

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej



Paulina Skupin-Mrugalska

**Fotochemiczna oraz fotodynamiczna aktywność
wybranych porfirynoidów o potencjalnym działaniu
przeciwnowotworowym inkorporowanych w nośniki
liposomowe**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek

Poznań 2014

Słowa kluczowe:

porfirynoidy, ftalocyjaniny, fotouczulacze, terapia fotodynamiczna, liposomy

Część pracy została wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „Koniugaty porfirazynowo-nitroimidazolowe jako fotosensybilizatory dla terapii fotofotodynamicznej”, nr N N401 067 238

Doktorantka była stypendystką w ramach projektu:

„Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, na lata 2011/2012 oraz 2012/2013

Praca została wykonana we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Microbiology Department, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, San Francisco, USA

Wybrane fragmenty materiału przedstawionego w części teoretycznej oraz część wyników badań uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej została opublikowana w czasopiśmie naukowych i przedstawiona podczas konferencji w formie prezentacji ustnych i plakatowych:

1. Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Gośliński T., Mielcarek J., Konopka K., Düzgüneş N., **Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers**; Drug Disc. Today, 18 (2013) 776-784, Impact Factor – 6,551, MNiSzW- 45
2. Zgłoszenie do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej nr P. 402263 (zgłoszenie 27.12.2012); Marcin Wierzchowski, Tomasz Gośliński, Wojciech Szczołko, Stanisław Sobiak, Paulina Skupin-Mrugalska, Marek Murias, Małgorzata Kucińska, Sebastian Lijewski, Mateusz Ściepura, Maciej Korpusiński, Jadwiga Mielcarek; **Morfolinowe oraz morfolinowo-nitroimidazolowe pochodne ftalocyjanin, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie.**
3. P. Skupin-Mrugalska, L. Sobotta, W. Szczołko, K. Konopka, E. Tykarska, M. Wierzchowski, J. Długaszewska, M. Kucinska, M. Murias, N. Düzgüneş; **Synthesis and development of the novel phthalocyanine derivatives possessing 2-(morpholin-4-yl) ethyloxy groups of potential applications in photodynamic therapy**; 15th JCF-Frühjahrssymposium, Berlin, 6-9 marca, 2013
4. Skupin P., Sobotta Ł., Szczołko W., Konopka K., Tykarska E., Wierzchowski M., Düzgüneş N., Goslinski T., Mielcarek J. **Development of novel phthalocyanines encapsulated in liposomes for photodynamic therapy of cancer**; Bioconnect 2013, Poznań 15-16 maja 2013, <http://ntpp.pl/bioconnect-2013/poster-session-2/>
5. P. Skupin-Mrugalska, K. Konopka, N. Düzgüneş, Ł. Sobotta, J. Mielcarek; **Preparation method and characteristics of lipid-based carriers for photosensitizing agents**; I Międzynarodowa Konferencja Oxygenalia „Tlen Pierwiastkiem Życia” - 26 października 2012, Poznań
6. Skupin P., Konopka K., Düzgüneş N., Sobotta Ł., Mielcarek J. **Liposomes as drug delivery system for photosensitizing agents in photodynamic therapy of oral cancers.** Bioconnect 2012, Poznań 15-16 maja 2012, <http://www.ntpp.pl/bioconnect-2012/presentations/>

*Pani Profesor **Jadwidze Mielcarek** za przekazaną wiedzę, opiekę naukową, liczne porady i konsultacje, mnóstwo poświęconego czasu, wyrozumiałość, motywowanie do podjęcia naukowej drogi rozwoju oraz cenną pomoc podczas realizacji pracy – serdecznie dziękuję.*

*Panu Profesorowi **Zenonowi Kokotowi** za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej – serdecznie dziękuję.*

*Pani Doktor **Hannie Jankowiak-Gracz** za umożliwienie łączenia pasji zawodowej z nauką, wspieranie rozwoju zawodowego, przekazaną wiedzę oraz motywowanie do zdobywania nowych doświadczeń i poszukiwania drogi rozwoju, składam serdeczne podziękowania.*

*Panu Doktorowi habilitowanemu **Tomaszowi Goślińskiemu** za przekazanie związków do badań, pomoc w realizacji pracy oraz umożliwienie odbycia stażu naukowego w Microbiology Department, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, San Francisco, USA, motywację i życzliwość – składam serdeczne podziękowania.*

*Panu Profesorowi **Nejat’owi Düzgüneş** serdecznie dziękuję za umożliwienie odbycia stażów naukowych w Microbiology Department, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, San Francisco, USA, przekazaną wiedzę w zakresie badań komórkowych i technologii liposomów oraz ogromną życzliwość.*

*Pani Profesor **Krystynie Konopce** za umożliwienie odbycia stażów naukowych w Microbiology Department, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, San Francisco, USA, przekazaną wiedzę w zakresie badań komórkowych i górskich wypraw, wsparcie, inspiracje oraz serdeczne dyskusje, z całego serca dziękuję.*

*Panu Doktorowi **Wojciechowi Szczętko** serdecznie dziękuję za udostępnienie związków, do badań.*

*Panu Magistrowi **Łukaszowi Sobotta** serdecznie dziękuję za przekazaną wiedzę, wsparcie, serdeczną i owocną współpracę.*

*Panu Magistrowi **Jarostawowi Piskorzowi** za sympatyczne towarzystwo i współpracę w ramach stażu naukowego w Microbiology Department, University of the Pacific, San Francisco, USA, dziękuję.*

*Pani **Barbarze Płowman** za przygotowanie próbek i wykonanie fotografii metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej – serdecznie dziękuję.*

