina, oksyhemoglobina [33,96]. Z tego względu możliwość absorpcji promieniowania o określonej długości fali, to szczególnie istotne kryterium, uwzględniane przy poszukiwaniu nowych barwników fotouczulających [5, 120].

Można więc założyć, że wykazywana przez ftalocyjaniny **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**, zdolność absorpcji promieniowania długofalowego, wydaje się korzystna i wskazuje na możliwość potencjalnego wykorzystania w terapii fotodynamicznej.

W przebiegu elektronowych widm absorpcji porfirazyny **TG-I-123**, stwierdzono obecność pasma Soreta w zakresie 300–400 nm, podczas gdy maksimum pasma Q mieściło się w przedziale 500–620 nm (tabela 6). W odróżnieniu od widm opisanych wcześniej ftalocyjanin, pasmo Soreta porfirazyny **TG-I-123** odznaczało się intensywnością zbliżoną do pasma Q (ryc. 16). Kształt pasma Q nie wskazywał na tendencję do agregacji w żadnym z zastosowanych rozpuszczalników. Nie odnotowano również obecności dodatkowych pasm po stronie długofalowej pasma Q.

Z kolei subftalocyjanina **SubPc** wykazywała bardzo słabą rozpuszczalność w metanolu, heksanie, 2-propanolu oraz cykloheksanie, co uniemożliwiło wykreślenie widm elektronowych (tabela 7). W przypadku pozostałych rozpuszczalników, widma absorpcji charakteryzowały się obecnością dwóch wyraźnych pasm – ryc. 18. Długość fali odpowiadająca maksimum pasma Soreta wynosiła 306 nm. Jedynie w DMSO maksimum wspomnianego pasma, występowało przy długości fali 283 nm, a maksimum pasma Q mieściło się w zakresie 560-570 nm. Przesunięcie pasma Q subftalocyjanin w kierunku krótkofalowym, tłumaczy się zmianą rozmieszczenia elektronów zdelokalizowanych, uwarunkowaną mniejszymi rozmiarami pierścienia makrocyclicznego, w porównaniu z fotouczulaczami o strukturze tetrapirolowej [45,117]. Należy jednocześnie zauważyć, że pasmo Q subftalocyjaniny, nie uległo

rozszczerpieniu na dwie składowe, jak to odnotowano w odniesieniu do poprzednich związków. Natomiast przebieg widm UV-Vis w badanych rozpuszczalnikach, również nie wskazywał na tendencję do tworzenia agregatów.

Zakres badań obejmował także ocenę położenia maksimum pasma Q, w zależności od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika. Analiza polegała na wykreśleniu zależności graficznej uwzględniającej położenie λ_{\max} pasma Q oraz wartość parametru $(n^2-1)/(2n^2+1)$, gdzie n to współczynnik refrakcji [88,113,114]. Ocenę przeprowadzono w odniesieniu do rozpuszczalników, w których badane fotouczulacze nie wykazywały tendencji do tworzenia agregatów. Jak wynika z ryc. 11, 13 oraz 15 w przypadku ftalocyjaniny **TG-I-161** i **TG-I-162**, prostoliniową zależność odnotowano jedynie w odniesieniu do izopropanolu, trietyloaminy, dioksanu, DMF, DMA oraz DMSO. Okazało się, że ze wzrostem wartości współczynnika refrakcji rozpuszczalnika, maksimum pasma Q ulegało przesunięciu w kierunku długofalowym. Uzyskana zależność liniowa świadczy o przewadze zjawiska solwatowania nad koordynacją przez cząsteczki rozpuszczalnika. Podobne zależności odnotowano w przypadku porfirazyny **TG-I-123** (ryc. 17) oraz subftalocyjaniny **SubPc** (ryc. 19).

Właściwości agregacyjne badanych fotouczulaczy oceniono dodatkowo w DMSO i DMF. Jak wynika z ryc. 20-31, uzyskane funkcje $A=f(c)$ charakteryzowały się przebiegiem prostoliniowym. W każdym przypadku wykluczono również istotność parametru b, co stanowi potwierdzenie, że w analizowanym zakresie stężeń barwniki spełniały prawo Lamberta-Beera. Analizując przebieg widm stwierdzono, że zmiany stężenia fotouczulaczy nie powodowały takich efektów jak powstawanie, zanikanie lub przesunięcie położenia pasm absorpcji. Potwierdzono zatem, że w DMSO oraz DMF, badane porfirynoidy nie wykazywały tendencji do tworzenia aglomeratów.

Kolejny etap pracy obejmował analizę właściwości emisyjnych fotouczulaczy w DMSO. Odpowiednia charakterystyka emisyjna umożliwia ocenę przydatności danego barwnika, jako wskaźnika w diagnostyce fotodynamicznej. Dzięki intensywnej fluorescencji, można bardzo precyzyjnie określić obszar objęty zmianami chorobowymi, a następnie podjąć decyzje odnośnie wyboru odpowiedniego schematu leczenia [18,38,64].

W pierwszej kolejności oceniono kształt oraz położenie pasm w widmach fluorescencji, względem widm absorpcji. Zgodnie z oczekiwaniami widma emisji stanowiły lustrzane odbicia i były przesunięte w kierunku długofalowym (ryc. 32-36). Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 11, wartości przesunięć Stokes'a ftalocyjanin **TG-I-161**,

TG-I-162 oraz **TG-TO-1**, mieściły się w zakresie 18-21 nm i były ok. trzykrotnie większe niż w przypadku ftalocyjaniny niepodstawionej **ZnPc** (7 nm). W odniesieniu do porfirazyny **TG-I-123** oraz subftalocyjaniny **SubPc**, wartości przesunięć wynosiły odpowiednio 9 i 11 nm. Obserwowane zależności sugerują, że geometria badanych porfirynoidów w stanie wzbudzonym S_1 , nie różni się znacząco od geometrii w stanie podstawowym [50,60,80,83,114].

Następnym etapem było obliczenie wydajności kwantowych emisji (Φ_F) ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**. Uzyskane wyniki porównano z właściwościami niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej **ZnPc**, której Φ_F w DMSO wynosi 0,20 [114]. Jak przedstawiono w tabeli 12, po wzbudzeniu w paśmie Soreta wydajności kwantowe emisji modyfikowanych ftalocyjanin, były prawie trzykrotnie mniejsze niż w przypadku wzorcowej **ZnPc**. Również małe wartości wydajności kwantowych obserwowano po wzbudzeniu ftalocyjanin w paśmie Q.

Spośród licznych doniesień dotyczących charakterystyki emisyjnej ftalocyjanin cynkowych, na szczególną uwagę zasługują wyniki przedstawione przez Ogunsipe i wsp. Przedmiotem badań były pochodne podstawione ośmioma grupami fenoksyłowymi oraz pirydynowymi [114]. Wymienieni autorzy analizując roztwory związków w DMSO, obserwowali emisję o trzykrotnie większej intensywności niż wartości odnotowane dla ftalocyjanin (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-I-161**) w niniejszej pracy. Można zatem wnioskować, że wprowadzenie podstawników estrowych oraz butoksylowych do części peryferyjnej pierścienia makrocyklicznego, wywiera niekorzystny wpływ na wydajność emisji ftalocyjanin cynkowych.

Generowanie tlenu singletowego

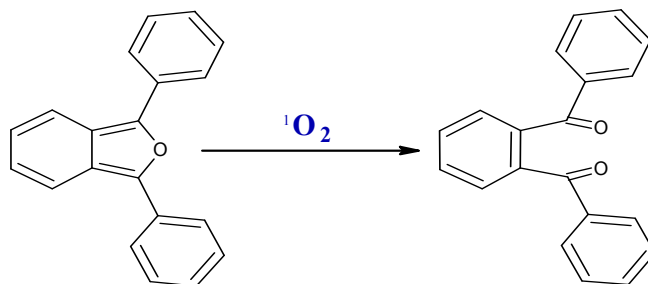
Istotnym etapem badania nowych fotouczulaczy jest analiza zdolności generowania tlenu singletowego. Jak wspomniano wcześniej, efekt fotodynamiczny jest rezultatem interakcji pomiędzy fotouczulaczem znajdującym się we wzbudzonym stanie trypletowym, a cząsteczką tlenu. Wydajność takiego procesu zależy przede wszystkim od liczby wzbudzonych cząsteczek fotosensyblizatora, jak również czasu życia formy trypletowej. W odniesieniu do ftalocyjanin cynkowych, szczególnie interesujące wydają się wyniki przedstawione przez Ogunsipe i wsp. [113]. Badania obejmowały analizę zdolności generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaniny określone jako

długołańcuchowe, modyfikowane czterema lub ośmioma grupami trietylenooksulfanilowymi. Okazało się, że tlen singletowy silniej generowały związki posiadające osiem podstawników. Autorzy sugerowali ponadto, że wprowadzenie do cząsteczki fotosensybilizatora tzw. grup długołańcuchowych, może powodować wzrost wydajności kwantowej tworzenia stanu trypletowego, skracając zarazem jego czas życia. Z kolei Cormick i wsp. poddali ocenie ftalocyjaniny cynkowe, modyfikowane cząsteczkami flukonazolu. Takie połączenia okazały się niekorzystne, ponieważ wykazywały ok. 50% mniejszą aktywność niż ftalocyjanina cynkowa **ZnPc** [38]. Z kolei Sakellariou i wsp. badali między innymi połączenia kompleksowe porfirazyn posiadających ugrupowanie $[N(CH_3)_2]_2$, z $PdCl_2$ oraz $PtCl_2$. Wykazano, że tego rodzaju struktury generują tlen singletowy z wydajnością kwantową $\Phi_{\Delta} = 0,54$. Jak się jednak okazało, ugrupowanie $[N(CH_3)_2]_2$ nie sprzyja natomiast tworzeniu 1O_2 , ponieważ ułatwia bezpromienistą konwersję do stanu podstawowego, dzięki sprzężeniu wolnych par elektronów z układem π pierścienia porfirazyny [129].

W ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem cieszą się fotouczulacze z grupy subftalocyjanin, których modyfikacja pozwala na otrzymanie postaci zjonizowanych. Między innymi Spesia i wsp. w wyniku odpowiedniego podstawienia pierścienia makrocyklicznego, uzyskali subftalocyjaniny w formie kationowej. Jak się jednak okazało tego typu pochodne, posiadały mniejsze wartości Φ_{Δ} niż subftalocyjaniny występujące w postaci niezjonizowanej. Z drugiej strony zwrócono uwagę na fakt, że ich stosunkowo dobra rozpuszczalność w środowisku wodnym, może przynieść korzystne efekty w fotodynamicznym zwalczaniu infekcji bakteryjnych, wywoływanych pałeczkami *E. coli* [143].

Obecnie istnieje wiele sposobów oceny generowania tlenu singletowego. W tym celu wykorzystuje się między innymi reakcje zachodzące z udziałem 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF), dimetyloantracenu, luminolu lub bezpośredni pomiar luminescencji przy 1270 nm [13,15,22,71,84,85,94,163].

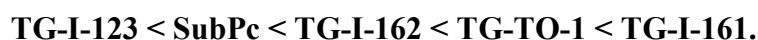
W celu realizacji zaplanowanych badań wykorzystano DPBF, który jako wygaszacz tlenu singletowego ulega reakcji oksydacji - ryc. 83. Proces generowania tlenu singletowego monitorowano w DMSO oraz DMF. Eksperyment prowadzono w warunkach tlenowych, jak również po odtlenowaniu próbek azotem (ryc. 39-50). W celu uniknięcia reakcji łańcuchowych zachodzących w obecności tlenu singletowego, stosowano stężenia DPBF $\sim 3 \times 10^{-5}$ mol/dm³ [47,113].



Ryc. 83. Reakcja oksydacji DPBF w obecności tlenu singletowego

Ocena ilościowa polegała na wyznaczeniu parametrów kinetycznych reakcji rozkładu DPBF (tabela 13). Następnie obliczono względne wartości wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego. Jako substancję odniesienia wykorzystano ftalocyjaninę niepodstawioną **ZnPc**, której wartości Φ_{Δ} zgodnie z danymi z piśmiennictwa, wynoszą 0,67 w DMSO oraz 0,56 w DMF [114].