***Marcinowi Mokierów-Czołowskiemu** składam serdeczne podziękowania za pomoc w przygotowaniu rycin do części teoretycznej.*

*Składam serdeczne podziękowania współpracownikom **Apteki Szpitala Klinicznego „Przemienienia Pańskiego” w Poznaniu**, kolegom **Senait Gebremedhim**, **Michałowi Kryjewskiemu**, **Michael’owi Yee**.*

*Pracę dedykuję
Rodzicom i Joannie*

Piotrowi
za miłość i wsparcie

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	4
I. WSTĘP	7
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
1. ODKRYCIE LIPOSOMÓW	14
2. RODZAJE LIPOSOMÓW	14
3. LIPIDY DO OTRZYMYWANIA LIPOSOMÓW	16
4. MECHANIZM POWSTAWANIA LIPOSOMÓW	17
4.1. LIPIDOWA DWUWARSTWA.....	17
4.2. FORMOWANIE LIPOSOMÓW.....	18
5. METODY OTRZYMYWANIA LIPOSOMÓW	19
5.1. METODY MECHANICZNE.....	19
5.2. METODY Z ZASTOSOWANIEM ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH.....	21
5.3. METODY Z ZASTOSOWANIEM DETERGENTÓW.....	22
5.4. MECHANIZMY WPROWADZANIA SUBSTANCJI LECZNICZYCH W STRUKTURĘ LIPOSOMU.....	23
6. PARAMETRY CHARAKTERYZUJĄCE LIPOSOMY	24
6.1. SKŁAD LIPOSOMÓW.....	24
6.2. WIELKOŚĆ ŚREDNICY I TYP LIPOSOMÓW.....	25
6.3. PŁYNNOŚĆ BŁONY LIPOSOMALNEJ.....	25
6.4. ŁADUNEK POWIERZCHNI LIPOSOMU.....	26
6.5. POTENCJAŁ ZETA.....	26
7. RODZAJE TERAPEUTYCZNYCH LIPOSOMÓW	27
7.1. KLASYCZNE LIPOSOMY.....	28
7.2. LIPOSOMY DŁUGOKRĄŻACE (ANG. LONG-CIRCULATING LIPOSOMES).....	28
7.3. LIPOSOMY DO TERAPII CELOWANEJ.....	30
8. DROGI PODANIA SUBSTANCJI LECZNICZYCH INKORPOROWANYCH W LIPOSOMY	34
8.1. DROGA DOUSTNA.....	34
8.2. WZIEWNA DROGA PODANIA.....	35
8.3. LIPOSOMALNE POSTACI LEKÓW DO UŻYTKU ZEWNĘTRZNEGO.....	35
8.4. DROGI PODANIA LIPOSOMALNYCH FOTOU CZULACZY.....	36
9. ZASTOSOWANIE LIPOSOMALNYCH POSTACI LEKÓW W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ	37
10. LIPOSOMALNE FOTOU CZULACZE STOSOWANE W PDT	40
10.1. LIPOSOMALNE POCHODNE PORFIRYN.....	41
10.2. LIPOSOMALNE POCHODNE BAKTERIOCHLORYN I CHLORYN.....	44
10.2.1. Liposomalne postaci temoporfinu.....	44
10.2.2. Visudyne – pierwsza liposomalna postać fotouczulacza w praktyce klinicznej.....	48
10.3. LIPOSOMALNE POCHODNE FTALOCYJANINY.....	51
III. CEL I ZAKRES PRACY	54
IV. APARATURA I MATERIAŁ DO BADAŃ	57
1. APARATURA	57
2. ODCZYNNIKI	58
3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	60
4. SUBSTANCJE DO BADAŃ	60

V. METODYKA I WYNIKI BADAŃ	63
1. OCENA CZYSTOŚCI CHEMICZNEJ FTALOCYJANIN	63
1.1. METODYKA BADANIA CZYSTOŚCI CHEMICZNEJ	63
1.2. OCENA CZYSTOŚCI FTALOCYJANINY PC1	64
1.2.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1	64
1.2.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem układów I-III	65
1.3. OCENA CZYSTOŚCI FTALOCYJANINY PC2	68
1.3.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2	68
1.3.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2 z zastosowaniem układów I-III	69
1.4. OCENA CZYSTOŚCI FTALOCYJANINY PC3	72
1.4.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3	72
1.4.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3 z zastosowaniem układów I-III	73
2. WYZNACZENIE MOLOWYCH WSPÓŁCZYNNIKÓW ABSORPCJI	76
2.1. METODYKA WYZNACZANIA MOLOWYCH WSPÓŁCZYNNIKÓW ABSORPCJI	76
2.2. MOLOWE WSPÓŁCZYNNIKI ABSORPCJI FTALOCYJANINY PC1	77
2.3. MOLOWE WSPÓŁCZYNNIKI ABSORPCJI FTALOCYJANINY PC2	78
2.4. MOLOWE WSPÓŁCZYNNIKI ABSORPCJI FTALOCYJANINY PC3	79
2.5. MOLOWE WSPÓŁCZYNNIKI ABSORPCJI FTALOCYJANINY PC4	80
3. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKÓW NA ELEKTRONOWE WIDMA ABSORPCJI FTALOCYJANIN PC1-4	81
3.1. METODYKA BADANIA	81
3.2. ANALIZA ODDZIAŁYWAŃ FTALOCYJANIN PC1-4 Z ROZPUSZCZALNIKAMI	91
3.2.1. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc1 z rozpuszczalnikami	92
3.2.2. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc2 z rozpuszczalnikami	93
3.2.3. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc3 z rozpuszczalnikami	94
3.2.4. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc4 z rozpuszczalnikami	95
4. OCENA AGREGACJI	96
4.1. OCENA AGREGACJI FTALOCYJANINY PC1	96
4.2. OCENA AGREGACJI FTALOCYJANINY PC2	103
4.3. OCENA AGREGACJI FTALOCYJANINY PC3	110
4.4. OCENA AGREGACJI FTALOCYJANINY PC4	117
5. WŁAŚCIWOŚCI EMISYJNE FTALOCYJANIN PC1-4	121
5.1. WIDMA FLUORESCENCJI FTALOCYJANIN PC1-4	121
5.1.1. Widma emisji ftalocyjaniny Pc1	122
5.1.2. Widma emisji ftalocyjaniny Pc2	123
5.1.3. Widma emisji ftalocyjaniny Pc3	124
5.1.4. Widma emisji ftalocyjaniny Pc4	125
5.2. WYZNACZENIE WYDAJNOŚCI KWANTOWEJ FLUORESCENCJI FTALOCYJANIN PC1-4	126
6. OCENA ZDOLNOŚCI GENEROWANIA TLENU SINGLETOWEGO	127
6.1. METODYKA I WARUNKI BADANIA ZDOLNOŚCI GENEROWANIA TLENU SINGLETOWEGO (1O_2) PRZEZ FTALOCYJANINY PC1-4	127
6.2. GENEROWANIE TLENU SINGLETOWEGO PRZEZ FTALOCYJANINĘ PC1	129
6.2.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 generowanego przez Pc1	129
6.2.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc1	130
6.3. GENEROWANIE TLENU SINGLETOWEGO PRZEZ FTALOCYJANINĘ PC2	132
6.3.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 generowanego przez Pc2	132
6.3.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc2	133
6.4. GENEROWANIE TLENU SINGLETOWEGO PRZEZ FTALOCYJANINĘ PC3	135
6.4.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 generowanego przez Pc3	135
6.4.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc3	136
6.5. GENEROWANIE TLENU SINGLETOWEGO PRZEZ FTALOCYJANINĘ PC4	138