Jak wynika z tabeli 14 ftalocyjaniny **TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1** oraz subftalocyjanina **SubPc** w DMSO, generowały tlen singletowy ze zbliżoną wydajnością ($\Phi_{\Delta} \sim 0,5$). Najslabiej tlen singletowy w DMSO generowała porfirazyna **TG-I-123**, dla której wartość Φ_{Δ} była prawie 4-krotnie mniejsza niż **ZnPc**. Zróżnicowane wyniki otrzymano także w przypadku naświetlania fotouczulaczy w DMF. Wartości Φ_{Δ} można w tym przypadku uszeregować w następujący sposób:



Jak można zauważyć zdolność generowania tlenu singletowego, jest również najmniejsza w przypadku porfirazyny magnezowej.

Jak wspomniano wcześniej eksperyment powtórzono po odtlenowaniu próbek azotem. Zgodnie z oczekiwaniami, wartości stałych szybkości reakcji rozkładu DPBF zmniejszyły się. Z danych zamieszczonych w tabeli 13 wynika, że efektem zmniejszonego dostępu tlenu, było zahamowanie wydajności generowania tlenu singletowego przez wszystkie badane związki. Najsilniejszy efekt odnotowano w przypadku ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz subftalocyjaniny **SubPc**.

Trwałość fotochemiczna

Badanie trwałości fotochemicznej to ważny etap analizy nowych fotosensybilizatorów. Przyjmuje się, że trwałość fotouczulaczy zależy od stabilności wiązań w pierścieniu makrocyklicznym, a także od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Ocena jakościowa zachodzących procesów fotochemicznych, w pierwszej kolejności polega na obserwacji zmian w przebiegu widm elektronowych. Pozwala to wstępnie ustalić, czy dany barwnik ulega zjawisku fotowysbielenia, czy też fototransformacji z wytworzeniem fotoproduktów. Istotnych informacji dostarcza również charakterystyka ilościowa, obejmująca ustalenie rzędowości reakcji fotochemicznych oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych [26,27,51,62,154]. Barwniki zbyt szybko ulegające rozkładowi pod wpływem światła, mogą okazać się nieaktywne terapeutycznie, jak również wywoływać różnego rodzaju działania niepożądane lub efekty fototoksyczne. Dlatego też badane związki poddano testom trwałości w warunkach stresowego naświetlania z wykorzystaniem wysokociśnieniowej lampy ksenonowej oraz odpowiednich filtrów.

Spośród fotouczulaczy naświetlanych w DMSO, fotolabilna okazała się jedynie subftalocyjanina **SubPc**. Jak przedstawiono na ryc. 59 – obserwowano wyraźny spadek intensywności pasma z maksimum przy długości fali 569 nm oraz jednocześnie wykształcenie nowego pasma z maksimum przy $\lambda = 750$ nm.

W odniesieniu do próbek naświetlanych w DMF, trwałą fotochemicznie okazała się porfirazyna **TG-I-123**. Natomiast w przypadku wszystkich ftalocyjanin modyfikowanych peryferyjnie (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1**) oraz subftalocyjaniny **SubPc**, zachodzące zmiany w przebiegu elektronowych widm absorpcji, wskazywały na rozkład związków (ryc. 52,54,56,58,60,62). W wyniku ekspozycji na promieniowanie obserwowano wyraźne odbarwienie roztworów, będące rezultatem zanikania pasma Soreta oraz pasma Q. Wskazuje to na proces fotowysbielenia, bez tworzenia fotoproduktów trwałych. Opisane zmiany w odniesieniu do badanych ftalocyjanin, są zgodne z sugestiami przedstawionymi przez Durmus i wsp. Według autorów przyłączenie długich łańcuchów do części peryferyjnej makrocyklicznego pierścienia, powodowało wyraźne zmniejszenie fotostabilności ftalocyjanin cynkowych [47].

Badania fotostabilności obejmowały również ocenę kinetyczną zachodzących zmian. Okazało się, że fotodegradacja związków w DMF była procesem dwuetapowym i zachodziła zgodnie z równaniem kinetycznym reakcji I-rzędu. Stałe szybkości drugiego etapu wyznaczono metodą odejmowania (ryc. 63-66). Jak wynika z tabeli 15, w przypadku ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**, drugi etap zachodził ok. 10 razy wolniej.

W przypadku roztworu subftalocyjaniny **SubPc** w DMSO wartości absorbancji mierzono zarówno w maksimum pasma Q, jak również przy długości fali $\lambda_{\max}=750$ nm, która odpowiadała maksimum pasma tworzącego się w wyniku naświetlania (ryc. 67). Stwierdzono, że związek ulegał w DMSO procesowi fototransformacji.

Absorpcja przejściowa

Pomiar absorpcji przejściowej to jedna z metod analitycznych, która umożliwia badanie dynamiki stanów wzbudzonych cząsteczek w roztworach. Pomiar przeprowadza się w oparciu o technikę tzw. „pompa - sonda”, która wykorzystuje dwa impulsy laserowe przechodzące przez kuwetę z roztworem badanego związku. Pierwszy impuls tzw. pompujący, odznacza się dużym natężeniem i prowadzi do wzbudzenia cząsteczki. Drugi natomiast zwany sondującym lub próbkującym, jest opóźniony w stosunku do pierwszego i posiada mniejsze natężenie. Odpowiada za monitorowanie zmian absorpcji w próbce. Rejestrowane różnice w widmach absorpcji przejściowej, zależą od opóźnienia czasowego pomiędzy wspomnianymi impulsami i mogą być efektem takich zjawisk, jak redystrybucja energii, zmiany kształtu cząsteczki, przeniesienia protonów lub elektronów [54,55,69,171].

W celu oceny absorpcji przejściowej ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**, wykorzystano wzbudzenie impulsami o długości fali z zakresu pasma Soreta (400 nm), jak również pasma Q (660 nm). Opóźnienie czasowe pomiędzy impulsem pompującym i próbkującym wynosiło maksymalnie 1,8 ns. Uzyskane wyniki porównywano z właściwościami niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej (**ZnPc**). Widoczne na ryc. 68 zmiany w przebiegu widm absorpcji przejściowej przy obu długościach fali wzbudzenia, obejmowały wzrost absorpcji w przedziale 400–650 nm. Odnotowano również wzrost wzmocnienia w zakresie 660–700 nm, który odpowiada

procesowi wybielania oraz emisji wymuszonej. Obserwowano także zanik słabego wzmocnienia w zakresie powyżej 700 nm.

Kolejnym krokiem w odniesieniu do ftalocyjaniny **ZnPc**, było przeprowadzenie globalnej analizy danych z widm absorpcji przejściowej z wykorzystaniem algorytmu rekonstrukcji macierzy [54]. Uzyskano widma DADS oraz obliczono trzy różne czasy zaniku określone jako τ_1 , τ_2 , τ_3 (ryc. 70). Okazało się, że wartości uzyskane dla **ZnPc** wynoszące ok. 2 ps oraz 3,3 ns (tabela 16), są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Savolainena i wsp. [133]. Wartość 3,3 ns można według autorów przypisać czasowi życia wzbudzonego stanu S_1 . Natomiast składową 2 ps, opisano jako efekt dynamicznej solwatacji dielektrycznej w DMSO.

W niniejszej pracy podjęto również próbę analizy kinetyki zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny **ZnPc**, przy wzbudzeniu impulsami o długości fali 400 nm. Analiza zmian przebiegu widm absorpcji przejściowej wykazała obecność kolejnej składowej, posiadającej stałą zaniku 10 ps. Natomiast jak można zauważyć na ryc. 69, przy wzbudzeniu impulsami o długości fali 660 nm, odnotowano jedynie niewielką amplitudę zmian. Różnice w amplitudzie zaniku w zależności od długości fali wzbudzenia sugerują, że opisany proces jest wynikiem rozproszenia energii. Wyniki uzyskane z pomiarów absorpcji przejściowej, wykonane przez Howe i wsp. dla ftalocyjaniny podstawionej grupami tetra sulfonowymi, wskazały natomiast na zjawisko konwersji wewnętrznej ze stanu S_2 do S_1 jako źródło sygnału o stałej czasowej 10 ps [69]. Powyższa interpretacja wydaje się jednak niewłaściwa, przede wszystkim ze względu na fakt, że czas 10 ps jest zbyt długi dla sugerowanego procesu. Po drugie - wskazany sygnał autorzy obserwowali również przy wzbudzeniu falami z zakresu pasma Q. Właściwości czasowo rozdzielcze porfiryn oraz porficyn, opisywane odpowiednio przez Baskina i wsp. oraz Fitę i wsp., okazały się bardzo zbliżone do zmian absorpcji przejściowej zarejestrowanych dla analizowanej ftalocyjaniny **ZnPc** [16,55]. Dlatego też stwierdzono, że obecność składowej rejestrowanej przy 10 ps, należy przypisać utracie energii wzbudzonej cząsteczki, na drodze wymiany ciepła z cząsteczkami rozpuszczalnika.

Wykazano również, że obserwowane zmiany w absorpcji przejściowej nie wskazują jednoznacznie na zjawisko tworzenia stanu trypletowego. Z kolei przedstawione wcześniej wyniki uzyskane z analizy generowania tlenu singletowego sugerują, że stan ten jest generowany z dużą wydajnością. Savolainen i wsp. wyjaśniają

taką rozbieżność jako rezultat maskowania pasm charakterystycznych dla stanu trypletowego, przez silne pasma związane z fotowysbieleniem [137].

Kształt widm absorpcji przejściowej ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**, jest zbliżony do widm ftalocyjaniny **ZnPc**. Pasma absorpcji stanu wzbudzonego, sąsiadują z pasmami odpowiadającymi zjawisku wybielenia oraz emisji wymuszonej, występując po stronie krótkofalowej. Rozbieżności odnotowano natomiast porównując wyniki uzyskane dla różnych opóźnień czasowych (ryc. 71-76). Amplitudy zmian, rejestrowane dla wczesnych opóźnień są bardzo niewielkie w porównaniu z ftalocyjaniną **ZnPc**, zauważalne jedynie przy ok. 550 nm, 650 nm oraz dla pasm emisji wymuszonej (ok. 750 nm). Dla długich opóźnień, rzędu 100 ps, obserwowano wyraźne zmiany widm oraz pojawienie się punktu izosbestycznego przy 600 nm.

Na drodze analizy globalnej ustalono trzy różne czasy zaniku - τ_1 , τ_2 , τ_3 (tabela 16). Jak wynika z ryc. 77, widma DADS przy odpowiednich czasach zaniku nie wykazywały istotnych różnic. Najkrótszy czas zaniku (τ_1) był bliski wartości 2 ps, co odpowiada zjawisku dynamicznej solwatacji dielektrycznej. Wykazano, że amplituda zmian absorpcji odpowiadająca drugiemu czasowi zaniku (τ_2), podobnie jak w przypadku **ZnPc**, zależy od długości fali wzbudzenia. Większą amplitudę zaniku ze stałą czasową τ_2 , obserwowano dla większej energii wzbudzenia. Ponadto, jak wynika z tabeli 16, czasy zaniku τ_2 wyznaczone dla ftalocyjanin **TG-I-161**, **TG-I-162** oraz **TG-TO-1**, przyjmują wartości kilkukrotnie większe niż w przypadku **ZnPc**. Opisane różnice wskazują, że podstawniki estrowe oraz butoksyłowe wpływają na zjawisko termalizacji cząsteczki oraz nasilają proces wymiany energii z molekułami rozpuszczalnika. Przypuszczalnie nadmiar energii wzbudzenia jest przekazywany od pierścienia do podstawników, a następnie uwalniany do otoczenia. Nie można również wykluczyć, że podstawniki długołańcuchowe ze względu na możliwość rotacji, mogą doświadczać dużego oporu ze strony rozpuszczalnika. Nieznacznie dłuższe czasy termalizacji obserwowane dla ftalocyjaniny **TG-I-162** mogą sugerować, że ze wzrostem długości łańcucha w podstawnikach, może wzrastać zdolność przewodzenia energii wibracyjnej w kierunku cząsteczek rozpuszczalnika. Wszystkie barwniki wykazywały mniejszą wartość τ_2 , przy wzbudzaniu promieniowaniem z zakresu pasma Q niż z zakresu pasma Soreta (tabela 16). Można to przypisać konieczności transferu mniejszej porcji energii do otoczenia.