6.5.1.	Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem $^1\text{O}_2$ generowanego przez Pc4 .	138
6.5.2.	Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc4.....	139
6.6.	WYZNACZENIE WYDAJNOŚCI KWANTOWEJ GENEROWANIA TLENU SINGLETOWEGO PRZEZ FTALOCYJANINY PC1-4.....	141
7.	ANALIZA FOTOTRWAŁOŚCI FTALOCYJANIN PC1-4	142
7.1.	METODYKA I WARUNKI FOTODEGRADACJI FTALOCYJANIN PC1-4 W FAZIE CIEKŁEJ	142
7.2.	ROZKŁAD FOTOCHEMICZNY I WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH FOTODEGRADACJI FTALOCYJANINY PC1 W ROZTWORZE DMSO I DMF	143
7.3.	ROZKŁAD FOTOCHEMICZNY I WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH FOTODEGRADACJI FTALOCYJANINY PC2 W ROZTWORZE DMSO I DMF	146
7.4.	ROZKŁAD FOTOCHEMICZNY I WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH FOTODEGRADACJI FTALOCYJANINY PC3 W ROZTWORZE DMSO I DMF	149
7.5.	ROZKŁAD FOTOCHEMICZNY I WYZNACZENIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH FOTODEGRADACJI FTALOCYJANINY PC4 W ROZTWORZE DMSO I H ₂ O.....	152
8.	OTRZYMYWANIE I CHARAKTERYSTYKA LIPOSOMÓW Z INKORPOROWANYMI FTALOCYJANINAMI PC1-4.....	155
9.	BADANIE AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ – OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ	157
9.1.	PRZYGOTOWANIE HODOWLI KOMÓRKOWEJ.....	157
9.2.	PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW FTALOCYJANIN PC1-4	158
9.3.	OCENA PRZEŻYWAŁNOŚCI KOMÓREK.....	158
9.4.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI CIEMNEJ.....	159
9.5.	BADANIE TOKSYCZNOŚCI JASNEJ.....	160
9.6.	INTERNALIZACJA KOMÓRKOWA	162
9.7.	WIZUALIZACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWA.....	163
9.8.	ANALIZA STATYSTYCZNA.....	163
VI.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	164
VII.	WNIOSKI	186
VIII.	STRESZCZENIE.....	188
IX.	ABSTRACT	190
X.	WYKAZ RYCIN	192
XI.	WYKAZ TABEL.....	200
XII.	PIŚMIENNICTWO.....	203
	ZAŁĄCZNIK NR 1	213
	ZAŁĄCZNIK NR 2	214

WYKAZ SKRÓTÓW

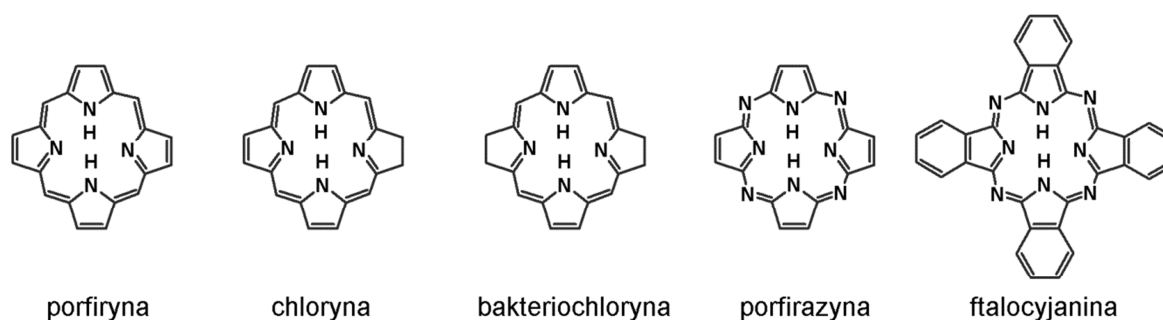
ALA	-	kwasy 5-aminolewulinowy
AMD	-	zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (ang. <i>Age-related Macular Degeneration</i>)
APRPG	-	pentapeptyd Ala-Pro-Arg-Pro-Gly
BCA	-	bakteriochloryna a
BPD-MA	-	monokwasy pochodnych benzoporfiryny (ang. <i>Benzoporphyrin Derivative MonoAcids</i>)
BPF	-	dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek (ang. <i>Bilayered Phospholipid Flake</i>)
chol	-	cholesterol
CMC	-	krytyczne stężenie micelarne (ang. <i>Critical Micelle Concentration</i>)
CT	-	ang. <i>Charge Transfer</i>
CV	-	przeżywalność komórek (ang. <i>Cell Viability</i>)
DDS	-	systemy transportujące leki (ang. <i>Drug Delivery System</i>)
DMA	-	N,N-dimetyloacetamid
DME	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose
DME F12	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose/Ham's F-12
DMF	-	N,N-dimetyloformamid
DMPC	-	1,2-dimirystoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholina
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DNA	-	kwasy deoksyrybonukleinowy (ang. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
DOTAP	-	chlorek N-[1-(2,3-dioleiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy
DPBF	-	1,3-difenyloizobenzofuran
DPBS	-	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline bez wapnia i magnezu
DPPC	-	1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholina
DPPG	-	1,2-dipalimitoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoglicerol
DS	-	systemy transportujące (ang. <i>Delivery System</i>)
DSPC	-	1,2-distearoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholina
EMA	-	Europejska Agencja ds. Leków (ang. <i>European Medicines Agency</i>)
EPR	-	efekt zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych cząstek (ang. <i>Enhanced vascular Permeability and Retention</i>)
FBS	-	plądowa surowica bydłęca inaktywowana ciepłem (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	-	Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
HEPES	-	kwasy 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy
HER2	-	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (ang. <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
HexSiPc	-	bis(tri- <i>n</i> -heksylosiloksy)krzem (IV) ftalocyjanina

HOMO	-	najwyższy zajęty orbital molekularny (ang. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HPD	-	poходne hematoporfiryny
HPLC	-	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSCC	-	ludzkie komórki raka kolczystokomórkowego (ang. <i>Human Squamous Cell Carcinoma</i>)
IC	-	stężenie hamujące (ang. <i>Inhibitory Concentration</i>)
LDL	-	lipoproteina niskiej gęstości (ang. <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LHRH	-	hormon uwalniający hormon luteinizujący
LMCT	-	przejścia elektronów od ligandów do kationów metali (ang. <i>Ligand to Metal Charge Transfer</i>)
LUMO	-	najniższy wolny orbital molekularny (ang. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
LUV	-	duże jednolamelarne liposomy (ang. <i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
MLCT	-	przejście elektronów od kationów metali do ligandów (ang. <i>Metal to Ligand Charge Transfer</i>)
MLV	-	wielkie wielolamelarne liposomy (ang. <i>Multilamellar Large Vesicles</i>)
MPS	-	układ fagocytarny (ang. <i>Mononuclear Phagocyte System</i>)
mTHPC	-	5,10,15,20-tetrakis(3'-hydroksyfenylo)-chloryna (Temoporfin)
MUC1	-	mucyna 1 (glikoproteina)
MVV	-	liposomy wielopęcherzykowe (ang. <i>MultiVesicular Vesicles</i>)
NMR	-	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
ONPG	-	o-nitrofenylo- β ,D-galaktopiranozyd
OOPS	-	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoseryna
PACT	-	fotodynamiczna terapia przeciwdrobnoustrojowa (ang. <i>PhotoDynamic Antimicrobial Therapy</i>)
PBS	-	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PDD	-	diagnostyka fotodynamiczna (ang. <i>PhotoDynamic Diagnosis</i>)
PDI	-	indeks polidispersyjności (ang. <i>Polydispersity Index</i>)
PDT	-	terapia fotodynamiczna (ang. <i>PhotoDynamic Therapy</i>)
PEG	-	polietylenoglikol
PegLip	-	pegylowane liposomy
PG	-	L- α -fosfatydylo-DL glicerol
POPC	-	1-palmitoilo-2-oleoilo- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholina
PP	-	protoporfiryna
pTHPP	-	5,10,15,20-tetrakis(4'-hydroksyfenylo)porfiryna
RFT	-	reaktywne formy tlenu
RNA	-	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>RiboNucleic Acid</i>)
RP	-	odwrócony układ faz (ang. <i>reverse phase</i>)

SUV	-	małe jednolamelarne liposomy (ang. <i>Small Unilamellar Vesicles</i>)
Tf	-	transferyna
Tc	-	temperatura przejścia fazowego
THF	-	tetrahydrofuran
UCSF	-	<i>University of California San Francisco</i>
UDL	-	liposomy odkształcalne (ang. <i>Ultradeformable Liposomes</i>)
USP	-	Farmakopea Amerykańska (ang. <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-Vis	-	spektroskopia w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego
ZnPc	-	ftalocyjanina cynkowa

I. WSTĘP

Porfirynoidy obejmują grupę związków makrocyclicznych, których podstawową strukturę stanowi cząsteczka porfiryny, zbudowana z czterech pierścieni pirolu połączonych mostkami metinowymi (Ryc. 1). Ftalocyjaniny i porfirazyny, należące do tetraazaporfiryn, to syntetyczne analogi porfiryn, w których elementem łączącym cztery pierścienie, odpowiednio izoindolu i pirolu, są mostki azometinowe. Połączone pierścienie tworzą układ sprzężonych wiązań podwójnych zawierających zdelokalizowane elektrony π [1–3].