Odnotowano również, że najwolniejsze procesy zachodzące z udziałem badanych ftalocyjanin, wywoływały wyraźne zmiany w przebiegu widm absorpcji przejściowej.

Obserwowano zanik szerokiego pasma absorpcji z maksimum przy ok. 500 nm oraz powstawanie pasma przy ok. $\lambda = 650$ nm. Zarejestrowano także zanik wzmocnienia nakładających się pasm przy $\lambda = 750$ nm, jako konsekwencję procesu fotowysbielenia oraz wymuszonej emisji. Opisanie zjawiska znalazły odzwierciedlenie w kształcie widm DADS, odpowiadających czasowi zaniku τ_3 (ryc. 77). Można przyjąć, że dla wszystkich ftalocyjanin podstawionych wartość τ_3 , była prawie identyczna (1,2-1,3 ns) oraz odpowiadała czasowi życia wzbudzonego stanu S_1 . Obecność punktu izosbestycznego przy $\lambda = 600$ nm, wskazuje na reakcję typu substrat - produkt i może być rozważana jako zanik wzbudzonego stanu singletowego, przy jednoczesnym tworzeniu stanu trypletowego.

Stosunek wartości τ_3 dla ftalocyjaniny ZnPc i podstawionych pochodnych wynosi ok. 2,8. Podobną zależność można zaobserwować porównując wartości wydajności kwantowych fluorescencji (ok. 3). Wskazuje to, że stałe radiacyjne wszystkich czterech ftalocyjanin cynkowych są zbliżone. Dowodzi to również, że w przypadku ftalocyjanin podstawionych (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1**) przeważają procesy bezpromienne. Takie wyniki są zgodne z wartościami stałych radiacyjnych, obliczonych na podstawie widm absorpcji, z wykorzystaniem równania Stricklera-Berga (tabela 17) [145]. Warto również zauważyć, że pomimo znacznie krótszego czasu życia stanu wzbudzonego ftalocyjanin podstawionych, obliczona wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego w DMSO, jest mniejsza tylko o ok. 25 % w porównaniu z ftalocyjaniną **ZnPc** (tabela 14).

W następnej kolejności przeprowadzono analizę absorpcji przejściowej porfirazyny **TG-I-123** oraz subftalocyjaniny **SubPc**. Zastosowany układ pomiarowy, nie był jednak przystosowany do wzbudzania związków promieniowaniem o długości fali poniżej 400 nm. Dlatego też wykorzystano jedynie wzbudzenie promieniowaniem z zakresu pasma Q. Wyniki uzyskiwane w ten sposób są dokładne, jedynie przy opóźnieniu czasowym do ok. 500 ps.

Jak przedstawia ryc. 78, porfirazyna **TG-I-123** w tym zakresie opóźnień, nie wykazywała istotnych zmian w widmach absorpcji przejściowej. W tym przypadku zastosowanie algorytmu analizy globalnej, umożliwiło opisanie ewolucji czasowej widm DADS za pomocą dwóch stałych czasowych (ryc. 79). Okazało się, że obserwowana dynamika zmian jest prostsza niż w przypadku wcześniej opisanych związków. Pierwsza stała czasowa (5 ps), odpowiada prawdopodobnie za ultraszybki proces związany z dyssypacją energii (relaksacja oscylacyjna, termalizacja). Z kolei

druga stała czasowa, jest równa czasowi życia stanu wzbudzonego (4 ns), należy ją jednak traktować jedynie jako oszacowanie.

Przeprowadzono również ocenę kinetyki zmian absorpcji przejściowej porfirazyny **TG-I-123**, przy długościach fali charakterystycznych dla procesu wybielania oraz absorpcji ze stanu wzbudzonego. Na ryc. 80 można zauważyć całkowity brak narastania sygnału. Początkowo zanik przebiega szybko (5 ps), a następnie coraz wolniej (do 4 ns). W przypadku porfirazyny **TG-I-123** nie stwierdzono również sygnału charakterystycznego dla tworzenia stanu trypletowego.

W przypadku subftalocyjaniny **SubPc** zmiany absorpcji dla opóźnień czasowych do 500 ps, również okazały się stosunkowo niewielkie (ryc. 81). W celu oceny dynamiki zachodzących procesów, przeprowadzono dodatkowo jednoczesne dopasowanie 3-eksponencjalne dla dwóch procesów, odpowiadających maksimum wybielania i absorpcji ze stanu wzbudzonego (odpowiednio 569 i 614 nm) – ryc. 82. Najdłuższy czas zaniku odpowiadał wartości uzyskanej z analizy globalnej (2,7 ns). Pozostałe dwa czasy, wyznaczone z dopasowania, to 5,5 ps i 8 ps, jednak błędy tych wartości okazały się rzędu nawet 100%, więc mogą być traktowane jedynie jako oszacowanie. Zachowanie cząsteczki subftalocyjaniny **SubPc** jest zbliżone do ftalocyjanin ocenianych w ramach niniejszej pracy. Można zauważyć szybkie początkowe zmiany przebiegu widm absorpcji przejściowej, a następnie proces zachodzący ze stałą czasową rzędu 10 ps, który powoduje narastanie wzmocnienia w paśmie wybielania. Obserwowany całkowity zanik absorpcji jest prawdopodobnie spowodowany dezaktywacją stanu wzbudzonego.

Ocena fototoksyczności

W kolejnym etapie pracy - na przykładzie ftalocyjaniny **TG-I-161** - podjęto badania mające na celu ocenę właściwości fototoksycznych. Jako substancję odniesienia zastosowano niepodstawioną ftalocyjaninę **ZnPc**. Analizie poddano roztwory związków o stężeniach 0,1 oraz 5,0 μM w podłożu DMEM. Do badań wykorzystano komórki nowotworu koleczystkomórkowego (*Human Squamous Carcinoma*). Na wstępie oceniono wpływ obu fotouczulaczy, na przeżywalność kultur komórkowych bez dostępu światła. Wyniki przedstawione w tabeli 18 dowodzą, że

niezależnie od zastosowanego stężenia, żaden ze związków nie wykazywał toksyczności ciemnej w odniesieniu do komórek nowotworowych.

Następnie powtórzono eksperyment w warunkach naświetlania. W tym celu wykorzystano układ składający się z żarówki wolframowej oraz odpowiednich filtrów. Filtr wodny o grubości warstwy 1 cm eliminował promieniowanie z zakresu IR, zmniejszając nadmierny wzrost temperatury ekspozycyjnych komórek. Z kolei zastosowanie szklanego filtra odcinającego (*KC-11*), przepuszczającego promieniowanie o długości fali powyżej 650 nm, umożliwiło naświetlanie próbek w zakresie pasma Q. Kultury komórkowe ekspozycyjno na promieniowanie w różnych odległościach od źródła światła (5 oraz 10 cm), co odpowiadało natężeniu promieniowania padającego, odpowiednio 89 oraz 36 mW/cm². Podobnie jak w przypadku oceny toksyczności ciemnej, zastosowano różne stężenia fotouczulaczy, wynoszące 0,1 oraz 5,0 μM. Wyniki dotyczące fototoksyczności związków przedstawiono w tabeli 19. Jak można zauważyć, ftalocyjanina **TG-I-161** zastosowana w stężeniu 0,1 μM powodowała spadek przeżywalności komórek o ok. 10%, natomiast przy stężeniu 5,0 μM, wartość wzrastała jedynie do ok. 13%. Należy jednocześnie zauważyć, że efekt fotodynamiczny nie zależał od natężenia promieniowania padającego.

Analogiczny eksperyment przeprowadzono w odniesieniu do ftalocyjaniny **ZnPc**. Z danych przedstawionych w tabeli 19 wynika, że po zastosowaniu stężenia 0,1 μM związek nie wykazywał toksyczności przy natężeniu promieniowania padającego 36 mW/cm². Natomiast po zwiększeniu natężenia promieniowania do 89 mW/cm², przeżywalność komórek wynosiła 70%.

Przy stężeniu ftalocyjaniny wynoszącego 5 μM efekt fototoksyczny był na tyle silny, że już przy natężeniu promieniowania 36 mW/cm², doprowadzał do uśmiercenia wszystkich komórek nowotworowych. Porównując właściwości badanych związków można zatem stwierdzić, że efekt fototoksyczny generowany przez ftalocyjaninę **TG-I-161**, jest mniejszy niż **ZnPc**.

Aktywność fotodynamiczna modyfikowanych ftalocyjanin cynkowych cieszy się w ostatnim czasie dużym zainteresowaniem i stanowi przedmiot licznych projektów badawczych. Spośród wielu rodzajów nowotworów skuteczność tego typu barwników wykazano między innymi w odniesieniu do raka krtani (Hep-2, *Human larynx carcinoma*). Yslas i wsp. oceniając właściwości pochodnych z podstawnikami metoksyłowymi oraz trifluorometylobenzyloksyłowymi wykazali, że oba związki były

bardzo szybko przyswajane przez komórki (~3h). W wyniku naświetlania osiągnięto umieralność komórek na poziomie nawet 80%, przy jednoczesnej zerowej toksyczności w warunkach ciemnych [169,170]. Szczególnie interesujące pod kątem badań dotyczących PDT wydają się natomiast komórki nowotworu kolczystokomórkowego. Przede wszystkim ze względu na dużą gęstość receptorów LDL oraz peryferyjnych receptorów benzodiazepinowych, jak również krótki czas trwania cyklu komórkowego [64]. Biorąc pod uwagę fakt, że głównym miejscem działania fotouczulaczy jest błona komórkowa, można przypuszczać, że zastosowanie związków silnie lipofilnych znajdzie odzwierciedlenie w wysokiej skuteczności. Jednak podstawowym problemem pozostaje sposób wprowadzenia fotouczulaczy w miejsce docelowe.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że w środowisku wodnym ftalocyjanina **TG-I-161** agreguje na tyle silnie, że nie jest w stanie związać się z receptorami błon oraz przeniknąć do komórek. Za niską fototoksyczność ftalocyjaniny **TG-I-161**, może zatem odpowiadać obecność ośmiu łańcuchów estrowych, które wyraźnie zwiększają lipofilność, a tym samym zmniejszają rozpuszczalność w środowisku wodnym.

Podsumowując przedstawione badania można sformułować następujące wnioski:

- Podstawniki butoksyłowe oraz łańcuchy estrowe w części peryferyjnej pierścienia makrocyklicznego ftalocyjanin cynkowych, powodują przesunięcie maksimum absorpcji pasma Q w kierunku fal dłuższych.
- Rozpuszczalniki takie jak chloroform, eter etylowy, octan etylu, heksan oraz cykloheksan sprzyjają tworzeniu form zagregowanych ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **TG-I-162**.
- W roztworach DMSO oraz DMF wszystkie porfirynoidy nie wykazywały tendencji do agregacji.
- Wszystkie porfirynoidy w DMSO posiadały mniejszą wydajność kwantową generowania tlenu singletowego w porównaniu z wzorcową, niepodstawioną ftalocyjaniną cynkową - **ZnPc**.
- W DMF wydajność kwantową generowania tlenu singletowego można uszeregować w następujący sposób:
TG-I-123 < ZnPc < SubPc < TG-I-162 < TG-TO-1 < TG-I-161
- Subftalocyjanina **SubPc** w roztworze DMSO ulega procesowi fototransformacji.
- W wyniku ekspozycji na promieniowanie ftalocyjanin podstawionych peryferyjnie (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1**) oraz subftalocyjaniny (**SubPc**) w DMF zachodzi zjawisko fotowysielania.
- Podstawniki butoksyłowe oraz estrowe ftalocyjanin cynkowych wpływają na zjawisko termalizacji cząsteczek oraz nasilają proces wymiany energii z molekułami rozpuszczalnika.
- Zarejestrowane zmiany absorpcji przejściowej, nie są charakterystyczne dla procesu tworzenia stanu trypletowego badanych fotouczulaczy.