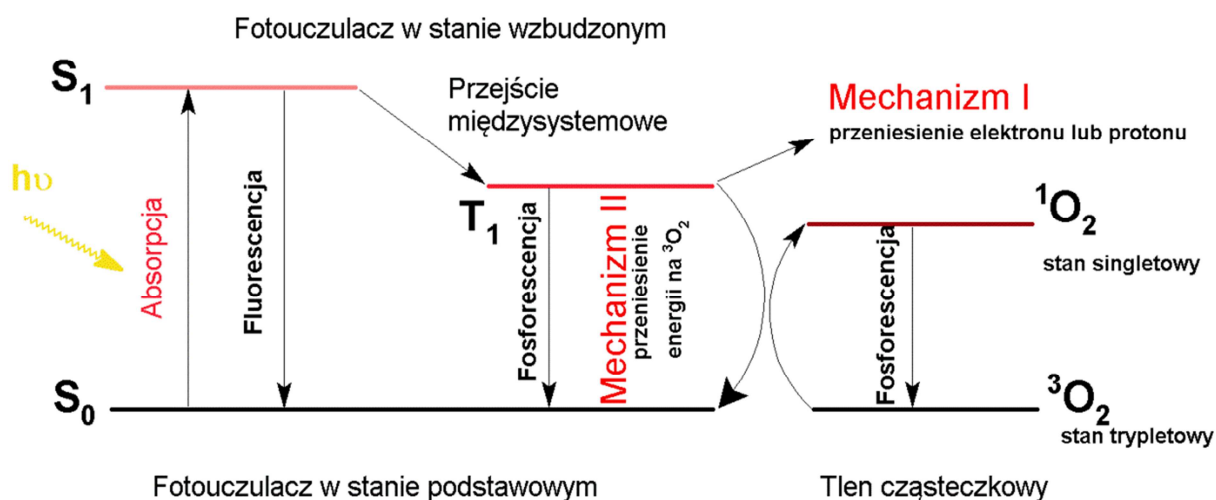


Ryc. 1 Podstawowe struktury związków porfirynoidowych.

Porfirynoidy posiadają zdolność tworzenia kompleksów z jonami, w których, struktura pierścieniowa pełni rolę ligandu. Właściwości koordynacyjne oraz charakterystyczny układ sprzężonych wiązań podwójnych, determinuje właściwości tych związków. Kompleksy porfirynoidów z jonami żelaza i magnezu, pełnią wiele istotnych funkcji w przyrodzie, które wynikają ze zdolności cyklicznego polienu do uczestniczenia w procesach oksydacyjno-redukcyjnych. Hemoproteiny, białka zawierające hem, uczestniczą w transporcie i magazynowaniu tlenu (hemoglobina, mioglobina), „przenoszeniu” elektronów w łańcuchu oddechowym (cytochrom c), metabolizmie ksenobiotyków (cytochrom P450). Równie istotną rolę w przyrodzie odgrywają zredukowane pochodne porfiryny tj. chloryny i bakteriochloryny, które są głównym składnikiem aparatu fotosyntetycznego roślin i bakterii (chlorofil, bakteriochlorofil). Porfirynoidy posiadają ponadto unikatowe właściwości spektroskopowe, luminescencyjne (fluorescencja i fosforescencja), magnetyczne (para- i diamagnetyzm), a ponadto niektóre związki wykazują trwałość termiczną, zdolność fotoprzewodnictwa i fotoemisji. Powyższe cechy sprawiają, że porfirynoidy, od kilkudziesięciu już lat, są przedmiotem zainteresowania naukowców i znajdują liczne zastosowania technologiczne. Badania struktury i fizykochemicznych właściwości porfirynoidów występujących w przyrodzie,

zainicjowały syntezę wielu różnorodnych pochodnych. Otrzymywane kompleksy porfirynoidów z metalami wykorzystywane są do produkcji barwników, półprzewodników, katalizatorów, odczynników analitycznych (np. stosowanych do spektrofotometrycznego oznaczania metali), nośników pamięci. Są także intensywnie badane w medycynie, jako potencjalne substancje aktywne wykorzystywane w terapii fotodynamicznej (PDT) [2].

Agencja amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia, National Cancer Institute, definiuje PDT jako metodę leczenia chorób nowotworowych, wykorzystującą substancję leczniczą, określaną terminem „fotouczulacz” oraz promieniowanie o ściśle określonej energii. PDT stanowi alternatywę dla konwencjonalnych metod leczenia nowotworów, tj. radio-, chemio-, hormonoterapii, ale może także być stosowana jako terapia uzupełniająca [4]. Należy szczególnie podkreślić, że PDT wyróżnia odmienny fizykochemiczny mechanizm działania, który opiera się na jednoczesnym oddziaływaniu trzech elementów, tj. fotouczulacza, tlenu cząsteczkowego i promieniowania. W oddziaływaniu tym, istotną rolę odgrywają przejścia elektronowe pomiędzy różnymi stanami energetycznymi cząsteczki fotouczulacza [5,6].



Ryc. 2 Diagram Jabłońskiego obrazujący przejścia elektronowe we wzbudzonej cząsteczce fotouczulacza (opis w tekście).