- Efekt fototoksyczny w odniesieniu do komórek nowotworu kolczystokomórkowego (Human Squamous Carcinoma), generowany przez ftalocyjaninę **TG-I-161**, jest mniejszy w porównaniu z niepodstawioną ftalocyjaniną cynkową **ZnPc**.

VI. STRESZCZENIE

W pracy podjęto badania obejmujące charakterystykę fotochemiczną, fotofizyczną oraz ocenę aktywności biologicznej fotouczulaczy z grupy syntetycznych porfirynoidów. Analizowano właściwości trzech ftalocyjanin (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1**) funkcjonalizowanych w centrum cząsteczki jonami Zn(II), porfirazyny (**TG-I-123**) zawierającej jony Mg(II) oraz subftalocyjaniny boronowej (**SubPc**). Ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **TG-I-162** posiadały peryferyjne podstawniki estrowe, natomiast ftalocyjanina **TG-TO-1** zawierała podstawniki butoksyłowe. Porfirazyna magnezowa **TG-I-123** była modyfikowana ośmioma grupami propylowymi. Z kolei subftalocyjanina **SubPc** nie posiadała podstawników w części peryferyjnej.

W pierwszym etapie pracy przeprowadzono analizę spektroskopową fotosensybilizatorów, która obejmowała charakterystykę widm elektronowych w czternastu rozpuszczalnikach organicznych. W przebiegu widm wszystkich związków obserwowano obecność dwóch charakterystycznych pasm, Soreta oraz pasma Q. Stwierdzono, że ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **TG-I-162** w rozpuszczalnikach takich jak chloroform, eter etylowy, octan etylu, heksan oraz cykloheksan, występują w postaci zagregowanej. Natomiast brak tendencji do tworzenia aglomeratów, odnotowano w przypadku porfirazyny **TG-I-123** oraz subftalocyjaniny **SubPc**.

Jednym z celów pracy było określenie właściwości emisyjnych porfirynoidów, które analizowano w DMSO. Przeprowadzono ocenę jakościową widm fluorescencji, zmierzono wartości przesunięć Stokes'a oraz wyznaczono kwantową wydajność procesów emisji. Stwierdzono, że badane ftalocyjaniny **TG-I-161** oraz **TG-TO-1** po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali z zakresu pasma Soreta, wykazywały bardziej intensywną emisję niż w wyniku absorpcji promieniowania odpowiadającego pasmu Q.

Kolejny etap pracy obejmował analizę wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego ($\Phi\Delta$). Proces oceniono w dwóch rozpuszczalnikach tj. DMSO oraz DMF, w warunkach tlenowych, jak również po odtlenowaniu azotem. W celu monitorowania szybkości tworzenia tlenu singletowego, wykorzystano reakcję oksydacji 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF). Jako wzorzec do obliczenia wydajności kwantowych wykorzystano niepodstawioną ftalocyjaninę cynkową (ZnPc), której wartości $\Phi\Delta$ wg danych literaturowych wynoszą: 0,67 w DMSO oraz 0,56 w DMF.

W warunkach tlenowych w DMSO, wszystkie badane substancje charakteryzowały się mniejszymi wartościami $\Phi\Delta$ w porównaniu z ZnPc, przy czym najslabiej tlen singletowy generowała porfirazyna **TG-I-123**. Natomiast po naświetleniu fotouczulaczy w DMF, ftalocyjanina **TG-I-161** generowała tlen singletowy z wydajnością większą od wzorca; $\Phi\Delta=0,79$. Po odtlenowaniu próbek, w przypadku wszystkich fotouczulaczy proces generowania tlenu singletowego zachodził z mniejszą wydajnością.

Testy trwałości fotochemicznej badanych związków, przeprowadzono po ich ekspozycji na promieniowanie z zakresu pasma Q, stosując rozpuszczalniki takie jak DMSO oraz DMF. Stwierdzono, że wszystkie ftalocyjaniny oraz porfirazyna w roztworze DMSO, nie ulegały fotodegradacji po ekspozycji na promieniowanie. Podatna na rozkład fotochemiczny okazała się natomiast subftalocyjanina **SubPc**. W przypadku drugiego z zastosowanych rozpuszczalników, tj. DMF, brak rozkładu stwierdzono jedynie w przypadku porfirazyny **TG-I-123**. Pozostałe fotouczulacze ulegały zjawisku „fotobleachingu”, któremu towarzyszył zanik pasma Soreta oraz pasma Q.

Jeden z etapów pracy dotyczył analizy dynamiki stanów wzbudzonych cząsteczek fotouczulaczy, obejmującej pomiary absorpcji przejściowej w DMSO. Wykorzystano wzbudzenie impulsami o długości fali z zakresu pasma Soreta oraz pasma Q. Wykorzystując kinetykę zmian poszczególnych pasm absorpcji przejściowej, ustalono trzy różne czasy zaniku oraz zarejestrowano związane z nimi widma różnicowe. W odniesieniu do ftalocyjanin zauważono, że podstawniki estrowe oraz butoksylowe mogą nasilać zjawisko wymiany energii na drodze bezpromienistej. Wykazano również, że obserwowane zmiany absorpcji przejściowej, nie wskazywały jednoznacznie na proces tworzenia stanu trypletowego.

W odniesieniu do ftalocyjaniny **TG-I-161** przeprowadzono ocenę aktywności fotodynamicznej, względem komórek nowotworu kolczystokomórkowego (Human Squamous Carcinoma). Analizowano toksyczność związku bez dostępu światła, jak również po ekspozycji na odpowiednie dawki promieniowania. Jako substancję odniesienia wykorzystano niepodstawioną ftalocyjaninę ZnPc. Wykazano, że efekt fototoksyczny generowany przez ftalocyjaninę **TG-I-161** jest mniejszy niż wzorca.

VII. SUMMARY

The dissertation presents photochemical, photophysical and photochemical characterisation and evaluation of biological activity of a few photosensitisers from the group of synthetic porphyrinoids. The compounds included three phthalocyanines (**TG-I-161**, **TG-I-162**, **TG-TO-1**) functionalised at the centre with Zn(II) ions, porphyrazine (**TG-I-123**) containing Mg(II) ions and boron subphthalocyanine (**SubPc**). Phthalocyanines **TG-I-161** and **TG-I-162** had peripheral ester substituents, while phthalocyanine **TG-TO-1** contained butoxyl residues. Magnesium porphyrazine **TG-I-123** was modified with eight propyl groups, whereas subphthalocyanine **SubPc** was not substituted in peripheral part.

At the first stage UV-Vis spectra of the compounds studied were taken in 14 organic solvents. The spectra of all compounds revealed the presence of two bands characteristic of photosensitisers, i.e. the Soret and the Q bands. Phthalocyanines **TG-I-161** and **TG-I-162** were found to occur in the aggregated form in the following solvents: chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, hexane and cyclohexane. Porphyrazine **TG-I-123** and subphthalocyanine **SubPc** did not show tendencies towards agglomerate formation.

One of the objectives of the work was to evaluate the emission properties of porphyrinoids in DMSO. The fluorescence spectra were qualitatively evaluated, Stoke's shift was measured and the quantum yield of emission was determined. Phthalocyanines **TG-I-161** and **TG-TO-1** were found to show more intense emission upon excitation by radiation of a wavelength from the Soret band than from the Q band.

Another element was the analysis of quantum yields of singlet oxygen generation (Φ_{Δ}). This process was evaluated in two solvents DMSO and DMF, in aerobic conditions and repeated after bubbling with nitrogen in order to remove molecular oxygen. The rate of singlet oxygen formation was monitored with the use of 1,3-diphenylzobenzofurane (DPBF) oxidation. The standard for quantum yield calculation was unsubstituted zinc phthalocyanine whose Φ_{Δ} according to literature is 0.67 in DMSO and 0.56 in DMF. In aerobic conditions in DMSO all the substances studied had Φ_{Δ} lower than that for ZnPc, and **TG-I-123** was the poorest singlet oxygen generator. Upon irradiation in DMF, **TG-I-161** showed the highest yield of singlet oxygen generation, its Φ_{Δ} was 0.79.

After removal of oxygen from above the samples, the yield of singlet oxygen generation was much lower.

Photostabilities of the compounds studied were assayed under irradiation at a wavelength from the Q band in DMSO and DMF as solvents. All the compounds studied in DMSO solutions were found not to undergo photodegradation after exposure to irradiation. Only **SubPc** was found to be susceptible to photochemical degradation. In DMF only **TG-I-123** was resistant to photodegradation while the other compounds showed the so-called photobleaching as a consequence of disappearance of the Soret and the Q bands.

The analysis of the excited states of the photosensitisers was conducted on the basis of measurements of transient absorption in DMSO. The compounds studied were excited by pulses of the wavelengths from the Soret or the Q bands. On the basis of the kinetics of changes in individual transient absorption bands, for each compound three different decay times were measured for three excited states and the differential spectra related to the decay times. The ester or butoxyl substituents were suggested to enhance the radiationless exchange of energy. The transient absorption changes observed did not imply reliably the triplet state formation.

The photodynamic activity of **TG-I-161** was tested against the cells of Human Squamous Carcinoma. The toxicity of the compound was evaluated without access of light and after exposition to certain doses of radiation. The reference compound was unsubstituted ZnPc. The phototoxic effect generated by **TG-I-161** was smaller than that of the standard.

VIII. SPIS ZAMIESZCZONYCH SKRÓTÓW

ALA	-	kwask 5-aminolewulinowy (<i>ang. 5-aminolevulinic acid</i>)
AMD	-	starcze zwyrodnienie plamki ocznej (<i>ang. age-related macular degeneration</i>)
BpD	-	benzoporfiryna i jej pochodne (<i>ang. benzoporphyrin derivative</i>)
CT	-	przeniesienie ładunku (<i>ang. charge transfer</i>)
DADS	-	widma różnicowe związane z zanikiem (<i>ang. decay associated difference spectra</i>)
DMEM	-	podłoże hodowlane Dulbecco zmodyfikowane przez Eagle'a (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DPBF	-	1,3-difenyloizobenzofuran (<i>ang. 1,3-diphenylisobenzofurane</i>)
EDTA	-	kwask etylenodiaminotetraoctowy
FBS	-	bydlęca surowica płodowa (<i>ang. Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	-	Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
HOMO	-	najwyższy zajęty orbital cząsteczkowy (<i>ang. higher occupied molecular orbital</i>)
HpD	-	hematoporfiryna i jej pochodne (<i>ang. hematoporphyrin derivative</i>)
HPLC	-	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSC-3	-	linia komórkowa nowotworu kolczystokomórkowego (<i>ang. Human Squamous Carcinoma</i>)
ICH	-	Międzynarodowa Konferencja Harmonizacji Wymagań dla Leków (<i>ang. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>)
LDL	-	lipoproteiny o małej gęstości (<i>ang. low density lipoproteins</i>)
LMCT	-	przeniesienie ładunku od ligandu do metalu (<i>ang. ligand-to-metal charge transfer</i>)
LUMO	-	najniższy nie zajęty orbital cząsteczkowy (<i>ang. lower occupied molecular orbital</i>)

MLCT	-	przeniesienie ładunku od metalu do ligandu (<i>ang. metal-to-ligand charge transfer</i>)
MMP-7	-	metaloproteinaza 7
NAD ⁺	-	nukleotyd nikotynoamidoadeninowy w formie utlenionej
NADH	-	nukleotyd nikotynoamidoadeninowy w formie zredukowanej
NOPA	-	niewspółliniowy optyczny generator parametryczny (<i>ang. noncollinear optical parametric amplifier</i>)
PBS	-	buforowany roztwór soli fizjologicznej (<i>ang. Phosphate Buffered Saline</i>)
PDD	-	diagnostyka fotodynamiczna (<i>ang. photodynamic diagnosis</i>)
PDT	-	terapia fotodynamiczna (<i>ang. photodynamic therapy</i>)
PMB	-	fotodynamiczne latarnie molekularne (<i>ang. photodynamic molecular beacons</i>)
PS	-	fotouczulacz (<i>ang. photosensitizer</i>)
PUNPs	-	nanocząstki wykazujące zdolność konwersji energii (<i>ang. photon upconverting nanoparticles</i>)
Q	-	wygaszacz (<i>ang. quencher</i>)
RFT	-	reaktywne formy tlenu