Fizykochemiczny mechanizm działania fotouczulacza przedstawiono wykorzystując diagram Jabłońskiego, który opisuje zmiany elektronowe we wzbudzonej cząsteczce (Ryc. 2). Aktywacja fotouczulacza następuje w wyniku absorpcji promieniowania, co prowadzi do wzbudzenia cząsteczki z singletowego stanu podstawowego S_0 do singletowego stanu wzbudzonego S_1 . Ponieważ stan S_1 charakteryzuje się wyższą energią niż stan S_0 , jest nietrwały i traci energię w wyniku emisji promieniowania lub przejścia

międzysystemowego do trypletowego stanu T_1 . Zdolność fotouczulaczy do generowania stanu T_1 , charakteryzującego się nieco większą stabilnością niż S_1 , determinuje ich właściwości fotodynamiczne, warunkujące uzyskanie efektu terapeutycznego w PDT. Fotouczulacz w trypletowym stanie wzbudzonym, aktywnie uczestniczy w procesach fotodynamicznych o mechanizmie typu I i II. W mechanizmie I, następuje przeniesienie elektronu lub protonu z wzbudzonego fotouczulacza T_1 na związki organiczne, znajdujące się w bezpośrednim otoczeniu, np. biomolekuły (lipidy, białka, kwasy nukleinowe). Powstałe rodniki mogą przekazywać energię na cząsteczkę tlenu. W efekcie powstają reaktywne formy tlenu (RFT), m.in. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodoronadtlenkowy, rodnik hydroksyloxy, które niszczą tkankę nowotworową. W mechanizmie II, wzbudzony fotouczulacz w stanie T_1 reaguje bezpośrednio z cząsteczką tlenu. W wyniku tego powstaje bardzo reaktywny utleniacz, tj. tlen singletowy, charakteryzujący się stosunkowo długim czasem życia. Powszechnie uznano, że dominującą rolę w terapii fotodynamicznej odgrywa mechanizm typu II. Czas życia tlenu singletowego jest bardzo krótki i wynosi ok. 10-320 nanosekund, dlatego wykazuje ograniczoną zdolność dyfuzji w komórce na odległość zaledwie 10-55 nm, od miejsca wytworzenia [7,8]. Uszkodzenie struktur komórkowych przez reaktywne formy tlenu, z tlenem singletowym na czele, indukuje szlaki biochemiczne prowadzące do śmierci komórek nowotworowych w drodze apoptozy, nekrozy i/lub autofagii. Podczas badania mechanizmu działania wielu fotouczulaczy stwierdzono, że za destrukcję tkanki nowotworowej odpowiedzialny jest także proces uszkodzania neowaskularnych naczyń krwionośnych, który wynika z działania antyangiogennego, oraz indukowanie miejscowej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej [8,9].

Procedura PDT obejmuje (i) podanie fotouczulacza drogą dożylną w postaci iniekcji lub miejscowo np. w formie opatrunku okluzyjnego, (ii) proces akumulacji fotouczulacza w tkance docelowej (np. nowotworowej), (iii) selektywne naświetlenie tkanki nowotworowej, promieniowaniem o ściśle zdefiniowanej długości fali z wykorzystaniem światła laserowego lub sondy światłowodowej [8]. Większość badań dotyczących klinicznego zastosowania PDT poświęcona jest terapii różnego typu nowotworów [10], schorzeń dermatologicznych (łuszczyca, trądzik, rogowacenie słoneczne) [11], okulistycznych jak np. zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (AMD, ang. age-related macular degeneration) [12].

Właściwości fluorescencyjne niektórych fotouczulaczy są wykorzystywane w diagnostyce fotodynamicznej (PDD), do obrazowania i wykrywania zmian patologicznych [13,14].

W badaniach przedklinicznych oceniana jest skuteczność fotouczulaczy w zwalczaniu chorób o etiologii bakteryjnej, wirusowej, grzybiczej i pasożytniczej, co określa się terminem fotodynamicznej terapii przeciwdrobnoustrojowej (PACT) [15]. Intensywny rozwój PDT, prowadzi do poszukiwania nowych kierunków terapeutycznych, m.in. poznanie fizjologicznych następstw terapii fotodynamicznej, związanych z indukcją odpowiedzi immunologicznej, zapoczątkowało szereg badań poświęconych immuno-PDT [16,17]. Duże nadzieje wiąże się także z zastosowaniem PDT do ablacji naczyń krwionośnych, w kardiochirurgii i chirurgii naczyń [18].

Tak duże zainteresowanie PDT wynika zarówno ze specyficznego, fotodynamicznego mechanizmu działania, jak również wielu zalet tej metody. Wśród korzystnych cech PDT wymienić należy: minimalną toksyczność względem zdrowych tkanek, brak mechanizmu oporności lekowej, możliwość zachowania zdrowych tkanek i organów oraz dobre efekty kosmetyczne. W praktyce klinicznej, szczególnie podkreśla się wysoką skuteczność PDT we wczesnych stadiach choroby np. nowotworowej, przy jednoczesnym braku istotnych działań niepożądanych, w porównaniu do chemio- i/lub radioterapii oraz możliwość leczenia ambulatoryjnego. Ponadto PDT istotnie wpływa na jakość życia pacjentów z nowotworami nieoperacyjnymi, w okresie leczenia paliatywnego [8,19]. Powyższa charakterystyka sprawiła, że PDT stanowi obiecującą i alternatywną metodę leczenia, a dalszy postęp w tej dziedzinie uwarunkowany jest technologicznym udoskonalaniem technik, źródeł i dozymetrii promieniowania oraz poszukiwaniem nowych związków fotouczulających [10,20].