IX. WYKAZ RYCIŃ I TABEL

1. Wykaz rycin

Ryc. 1.	Etapy PDT oraz mechanizmy prowadzące do śmierci komórek nowotworowych (RFT = reaktywne formy tlenu)	15
Ryc. 2.	Przemiany energetyczne fotouczulaczy	19
Ryc. 3.	Schemat działania fotouczulacza typu PUNP	31
Ryc. 4.	Schemat działania PMB z peptydowym łącznikiem; PS - fotouczulacz, Q - wygaszacz, MMP-7- metaloproteinaza 7	32
Ryc. 5	Schemat działania PMB z oligonukleotydowym łącznikiem o strukturze „spinki do włosów” ; PS - fotouczulacz, Q – wygaszacz	32
Ryc. 6.	Wzory strukturalne porfiryny, ftalocyjaniny, porfirazyny oraz subftalocyjaniny	41
Ryc. 7.	Chromatogram oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161	57
Ryc. 8.	Chromatogram oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162	57
Ryc. 9.	Chromatogram oraz widmo UV-Vis porfirazyny TG-I-123	58
Ryc. 10.	Widma elektronowe ftalocyjaniny TG-I-161 w rozpuszczalnikach organicznych	60
Ryc. 11.	Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-I-161 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika	61
Ryc. 12.	Widma elektronowe ftalocyjaniny TG-I-162 w rozpuszczalnikach organicznych	62
Ryc. 13.	Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-I-162 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika	63
Ryc. 14.	Widma elektronowe ftalocyjaniny TG-TO-1 w rozpuszczalnikach organicznych	64
Ryc. 15.	Zależność położenia λ_{\max} pasma Q ftalocyjaniny TG-TO-1 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika	65
Ryc. 16.	Widma elektronowe porfirazyny TG-I-123 w rozpuszczalnikach organicznych	66
Ryc. 17.	Zależność położenia λ_{\max} pasma Q porfirazyny TG-I-123 od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika	67

Ryc. 18.	Widma elektronowe subftalocyjaniny SubPc w rozpuszczalnikach organicznych	68
Ryc. 19.	Zależność położenia λ_{\max} pasma Q subftalocyjaniny SubPc od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika	69
Ryc. 20.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO; pomiary przy $\lambda=743$ nm	73
Ryc. 21.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-161 w DMF; pomiary przy $\lambda=736$ nm	73
Ryc. 22.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162 w DMSO; pomiary przy $\lambda=743$ nm	74
Ryc. 23.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-I-162 w DMF; pomiary przy $\lambda=733$ nm	74
Ryc. 24.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO; pomiary przy $\lambda=746$ nm	75
Ryc. 25.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMF; pomiary przy $\lambda=738$ nm	75
Ryc. 26.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis porfirazyny TG-I-123 w DMSO; pomiary przy $\lambda=598$ nm	76
Ryc. 27.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis porfirazyny TG-I-123 w DMF; pomiary przy $\lambda=598$ nm	76
Ryc. 28.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis subftalocyjaniny SubPc w DMSO; pomiary przy $\lambda=569$ nm	77
Ryc. 29.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis subftalocyjaniny SubPc w DMF; pomiary przy $\lambda=566$ nm	77
Ryc. 30.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny ZnPc w DMSO; pomiary przy $\lambda=671$ nm	78
Ryc. 31.	Graficzna zależność $A = f(c)$ oraz widma UV-Vis ftalocyjaniny ZnPc w DMF; pomiary przy $\lambda=670$ nm	78
Ryc. 32.	Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny TG-I-161 po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm	81
Ryc. 33.	Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny TG-I-162 po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm	81
Ryc. 34.	Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny TG-TO-1 po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 670 nm	82

Ryc. 35.	Widmo absorpcji i fluorescencji porfirazyny TG-I-123 po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 550 nm	82
Ryc. 36.	Widmo absorpcji i fluorescencji subftalocyjaniny SubPc po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 520 nm	83
Ryc. 37.	Widmo absorpcji i fluorescencji ftalocyjaniny ZnPc po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 645 nm	83
Ryc. 38.	Zmiany przebiegu widm UV-Vis w wyniku naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-161 oraz DPBF w DMSO (warunki tlenowe)	86
Ryc. 39.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-161 oraz DPBF w DMSO	88
Ryc. 40.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-162 oraz DPBF w DMSO	88
Ryc. 41.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-TO-1 oraz DPBF w DMSO	89
Ryc. 42.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny porfirazyny TG-I-123 oraz DPBF w DMSO	89
Ryc. 43.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny subftalocyjaniny SubPc oraz DPBF w DMSO	90
Ryc. 44.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny ZnPc oraz DPBF w DMSO	90
Ryc. 45.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-161 oraz DPBF w DMF	91
Ryc. 46.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-I-162 oraz DPBF w DMF	91
Ryc. 47.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny TG-TO-1 oraz DPBF w DMF	92
Ryc. 48.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny porfirazyny TG-I-123 oraz DPBF w DMF	92
Ryc. 49.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny subftalocyjaniny SubPc oraz DPBF w DMF	93
Ryc. 50.	Zależność $\ln(A_0/A)$ od czasu naświetlania mieszaniny ftalocyjaniny ZnPc oraz DPBF w DMF	93
Ryc. 51.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania	97

Ryc. 52.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-I-161 w DMF po odpowiednim czasie naświetlania	97
Ryc. 53.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-I-162 w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania	98
Ryc. 54.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-I-162 w DMF po odpowiednim czasie naświetlania	98
Ryc. 55.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania	99
Ryc. 56.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMF po odpowiednim czasie naświetlania	99
Ryc. 57.	Elektronowe widma absorpcji porfirazyny TG-I-123 w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania	100
Ryc. 58.	Elektronowe widma absorpcji porfirazyny TG-I-123 w DMF po odpowiednim czasie naświetlania	100
Ryc. 59.	Elektronowe widma absorpcji subftalocyjaniny SubPc w DMSO odpowiednim czasie naświetlania	101
Ryc. 60.	Elektronowe widma absorpcji subftalocyjaniny SubPc w DMF odpowiednim czasie naświetlania	101
Ryc. 61.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny ZnPc w DMSO po odpowiednim czasie naświetlania	102
Ryc. 62.	Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny ZnPc w DMF po odpowiednim czasie naświetlania	102
Ryc. 63.	Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny TG-I-161 w DMF; pomiary przy $\lambda=736$ nm	104
Ryc. 64.	Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny TG-I-162 w DMF; pomiary przy $\lambda=733$ nm	104
Ryc. 65.	Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMF; pomiary przy $\lambda=738$ nm	105
Ryc. 66.	Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ subftalocyjaniny SubPc w DMF; pomiary przy $\lambda= 566$ nm	105
Ryc. 67.	Krzywe kinetyczne przedstawiające zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ subftalocyjaniny SubPc w DMSO; pomiary przy $\lambda= 569$ oraz 750 nm	106

Ryc. 68.	Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny ZnPc w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Soreta (A) oraz paśmie Q (B)	109
Ryc. 69.	Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny ZnPc w DMSO rejestrowana przy 675 nm (A) i 630 nm (B)	110
Ryc. 70.	Widma DADS oraz czasy zaniku wyznaczone dla ftalocyjaniny ZnPc po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm	110
Ryc. 71.	Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm A – krótkie opóźnienia B – długie opóźnienia	111
Ryc. 72.	Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-I-161 w DMSO A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q	112
Ryc. 73.	Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-I-162 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm A – krótkie opóźnienia B – długie opóźnienia	113
Ryc. 74.	Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-I-162 w DMSO A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q	114
Ryc. 75.	Widma absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 400 nm A – krótkie opóźnienia B – długie opóźnienia	115
Ryc. 76.	Kinetyka zmian absorpcji przejściowej ftalocyjaniny TG-TO-1 w DMSO A, B - wzbudzenie przy $\lambda=400$ nm C - porównanie wczesnej kinetyki przy $\lambda=650$ nm po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q	116
Ryc. 77.	Widma DADS oraz czasy zaniku uzyskane dla ftalocyjanin TG-I-161 , TG-I-162 oraz TG-TO-1 przy wzbudzeniu $\lambda=400$ nm	117
Ryc. 78.	Widma absorpcji przejściowej porfirazy TG-I-123 w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Q	118

Ryc. 79.	Widma DADS oraz czasy zaniku wyznaczone dla porfirazyny TG-I-123 po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 590 nm118
Ryc. 80.	Kinetyka zmian absorpcji przejściowej porfirazyny TG-I-123 odpowiadająca maksimum: A - wybielania przy $\lambda=600$ nm B - absorpcji ze stanu wzbudzonego przy $\lambda=687$ nm119
Ryc. 81.	Widma absorpcji przejściowej subftalocyjaniny SubPc w DMSO wykreślone po wzbudzeniu w paśmie Q120
Ryc. 82.	Zmiany absorpcji przy $\lambda=569$ nm (proces wybielania) oraz absorpcji ze stanu wzbudzonego (614 nm) dla subftalocyjaniny SubPc w DMSO.....120
Ryc. 83.	Reakcja oksydacji DPBF w obecności tlenu singletowego135

2. Wykaz tabel

Tabela 1.	Orientacja spinów elektronowych, czas półtrwania oraz energia poszczególnych form tlenu cząsteczkowego 21
Tabela 2.	Parametry chromatograficzne analizowanych związków TG-I-123 , TG-I-161 , TG-I-162 56
Tabela 3.	Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-I-161 w zależności od rozpuszczalnika oraz współczynniki refrakcji i momenty dipolowe rozpuszczalników61
Tabela 4.	Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-I-162 w zależności od rozpuszczalnika 63
Tabela 5.	Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q ftalocyjaniny TG-TO-1 w zależności od rozpuszczalnika 65
Tabela 6.	Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q porfirazyny TG-I-123 w zależności od rozpuszczalnika67
Tabela 7.	Położenie λ_{\max} pasma Soreta oraz składowych pasma Q subftalocyjaniny SubPc w zależności od rozpuszczalnika 69
Tabela 8.	Wartości molowych współczynników absorpcji badanych porfirynoidów wyznaczone w DMSO oraz DMF 71

Tabela 9.	Stężenia porfirynoidów wykorzystane do analizy zależności $A = f(c)$	72
Tabela 10.	Parametry zależności $A = f(c)$ badanych związków w DMSO i DMF oraz ocena statystyczna	79
Tabela 11.	Długość fali odpowiadająca maksimum widm emisji oraz wartości przesunięć Stokes'a badanych porfirynoidów	84
Tabela 12.	Wydajność kwantowa fluorescencji badanych porfirynoidów wyznaczona po wzbudzeniu w paśmie Soreta oraz Q	84
Tabela 13.	Parametry prostych opisujących zależność $\ln(A_0/A) = f(t)$ wyznaczone dla badanych związków w warunkach tlenowych i po odtlenowaniu oraz ocena statystyczna	94
Tabela 14.	Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez badane związki w roztworach DMSO oraz DMF; naświetlanie w warunkach tlenowych	95
Tabela 15.	Kinetyczne stałe szybkości fotodegradacji ftalocyjanin TG-I-161 , TG-I-162 , TG-TO-1 oraz subftalocyjaniny SubPc w DMF	106
Tabela 16.	Czasy zaniku (τ_1, τ_2, τ_3) wyznaczone dla ftalocyjanin metodą globalnej analizy danych z absorpcji przejściowej przy różnych długościach fali wzbudzenia	121
Tabela 17.	Radiacyjne stałe zaniku stanu wzbudzonego obliczone wg równania Stricklera-Berga	121
Tabela 18.	Przeżywalność komórek HSC-3 w obecności ftalocyjanin ZnPc oraz TG-I-161 bez dostępu światła	123
Tabela 19.	Przeżywalność komórek HSC-3 poddanych naświetlaniu w obecności ftalocyjaniny TG-I-161 oraz ZnPc (czas ekspozycji – 20 min)	125

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M.: *The History of Photodetection and Photodynamic Therapy*.
Photochem. Photobiol 74 (2001) 656-669
- [2] Ağırtaş M. S.: *Highly soluble phthalocyanines with hexadeca tert-butyl substituents*.
Dyes Pigments 79 (2008) 247-251
- [3] Akkurt B., Hamuryudan E.: *Enhancement of solubility via esterification: Synthesis and characterization of octakis (ester)-substituted phthalocyanines*.
Dyes Pigments 79 (2008) 153-158
- [4] Alexiades-Armenakas M.: *Laser - mediated photodynamic therapy*.
Clin. Dermatol. 24 (2006) 16-25
- [5] Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C. J. H., Sibata C. H.: *Photosensitizers in clinical PDT*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 1 (2004) 27-42
- [6] Allison R. R., Mota H. C., Sibata C. H.: *Clinical PD/PDT in North America: An historical review*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 1 (2004) 263-277
- [7] Allison R. R., Sibata C. H., Downie G. H., Cuenca R. E.: *A clinical review of PDT for cutaneous Malignancies*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 3 (2006) 214-226
- [8] Allison R. R., Sibata C. H.: *Photofrin® photodynamic therapy: 2.0 mg/kg or not 2.0 mg/kg that is the question*.
Photodiag. Photodyn. Ther. (2008) 5, 112-119
- [9] Allison R. R., Cuenca R., Downie G. H., Randall M. E., Bagnato V. S., Sibata C. H.: *PD/PDT for gynecological disease: A clinical review*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 2 (2005) 51-63
- [10] Allison R. R.: *Future PDT*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 6 (2009) 231 - 234
- [11] Arslan S., Yilmaz I.: *Synthesis, electrochemistry, and in situ spectroelectrochemistry of a new water-soluble zinc phthalocyanine substituted with naphthoxy-4-sulfonic acid sodium salt*.
Trans. Met. Chem. 32 (2007) 292-298
- [12] Atilla D., Saydan N., Durmuş M., Gürek A. G., Khan T, Rück A., Walt H., Nyokong T., Ahsen V.: *Synthesis and photodynamic potential of tetra- and octa-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines*.
J. Photochem. Photobiol. A 186 (2007) 298-307
- [13] Baier J., Fuß T., Pöllmann C., Wiesmann C., Pindl K., Engl R., Baumer D., Maier M., Landthaler M., Bäuml W.: *Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers*.
J. Photochem. Photobiol. B 87 (2007) 163-173
- [14] Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V.: *Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria*.
J. Photochem. Photobiol. B 85 (2006) 28-38
- [15] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*.
Wydawnictwo, PWN (2003)

- [16] Baskin J. S., Yu H.-Z., Zewail A. H.: *Ultrafast Dynamics of Porphyrins in the Condensed Phase: I. Free Base Tetraphenylporphyrin*. J. Phys. Chem. A 106 (2002) 9837-9844
- [17] Basova T. V., Jushina I. V., Gürek A. G., Atilla D., Ahsen V.: *The synthesis and characterization of Cu(II) phthalocyanine bearing peripheral monoazacrown ethers and a spectral investigation of its film forming character*. Dyes Pigments 80 (2009) 67-72
- [18] Baumler W., Abels C., Szeimies R. M.: *Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy in Dermatology*. Med. Laser Appl. 18 (2003) 47 - 56
- [19] Bayar S., Dinçer H.A., Gonca E.: *The synthesis of some phthalocyanines derived from bulky substituted phthalonitriles*. Dyes Pigments 80 (2009) 156-162
- [20] Bayo K., Mossoyan J. C., Ouedraogo G. V.: *Preparation and analysis by UV-Vis of zinc phthalocyanine complexes*. Spectrochim. Acta A 60 (2004) 653-657
- [21] Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M.-L., Guillemin F., Barberi-Heyob M.: *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*. Trends Biotechnol. 26 (2008) 612-621
- [22] Belfield K. D., Bondar M. V., Przhonska O. V.: *Singlet Oxygen Quantum Yield Determination for a Fluorene-Based Two-Photon Photosensitizer*. J. Fluoresc., 16 (2006) 111-117
- [23] Benjamin J. V., Lee S., Hammer N. D., Elseth K. M., Barrett A., Hoffman B.: *Developing a structure–function relationship for anionic porphyrazines exhibiting selective anti-tumor activity*. J. Photochem. Photobiol. B. 82 (2006) 180-186
- [24] Birks J. B.: *Photophysics of Aromatic Molecules*, 1st ed., Wiley Monographs in Chemical Physics, Wiley-Interscience, London, 1970
- [25] Blumankranz M. S., Woodburn K. W., Qing F., Verdooner S., Kessel D., Miller R.: *Lutetium Texaphyrin (Lu-Tex): A Potential New Agent for Ocular Fundus Angiography and Photodynamic Therapy*. Am. J. Ophthalmol. 129 (1999) 353-362
- [26] Bonnett R., Djelal B. D., Hamilton P. A., Martinem G., Wierrani F.: *Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study*. J. Photochem. Photobiol. B 53 (1999) 136-143
- [27] Bonnett R., Martínez G.: *Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy*. Tetrahedron 57 (2001) 9513-9547
- [28] Cahill M. T., Smith B. T., Fekrat S.: *Adverse Reaction Characterized by Chest Pain, Shortness of Breath, and Syncope Associated With Verteporfin (Visudyne)*. Am. J. Ophthalmol. 134 (2002) 281-282
- [29] Çamur M., Bulut M., Kandaz M., Güney O.: *Synthesis, characterization and fluorescence behavior of new fluorescent probe phthalocyanines bearing coumarin substituents*. Polyhedron 28 (2009) 233-238

- [30] Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M.: *Nanotechnological applications in medicine*.
Curr. Opin. Biotechnol. 18 (2007) 26-30
- [31] Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 1 (2004) 279-293
- [32] Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 2 (2005) 1-23
- [33] 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*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 2 (2005) 91-106
- [34] Chang C.-J., Cheng S. M. H., Nelson J. S.: *Microvascular effects of Photofrin®-induced photodynamic therapy*.
Photodiag. Photodyn. Ther. 4 (2007) 95-99
- [35] Chen J., Lovell J., Lo P., Stefflova K., Niedre M., Wilson B., Zheng G.:
A tumor mRNA triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotide hairpin control of singlet oxygen production.
Photochem. Photobiol. Sci. 7 (2008) 775-781
- [36] Chidawanyika W., Antunes E., Nyokong T.: *Synthesis and solvent effects on the photophysicochemical properties of novel cadmium phenoxy phthalocyanines*.
J. Photochem. Photobiol. A 195 (2008) 183-190
- [37] Cong F., Ning B., Ji Y., Wang X., Ke F., Liu Y., Cui X., Chen B.: *The facile synthesis and characterization of tetraimido-substituted zinc phthalocyanines*.
Dyes Pigments 77 (2008) 686-690
- [38] Cormick M. P., Rovera M., Durantini E. N.: *Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups*.
J. Photochem. Photobiol. A 194 (2008) 220-229
- [39] Cosimelli B., Roncucci G., Dei D., Fantetti L., Ferroni F., Ricci M., Spinelli D.: *Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines*.
Tetrahedron 59 (2003) 10025-10030
- [40] Cunderlíková B., Moan J., Sjaastad I.: *pH dependent uptake of porphyrin-type photosensitizers by solid tumor cells in vitro is not induced by modification of transmembrane potential*.
Cancer Lett. 222 (2005) 39-47
- [41] D'Souza F., Ito O.: *Photoinduced electron transfer in supramolecular systems of fullerenes functionalized with ligands capable of binding to zinc porphyrins and zinc phthalocyanines*.
Coord. Chem. Rev. 249 (2005) 1410-1422
- [42] DaCosta R. S., Wilson B. C., Marcon N. E.: *Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases*.
Best Pract. Res. Cl. Ga. 20 (2006) 41-57
- [43] de Oliveira C. A., Machado A. E. H., Pessine F. B. T.: *Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy*.
Chem. Phys. Lipids 133 (2005) 69-78

- [44] DeRosa M. C., Crutchley R. J.: *Photosensitized singlet oxygen and its applications*.
Coord. Chem. Rev. 233 (2002) 351-371
- [45] Díaz D. D., Bolink H. J., Cappelli L., Claessens C. G., Coronado E., Torres T.: *Subphthalocyanines as narrow band red-light emitting materials*.
Tetrahedron Lett. 48 (2007) 4657-4660
- [46] Drobizhev M., Karotki A., Kruk M., Krivokapic A., Anderson H. L., Rebane A.: *Photon energy upconversion in porphyrins: one-photon hot-band absorption versus two-photon absorption*.
Chem. Phys. Lett. 370 (2003) 690-699
- [47] Durmuş M., Ahsen V., Nyokong T.: *Photophysical and photochemical studies of long chain-substituted zinc phthalocyanines*.
J. Photochem. Photobiol. A 186 (2007) 323-329
- [48] Durmuş M., Nyokong T.: *Photophysicochemical and fluorescence quenching studies of benzyloxyphenoxy-substituted zinc phthalocyanines*.
Spectrochim. Acta A 69 (2008) 1170-1177
- [49] Durmuş M., Nyokong T.: *Synthesis and solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectral properties of substituted zinc phthalocyanines*.
Polyhedron 26 (2007) 2767-2776
- [50] Durmuş M., Nyokong T.: *The synthesis, fluorescence behaviour and singlet oxygen studies of new water-soluble cationic gallium(III) phthalocyanines*.
Inorg. Chem. Comm. 10 (2007) 332-338
- [51] Ericson M. B., Grapengiesser S., Gudmundson F., Wennberg A.-M., Larkö O., Moan J., Rosén A.: *A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution*.
Lasers Med. Sci. 18 (2003) 56-62
- [52] Fields R. D., Lancaster M. V.: *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*.
Am. Biotechnol. Lab. 11 (1993) 48-50
- [53] Fischer H. C., Chan W. C. W.: *Nanotoxicity: the growing need for in vivo study*.
Curr. Opin. Biotech. 18 (2007) 565-571
- [54] Fita P., Luzina E., Dziembowska T., Radzewicz C., Grabowska A.: *Chemistry, photophysics, and ultrafast kinetics of two structurally related Schiff bases containing the naphthalene or quinoline ring*.
J. Chem. Phys. 125 (2006) 184508
- [55] Fita P., Radzewicz C., Waluk J.: *Electronic and Vibrational Relaxation of Porphycene in Solution*.
J. Phys. Chem A 112 (2008) 10753-10757
- [56] Fotinos N., Campo M. A., Popowycz F., Gurny R., Lange N.: *5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives*.
Photochem. Photobiol. 82 (2006) 994-1015
- [57] Fuchs J., Thiele J.: *The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy*.
Free Radical Bio. Med. 24 (1998) 835-847
- [58] Fukuda T., Ishiguro T., Kobayashi N.: *Non-planar phthalocyanines with Q-bands beyond 800 nm*.
Tetrahedron Lett. 46 (2005) 2907-2909