Fotouczulacze wykorzystywane w PDT to związki pochodzenia naturalnego (np. pochodne porfiryny, hiperycyny), ale przede wszystkim uzyskiwane syntetycznie pochodne porfiryroidowe [1,3]. Porfimer sodu (Photofrin) był pierwszym fotouczulaczem zarejestrowanym w latach pięćdziesiątych XX wieku w Kanadzie, Japonii i USA w terapii pęcherza moczowego, nowotworach przełyku i niedrobnokomórkowego raka płuc [20]. Fotouczulacze pierwszej generacji, do których należy Photofrin będący mieszaniną oligomerów i dimerów, charakteryzowały się niejednorodnym i nie w pełni zdefiniowanym składem chemicznym. Ponadto fotosensybilizatory tego rodzaju wykazują wiele działań ubocznych, w tym długotrwałą fototoksyczność, oraz absorbują promieniowanie o krótszych długościach fali, tj. 400-500 nm, a tym samym posiadają słabszą zdolność przenikania w głąb tkanek [21,22]. Dlatego też sformułowano cechy idealnego fotouczulacza oraz zintensyfikowano badania mające na celu otrzymanie związków spełniających większość z określonych kryteriów takich, jak: (i) potwierdzona

struktura chemiczna, (ii) wysoki stopień czystości, (iii) silna absorpcja promieniowania w zakresie 650-800 nm (tzw. okno terapeutyczne), (iv) efektywna zdolność generowania tlenu singletowego, (v) rozpuszczalność w środowisku polarnym, (vi) brak tendencji do agregacji, (vii) optymalne parametry farmakokinetyczne, szybka eliminacja (viii) selektywny wychwyty fotouczulacza przez tkankę docelową, (ix) brak działania mutagennego i karcinogennego oraz „tzw. toksyczności ciemnej”, (x) niska cena, prosta i efektywna synteza, możliwość przystosowania syntezy do celów przemysłowych [22].

Główne kierunki działań podejmowane w celu uzyskania „idealnego fotouczulacza” polegają na (i) poszukiwaniu endogennych fotouczulaczy i projektowaniu nowych związków (ii) modyfikacji peryferyjnej i nieperyferyjnej struktury chemicznej znanych fotouczulaczy, np. poprzez wprowadzanie podstawników alkoksylowych, arylowych, karboksylowych, tiolowych, zawierających grupy aminowe itp. [23,24] (iii) tworzeniu połączeń fotouczulaczy z różnorodnymi systemami transportującymi (DS, ang. delivery system), np. liposomami, przeciwciałami monoklonalnymi, kropkami kwantowymi, cyklodekstrynami [25]. W efekcie uzyskano fotouczulacze drugiej generacji, a niektóre z nich znalazły się w badaniach klinicznych, np. Tookad, Lutrin, Purlytin, oraz uzyskały rejestrację Agencji ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) w USA i Europejskiej Agencji ds. Leków (ang. European Medicines Agency, EMA), jak np. kwas aminolewulinowy i jego estry oraz temoporfin (Foscan) [21,26]. Przykładem fotouczulacza trzeciej generacji w postaci liposomalnej jest verteporfin, który pod nazwą Visudyne stosowany jest z powodzeniem w leczeniu AMD [12]. Terapeutyczny sukces Visudyne oraz korzyści jakie przyniosło zastosowanie liposomów do transportu hydrofobowych porfirynoidów, zaowocowało gwałtownym wzrostem badań. Wśród głównych zalet liposomów jako nośników fotouczulaczy, jak też innych substancji leczniczych, należy wymienić amfifilową budowę nośnika, biokompatybilność, biodegradowalność oraz brak działania toksycznego i niską immunogenność. Łańcuchy kwasów tłuszczowych fosfolipidów budujących strukturę liposomu, stanowią doskonałe hydrofobowe środowisko dla porfirynoidu, a hydrofilowe ugrupowania, ułatwiają kontakt ze środowiskiem wodnym. Ponadto wykazano korzystny wpływ inkorporacji porfirynoidowych związków na właściwości fotodynamiczne. W błonie lipidowej, cząsteczka porfirynoidu wykazuje większą tendencję do występowania w formie monomerycznej, dzięki czemu bardziej efektywnie generuje tlen singletowy. Co więcej zewnętrzna powierzchnia błony liposomalnej, może być dowolnie modyfikowana np. poprzez przyłączenie ligandów zwiększających trwałość liposomów (polietylenoglikole)

lub umożliwiających pasywny bądź aktywny transport fotouczulacza, do miejsca docelowego działania (np. przeciwciała). Liposomalne formy fotouczulaczy ułatwiają także przygotowanie postaci farmaceutycznej, szczególnie roztworu do iniekcji, zmniejszając ryzyko wytrącenia związku i eliminując konieczność stosowania roztworów alkoholowych [25,27–29].