- [59] Gao L., Qian X.,*, Li Zhang, Zhang Y.: *Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer.*
J. Photochem. Photobiol. B 65 (2001) 35-38
- [60] Gao L., Qian X.: *Absorption and fluorescence spectral properties of tetra (fluoroalkoxy) metallophthalocyanines.*
Dyes Pigments 51 (2001) 51-55
- [61] Gerber-Leszczyszyn H., Ziółkowski P.: *Terapia fotodynamiczna nowotworów głowy i szyi. Photodynamic Therapy of Head and Neck Cancer.*
Dent. Med. Probl. 40 (2003) 217-219
- [62] Glass B. D., Novak C. S., Brown M. E.: *The Thermal and Photostability of Solid Pharmaceuticals.*
J. Therm. Anal. Cal. 77 (2004) 1013-1036
- [63] Goślinski T., White A. J. P.: *Synthesis, characterization and spectroscopic properties of novel periphery – functionalized unsymmetrical porphyrazines containing mixed dithienylpyrrolyl and dimethylamino groups.*
Polyhedron 28 (2009) 2579-2584
- [64] Gupta A. K.: *Photodynamic therapy: an overview.*
J. Am. Acad. Dermatol. 50 (2004) 81-95
- [65] Halliwell B.: *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life.*
Plant Physiol. 141 (2006) 312-322
- [66] Hayase M., Woodbum K. W., Perlroth J., Miller R. A., Baumgardner W., Yocka P. G., Yeung A.: *Photoangioplasty with local motexafin lutetium delivery reduces macrophages in a rabbit post-balloon injury model.*
Cardiovasc. Res. 49 (2001) 449-455
- [67] Hong S.-B., Lee M.-H.: *Topical aminolevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris.*
Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 21 (2005) 322-325
- [68] Hopper C.: *Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer.*
Lancet Oncol. 1 (2000) 212-219
- [69] Howe L., Zhang J. Z.: *Ultrafast Studies of Excited-State Dynamics of Phthalocyanine and Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate in Solution.*
J. Phys. Chem. A 101 (1997) 3207-3213
- [70] Ichikawa K., Takeuchi Y., Yonezawa S., Hikita T., Kurohane K., Namba Y., Oku N.: *Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth.*
Cancer Lett. 205 (2004) 39-48
- [71] Iliev V., Mihaylova A., Bilyarska L.: *Photooxidation of phenols in aqueous solution, catalyzed by mononuclear and polynuclear metal phthalocyanine complexes.*
J. Mol. Catal. A-Chem. 184 (2002) 121-130
- [72] Ingrosso C., Petrella A., Curri M. L., Striccoli M., Cosma P., Cozzoli P. D., Agostiano A.: *Photoelectrochemical properties of hybrid junctions based on zinc phthalocyanine and semiconducting colloidal nanocrystals.*
Electrochim. Acta 51 (2006) 5120-5124
- [73] Jason J. H., Gannon M. K., Tomblin G., McCarty T. A., Page P. M., Bright F.V., Detty M. R.: *A cationic chalcogenoxanthylum photosensitizer effective in vitro in chemosensitive and multidrug-resistant cells.*
Bioorg. Med. Chem. 14 (2006) 8635-8643

- [74] Juzenas P., Chen W., Sun Y. P., Coelho M. A. N., Generalov R., Generalova N., Christensen I. L.: *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer*.
Adv. Drug Deliver. Rev. 60 (2008) 1600-1614
- [75] Kandaz M., Yarasir M. N., Koc A.: *Selective metal sensor phthalocyanines bearing non-peripheral functionalities: Synthesis, spectroscopy, electrochemistry and spectroelectrochemistry*.
Polyhedron 28 (2009) 257-262
- [76] Ke M. R., Huang J. D., Weng S. M.: *Comparison between non-peripherally and peripherally tetra-substituted zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers: Synthesis, spectroscopic, photochemical and photobiological properties*.
J. Photochem. Photobiol. A 201 (2009) 23-31
- [77] Keiichi S., Taku K., Ohno-Okumura E., Watanabe M., Cook M. J.: *Synthesis of novel cationic amphiphilic phthalocyanine derivatives for next generation photosensitizer using photodynamic therapy of cancer*.
Dyes Pigments 64 (2005) 63-71
- [78] Kemikli N., Ozturk R.: *Synthesis and characterization of phosphonic acid-substituted porphyrazines*.
Inorg. Chem. Comm. 11 (2008) 338-340
- [79] Kick G., Messer G., Plewig G.: *Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie*.
Hautarzt 47 (1996) 644-649
- [80] Kobayashi N.: *Dimers, trimers and oligomers of phthalocyanines and related compounds*.
Coord. Chem. Rev. 227 (2002) 129-152
- [81] Kobayashi N.: *Phthalocyanines*.
Curr. Opin. Solid St. M. 4 (1999) 345-353
- [82] Konopka K., Pretzer E., Felgner P. L., Düzgünes N.: *Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes*.
Biochim. Biophys. Acta 1312 (1996) 186-196
- [83] Kovalskaya N. E., Kuznetsova N. A., Kaliya O. L., Gretsova N. S., Sokolova I. V.: *Study of Spectral Properties of Zinc Phthalocyanines Used as Sensitizers in Photodynamic Therapy*.
Opt. Spectrosc. 89 (2000) 724-726
- [84] Kovalskaya N. E., Kuznetsova N. A., Kaliya O. L., Gretsova N. S., Sokolova I. V.: *The efficiency of the formation of singlet oxygen by a sensitizer based on zinc phthalocyanine*.
J. Appl. Spectros. 68 (2001) 287-290
- [85] Kuznetsova N. A., Gretsova N. S., Derkacheva V. M., Mikhalenko S. A., Solov'eva L. I., Yuzhakova O.A., Kaliya O. L., Luk'yanets E. A.: *Generation of Singlet Oxygen with Anionic Aluminum Phthalocyanines in Water*.
Russ. J. Gen. Chem. 72 (2002) 300-306
- [86] Łapok Ł., Claessens C. G., Wöhrle D., Torres T.: *Synthesis of water-soluble subphthalocyanines*.
Tetrahedron Lett. 50 (2009) 2041-2044
- [87] Lassalle H. P., Dumas D., Gräfe S., D'Hallewin M.-A., Guillemin F., Bezdetnaya L.: *Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC*.
J. Control. Release 134 (2009) 118-124

- [88] Law W. F., Liu R. C. W., Jiang J., Ng D. K. P.: *Synthesis and spectroscopic properties of octasubstituted (phthalocyaninato) titanium (IV) complexes*. Inorg. Chim. Acta 256 (1997) 147-150
- [89] Lide D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press LLC: Boca Raton 78 (1997)
- [90] Liu M. O., Tai C. H., Sain M. Z., Hu A. T., Chou F.-I.: *Photodynamic applications of phthalocyanines*. J. Photochem. Photobiol. A 165 (2004) 131-136
- [91] Lo P. C., Zhao B., Duan W., Fong W. P., Ko W. H., Ng D. K. P.: *Synthesis and in vitro photodynamic activity of mono-substituted amphiphilic zinc(II) phthalocyanines*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 1073-1077
- [92] Lokesh K. S., Uma N., Achar B. N.: *Synthesis and physicochemical characterization of metal free, sodium and potassium phthalocyanine complexes*. J. Non-Cryst. Solids 353 (2007) 384-389
- [93] Lorenz K. J., Maier H.: *Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan®) in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck: experience with 35 patients*. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 266 (2009) 1937-1944
- [94] Lu C., Song G., Lin J. M.: *Reactive oxygen species and their chemiluminescence - detection methods*. Trac-Trend Anal. Chem. 25 (2006) 985-995
- [95] Ma L., Bagdonas S., Moan J.: *The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX*. J. Photochem. Photobiol. B 60 (2001) 108-113
- [96] MacCormack M. A.: *Photodynamic Therapy*. Adv. Dermatol. 22 (2006) 219-258
- [97] Mang, T. S., Sullivan, M., Cooper M., Loree T., Rigual N.: *The use of photodynamic therapy using 630 nm laser light and porfimer sodium for the treatment of oral squamous cell carcinoma*. Photodiag. Photodyn. Ther. 3 (2006) 272-275
- [98] Mantareva V., Kussovski V., Angelov I., Borisova E., Avramov L., Schnurpfeil G., Wöhrle D.: *Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms*. Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 4829-4835
- [99] Masilela N., Idowu M., Nyokong T.: *Photophysical, photochemical and electrochemical properties of water soluble silicon, titanium and zinc phthalocyanines*. J. Photochem. Photobiol. A 201 (2009) 91-97
- [100] Maslyuk V. V., Aristov V. Y., Molodtsova O.V., Vyalikh D. V., Zhilin V. M., Ossipyany Y. A., Bredow T., Mertig I., Knupfer M.: *The electronic structure of cobalt phthalocyanine*. Appl. Phys. A (2009) 485-489
- [101] Matsumoto K., Horikoshi M., Rikimaru K., Enomoto S.: *A study of an in vitro model for invasion of oral squamous cell carcinoma*. J. Oral Pathol. Med. 18 (1989) 498-501

- [102] Mehmet K., Ozkaya A. R., Koca A., Salih B.: *Water and alcohol-soluble octakis-metalloporphyrazines bearing sulfanyl polyetherol substituents: Synthesis, spectroscopy and electrochemistry.* Dyes Pigments 74 (2007) 482-489
- [103] Mitton D., Ackroyd R.: *History of photodynamic therapy in Great Britain.* Photodiag. Photodyn. Ther 2 (2005) 239-246
- [104] Mitton D., Claydon P., Ackroyd R.: *Photodynamic therapy and photodiagnosis for Barrett's oesophagus and early oesophageal carcinoma.* Photodiag. Photodyn. Ther. 1 (2004) 319-334
- [105] Moan J., Ma L. W., Stokke T.: *Transfer of Protoporphyrin IX Between Cells.* Photochem. Photobiol. 76 (2002) 526-529
- [106] Molnár A., Džedić R., Svoboda A., Hála J.: *Singlet oxygen production by lipophilic photosensitizers in liposomes studied by time and spectral resolved phosphorescence.* J. Mol. Struct. (2007) 488-491
- [107] Murakami H., Nomura T., Nakashima N.: *Noncovalent porphyrin-functionalized single-walled carbon nanotubes in solution and the formation of porphyrin-nanotube nanocomposites.* Chem. Phys. Lett. 378 (2003) 481-485
- [108] Nie H., Barrett A. G. M., Hoffman B. M.: *Porphyrazinehexamines and Dinitroporphyrazines: Synthesis, Characterization, and Complementary Electrochemistry.* J. Org. Chem. 64 (1999) 6791-6796
- [109] Nishiyama N., Nakagishi Y., Morimoto Y., Lai P.-S., Miyazaki K., Urano K., Horie S., Kumagai M., Fukushima S., Cheng Y., Jang W.-D., Kikuchi M., Kataoka K.: *Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine.* J. Control. Release 133 (2009) 245-251
- [110] Nyman E. S., Hynninen P. H.: *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy.* J. Photochem. Photobiol. B 73 (2004) 1-28
- [111] O'Riordan K., Akilov O. E., Hasan T.: *The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections.* Photodiag. Photodyn. Ther. 2 (2005) 247-262
- [112] Oda K., Ogura S. I., Okura I.: *Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy.* J. Photochem. Photobiol. B 59 (2000) 20-25
- [113] Ogunsipe A., Durmus M., Atilla D., Gürek A. G., Ahsen V., Nyokong T.: *Synthesis, photophysical and photochemical studies on long chain zinc phthalocyanine derivatives.* Synthetic Met. 158 (2008) 839-847
- [114] Ogunsipe A., Maree D., Nyokong T.: *Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives.* J. Mol. Struct. 650 (2003) 131-140
- [115] Ogunsipe A., Nyokong T.: *Effects of substituents and solvents on the photochemical properties of zinc phthalocyanine complexes and their protonated derivatives.* J. Mol. Struct. 689 (2004) 89-97

- [116] Ogunsipe A., Nyokong T.: *Photophysical and photochemical studies of sulphonated non-transition metal phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media.*
J. Photochem. Photobiol. A 173 (2005) 211-220
- [117] Ohno-Okumura E., Sakamoto K., Kato T., Hatano T., Fukui K., Karatsu T., Kitamura A., Urano T.: *Synthesis of subphthalocyanine derivatives and their characterization.*
Dyes Pigments 53 (2002) 57-65
- [118] Owens J. W., Smith R., Robinson R., Robins M.: *Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines and benzochlorins.*
Inorg. Chim. Acta 279 (1998) 226-231
- [119] Paczona R., Temam S., Janot F., Marandas P., Luboinski B.: *Autofluorescence videoendoscopy for photodiagnosis of head and neck squamous cell carcinoma.*
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 260 (2003) 544-548
- [120] Palewska K., Sujka M., Uraśńska-Wójcik B., Sworakowski J., Lipiński J., Nešpůrek S., Rakušan J., Karásková M.:
Light-induced effects in sulfonated aluminum phthalocyanines – potential photosensitizers in the photodynamic therapy. Spectroscopic and kinetic study.
J. Photochem. Photobiol. A 197 (2008) 1-12
- [121] Pinthus J. H., Bogaards A., Weersink R., Wilson B. C., Trachtenberg J.: *Photodynamic Therapy for Urological Malignancies: Past to Current Approaches.*
J. Urology 175 (2006) 1201-1207
- [122] Postigo F., Mora F., De Madariaga M. A., Nonell S., Sagristá M. L.:
Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements.
Int. J. Pharm. 278 (2004) 239-254
- [123] Pucińska J., Podbielska H.: *Nanomateriały we wspomaganiu terapii fotodynamicznej. Nanomaterials for PDT applications.*
Acta Bio-Opt. Inf. Med. 15 (2009) 178-181
- [124] Qiu T., Xu X., Liu J., Qian X.: *Novel perfluoroalkyl phthalocyanine metal derivatives: Synthesis and photodynamic activities.*
Dyes Pigments 83 (2009) 127-133
- [125] Reddi E.: *Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumors.*
J. Photochem. Photobiol. B 37 (1997) 189-195
- [126] Rodrigues-Morgande M. S., Stuzhin P. A.: *The chemistry of porphyrazines: an overview.*
J. Porphyrins Phtalocyanines, 8 (2004) 1129-1165
- [127] 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.*
J. Photochem. Photobiol. B 39 (1997) 167-171
- [128] Sakamoto K., Ohno-Okumura E., Kato T., Watanabe M., Cook M. J.: *Investigation of zinc bis(1,4-didecylbenzo)-bis(2,3-pyrido) porphyrazine as an efficient photosensitizer by cyclic voltammetry.*
Dyes Pigments 78 (2008) 213-218

- [129] Sakellariou E. G., Montalban A. G., Meunier H. G., Ostler R. B., Rumbles G., Barrett A. G. M., Hoffman B. M.: *Synthesis and photophysical properties of peripherally metallated bis(dimethylamino)porphyrazines*. J. Photochem. Photobiol A 136 (2000) 185-187
- [130] Sakellariou E. G., Montalban A. G., Meunier H. G., Rumbles G., Phillips D., Ostler R. O., Suhling K., Barrett A. G. M., Hoffman B. M.: *Peripherally Metallated Secoporphyrazines: A New Generation of Photoactive Pigments*. Inorg. Chem. 41 (2002) 2182-2187
- [131] Salva K. A.: *Photodynamic Therapy: Unapproved Uses, Dosages, or Indications*. Clin. Dermatol. 20 (2002) 571-581
- [132] Salvati A., Ristori S., Pietrangeli D., Oberdisse J., Calamai L., Martini G., Ricciardi G.: *Insertion of a magnesium(II)-octacarboranyl(hexylsulfanyl) porphyrazine into liposomes: A physico-chemical study*. Biophys. Chem. 131 (2007) 43-51
- [133] Savolainen J., van der Linden D., Dijkhuizen N., Herek J. L.: *Characterizing the functional dynamics of zinc phthalocyanine from femtoseconds to nanoseconds*. J. Photochem. Photobiol. A 196 (2008) 99-105
- [134] Scalise I., Durantini E. N.: *Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of Escherichia coli using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives*. Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 3037-3045
- [135] Schmidt-Erfurth U., Hasan T.: *Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration*. Surv. Ophthalmol. 45 (2000) 195-214
- [136] Seotsanyana-Mokhosi I., Kuznetsova N., Nyokong T.: *Photochemical studies of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines*. J. Photochem. Photobiol. A 140 (2001) 215-222
- [137] Sesalan B. S., Koca A., Gül A.: *Water soluble novel phthalocyanines containing dodeca-amino groups*. Dyes Pigments 79 (2008) 259-264
- [138] Sessler J. L., Miller R. A.: *Texaphyrins New Drugs With Diverse Clinical Applications in Radiation and Photodynamic Therapy*. Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 733-739
- [139] Shen X., Lu W., Feng G., Yao Y., Chen W.: *Preparation and photoactivity of a novel water-soluble, polymerizable zinc phthalocyanine*. J. Mol. Catal. A-Chem. 298 (2009) 17-22
- [140] Sibata M. N., Tedesco A. C., Marchetti J. M.: *Photophysicals and photochemicals studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use*. Eur. J. Pharm. Sci. 23 (2004) 131-138
- [141] Sieroń A., Kawczyk-Krupka A., Adamek M., Cebula W., Zieleźnik, Niepsuj K., Niepsuj G., Pietrusa A., Szyguła M., Biniszkievicz T., Mazur S., Małyszek J., Romańczyk A., Ledwoń A., Frankiewicz A., Zyburza A., Koczy E., Birkner B.: *Photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) in dermatology: 'How we do it'*. Photodiag. Photodyn. Ther. 3 (2006) 132-133

- [142] Sieroń A., Kwiatek S.: *Twenty years of experience with PDD and PDT in Poland – Review.*
Photodiag. Photodyn. Ther. 6 (2009) 73-78
- [143] Spesia M. B., Durantini E. N.: *Synthesis and antibacterial photosensitizing properties of a novel tricationic subphthalocyanine derivative.*
Dyes Pigments 77 (2008) 229-237
- [144] Stewart F., Baas P., Star W.: *What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)?*
Radiother. Oncol. 48 (1998) 233-248
- [145] Strickler S. J., Berg R. A.: *Relationship Between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules.*
J. Chem. Phys. 37 (1962) 814
- [146] Stringer M., Moghissi K.: *Photodiagnosis and fluorescence imaging in clinical practice.*
Photodiag. Photodyn. Ther. 1 (2004) 9-12
- [147] Stylli S. S., Kaye A. H.: *Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review Part I – A biological basis.*
J. Clin. Neurosci. 13 (2006) 615-625
- [148] Stylli S. S., Kaye A. H.: *Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review Part II – Clinical studies.*
J. Clin. Neurosci. 13 (2006) 709-717
- [149] Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z., Waclawek W., Lis S.: *Spectral studies of zinc octacarboxyphthalocyanine aggregation.*
Dyes Pigments 80 (2009) 239-244
- [150] Tang J., Chen L., Sun J., Kangle L., Deng K.: *Synthesis and properties of iron(II) tetra(1,4-dithiin)porphyrazine bearing peripheral long-chain alkyl group of active end-bromine.*
Inorg. Chem. Comm. 13 (2010) 236-239
- [151] Tardivo J. P., Del Giglio A., de Oliveira C. S., Gabrielli D. S., Junqueira H. C., Tadab D. B., Severino D., de Fátima Turchiello R., Baptista M. S.: *Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications.*
Photodiag. Photodyn. Ther. 2 (2005) 175-191
- [152] Tatikolov A. S., Costa S. M. B.: *Photophysical and aggregation properties of a long-chain squarylium indocyanine dye.*
J. Photochem. Photobiol. A 140 (2001) 147-156
- [153] Tolbin A. Y., Breusova M. O., Pushkarev V. E., Tomilova L. G.: *Synthesis and spectroscopic properties of new boron subphthalocyanine complexes and a heteronuclear phthalocyanine complex.*
Russ. Chem. B+ 54 (2005) 2083-2086
- [154] Tønnesen H. H.: *Formulation and Stability of Photolabile Drugs.*
Int. J. Pharm. 225 (2001) 1-14
- [155] Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F. A.: *Photodynamic Therapy in Oncology.*
Oncologist 11 (2006) 1034-1044
- [156] Ulatowska-Jarża A., Zychowicz J., Hołowacz I., Bauer J., Razik J., Wieliczko A., Podbielska H., Müller G., Stręk W., Bindig U.: *Antimicrobial PDT with chlorophyll-derived photosensitizer and semiconductor laser.*
Med. Laser Appl. 21 (2006) 177-183

- [157] Venugopala Reddy K. R., Keshavayya J., Kumara Swamy B. E., Harish M. N. K., Mallikarjuna H. R., Sherigara B. S.: *Spectral and electrochemical investigation of octanitro substituted metal phthalocyanines*.
Dyes Pigments 80 (2009) 1-5
- [158] Viola G., Miolo G., Vedaldi D., Dall'Acqua F.: *In vitro studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine*.
Farmaco 55 (2000) 211-218
- [159] Vittar N. B. R., Prucca C. G., Strassert C., Awruch J., Rivarola V. A.: *Cellular inactivation and antitumor efficacy of a new zinc phthalocyanine with potential use in photodynamic therapy*.
Int. J. Biochem. Cell B. 40 (2008) 2192-2205
- [160] Waclawek W., Dyrda G.: *Redoksove przemiany oscylacyjne diftalocyjanin lantanowców pod wpływem protonodonorów i elektronoakceptorów*.
CDEM 11 (2006) 21-34
- [161] Wainwright M.: *Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals*.
Dyes Pigments 76 (2008) 582-589
- [162] Wei S., Zhou J., Huang D., Wang X., Zhang B., Shen J.: *Synthesis and Type I/Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine*.
Dyes Pigments 71 (2006) 61-67
- [163] Wierrani F., Kubin A., Günter Loew H., Henry M., Spängler B., Bodner K., Grünberger W., Ebermann R., Alth G.: *Photodynamic action of some sensitizers by photooxidation of luminol*.
Naturwissenschaften 89 (2002) 466-469
- [164] Wróbel D., Boguta A.: *Study of the influence of substituents on spectroscopic and photoelectric properties of zinc phthalocyanines*.
J. Photochem. Photobiol. A 150 (2002) 67-76
- [165] Yamamoto J., Yamamoto S., Hirano T.: *Monitoring of Singlet Oxygen Is Useful for Predicting the Photodynamic Effects in the Treatment for Experimental Glioma*.
Clin. Canc. Res. 12 (2006) 7132-7140
- [166] Yamasaki Y., Takaki K.: *Synthesis of m-oxo-bridged hetero-metal phthalocyanine dimer analogues and application for charge generating material in photoreceptor*.
Dyes Pigments 70 (2006) 105-109
- [167] Yang Y. J., Kan Y. H., Su Z. M., Zhao L.: *Theoretical study on stability and nonlinear optical properties of novel subphthalocyanine dimer and trimer*.
J. Mol. Struct.: THEOCHEM 725 (2005) 127-131
- [168] Yoshida T., Tokashiki R., Ito H., Shimizu A., Nakamura K., Hiramatsu H., Tsukahara K., Shimizu S., Takata D., Okamoto I., Suzuki M.: *Therapeutic effects of a new photosensitizer for photodynamic therapy of early head and neck cancer in relation to tissue concentration*.
Auris Nasus Larynx 35 (2008) 545-551
- [169] Yslas E. I., Durantini E. N., Rivarola V. A.: *Zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro*.
Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 4651-4660

- [170] Yslas E. I., Rivarolab V., Durantini E. N.: *Synthesis and photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media.* Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 39-46
- [171] Yu H. Z., Baskin J. S., Zewail A. H.: *Ultrafast Dynamics of Porphyrins in the Condensed Phase: II. Zinc Tetraphenylporphyrin.* J. Phys. Chem. A 106 (2002) 9845-9854
- [172] Zakharov A. V., Girichev G. V.: *Theoretical study of the structure, vibrational spectra, and electronic spectra of oxotitanium porphyrin, octamethylporphyrin, porphyrazine, and phthalocyanine complexes.* J. Mol. Struct.: THEOCHEM 851 (2008) 183-196
- [173] Zdravkovski D., Milletti M. C.: *A comparison of structural and electronic characteristics among subphthalocyanine and phthalocyanine complexes.* J. Mol. Struct.: THEOCHEM 717 (2005) 85-89
- [174] Zhang P., Steelant W., Kumar M., Scholfield M.: *Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation.* J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 4526-4527
- [175] Zhao L.: *Singlet Oxygen.* Free Radical and Radiation Biology Graduate Program, Department of Radiology, The University of Iowa 2001
- [176] Zheng G., Chen J., Stefflova K., Jarvi M., Li H., Wilson B.: *Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation.* PNAS 104 (2007) 8989-8994
- [177] Zieleźnik W., Sieroń A., Cebula W., Adamek M., Podwińska E.: *Terapia fotodynamiczna w gastroenterologii.* Gastroent. Pol. 6 (1999) 57-61
- [178] Zielińska K., Wilk K. A., Seweryn E., Pietkiewicz J., Saczko J.: *Studies on biocompatible nanocapsules formed in microemulsion templated processes.* Mater. Sci.-Poland 26 (2008) 443-450
- [179] Zimcik P., Miletin M., Novakova V., Kopecky K., Dvorakova Z.: *Tetrapyrazinoporphyrazines with different number of peripheral pyridyl rings: Synthesis, photophysical and photochemical properties.* Dyes Pigments 81 (2009) 35-39