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Zagadnienia transportu substancji leczniczych, nośników leków (ang. drug carriers) i systemów transportujących leki (ang. drug delivery system, DDS), obejmują zastosowanie postaci leku, formulacji, struktur i/lub technologii, których celem jest modyfikacja i poprawa biodostępności, efektu terapeutycznego substancji leczniczej i/lub zminimalizowanie działań niepożądanych poprzez wpływ na parametry farmakokinetyczno-farmakologiczne. Założenia nowoczesnej technologii farmaceutycznej, związane są z dążeniem do uzyskania optymalnego terapeutycznego stężenia substancji leczniczej w miejscu działania, najczęściej przez modyfikację procesu uwalniania z postaci leku [30,31]. Z drugiej strony, postęp chemii kombinatorycznej, wysokowydajnych metod przesiewowych i modelowania molekularnego, w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat, doprowadził do wskazania wielu nowych rozwiązań terapeutycznych i opracowania obiecujących cząsteczek wiodących. Jednocześnie zaobserwowano, że nowo zidentyfikowane związki wiodące, uzyskane przy zastosowaniu powyższych technik, posiadają często dużą masę cząsteczkową i słabą rozpuszczalność w środowisku wodnym. Niestety, duża masa cząsteczkowa i słaba rozpuszczalność, może wpływać niekorzystnie na biodostępność leku, jak również utrudnia opracowanie parenteralnych postaci leku [32]. Powyższy problem jest szczególnie aktualny w odniesieniu do terapii fotodynamicznej, gdzie opracowanie postaci farmaceutycznej wielu potencjalnych fotouczulaczy jest utrudnione z uwagi na silnie hydrofobowy charakter i/lub niską rozpuszczalność większości związków. Konan i wsp. [25] przedstawili główne kierunki rozwoju nośników substancji fotouczulających, polegające m.in. na tworzeniu koniugatów syntetycznych i naturalnych polimerów z fotouczulaczami lub enkapsulacji w koloidalnych nośnikach jak np. micelle czy liposomy. Obecnie, szacuje się, że ok. 40-50% nowych substancji leczniczych, będzie wymagać zastosowania DDS [31]. Jednocześnie, rozwój badań w dziedzinie chemii materiałowej i nanotechnologii, umożliwia pozyskiwanie nowych biokompatybilnych materiałów, wykorzystywanych w opracowywaniu nośników leków. Rezultaty tych projektów mają przełożenie na liczbę produktów leczniczych w formie DDS, zarejestrowanych przez FDA w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat. Większość nośników stanowią koniugaty lek-polimer, gdzie jednostkę polimeru stanowi polietylenoglikol lub kopolimery kwasu mlekowego i glikolowego. Ponadto, wiele leków transportowanych jest w lipidowych strukturach, tj. liposomach i micelach, których główną zaletą jest wysoka biokompatybilność [30,31].

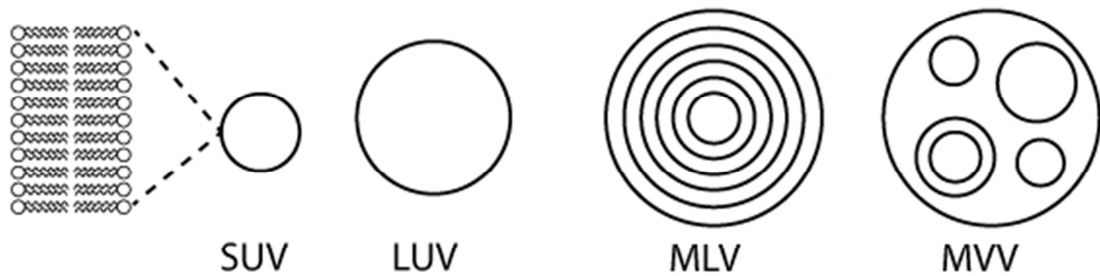
1. Odkrycie liposomów

Początek technologii liposomowej związany jest z odkryciem liposomów w latach sześćdziesiątych XX w. przez Aleca Bangham'a, podczas badań prowadzonych w Agricultural Research Council Institute of Animal Physiology w Babraham, Cambridge. W 1964 roku, Bangham i Home opisali fotografie uzyskane z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego, przedstawiające wybarwione formy lipidowe. Obserwowane struktury, uzyskane w wyniku zdyspergowania fosfatydylocholiny i jej mieszaniny z cholesterolem w wodzie, charakteryzowały się lamelną budową, z warstwą lipidową i wodną o grubości odpowiednio 4,42 i 25,6 nm. Bangham nazwał odkryte formy jako „spherulites”. W kolejnych latach, zaobserwowano, że „banghosomy” („lipidosomy”) wykazują znaczne podobieństwo do błon komórkowych, tj. zamkniętych, uporządkowanych struktur warstwy lipidowej i wodnej [33]. W 1974 r. Bangham i wsp. przytoczyli fragmenty wniosku patentowego z 1932 r., autorstwa J.Y. Johnson'a, którego przedmiotem była formuacja farmaceutyczna do iniekcji, będąca „mieszaniną cieczy takich jak oleje i tłuszcze, z dodatkiem wosków i substancji dyspergujących”. Powstała mieszanina miała stanowić „rezerwuar pożądaney dawki leku, uwalnianey w odpowiednim miejscu, stopniowo, bez szkody dla organizmu” [34]. Kontynuatorami tej idei byli dwaj pionierzy zastosowania liposomów do transportu substancji leczniczych, Demetrios Papahadjopoulos i Gregory Gregoriadis. Badania między innymi tych wybitnych badaczy, przyczyniły się do wdrożenia terapeutycznych liposomów przez firmy biotechnologiczne i zarejestrowania pierwszych produktów leczniczych w latach 90' XX w. [35].

2. Rodzaje liposomów

Liposomy to kuliste struktury, których ścianę tworzy podwójna warstwa lipidów otaczająca wewnętrzną fazę wodną liposomu, a jednocześnie oddzielająca ją od środowiska zewnętrznego. Liposomy są zbudowane z amfifilowych fosfolipidów, uporządkowanych w postaci podwójnej (bilaminarnej) warstwy lipidowej. Hydrofilowe fragmenty lipidów, tworzących podwójną otoczkę liposomu, ustawione są w kierunku fazy wodnej, natomiast lipofilowe niepolarne łańcuchy kwasów tłuszczowych obu warstw lipidowych, skierowane są do siebie, tworząc wewnętrzną warstwę hydrofobową. Liposomy mają średnicę od kilkudziesięciu nanometrów do kilku mikrometrów, przy grubości błony ok. 5 nm. Z uwagi na możliwość formowania, jednej lub kilku podwójnych

warstw błony liposomalnej, wyróżnia się różne typy liposomów uwzględniając ich wielkość oraz liczbę warstw podwójnej błony lipidowej (Ryc. 3):



Ryc. 3 Rodzaje liposomów: SUV - małe jednolamelarne liposomy, LUV - duże jednolamelarne liposomy, MLV - wielkie wielolamelarne liposomy, MVV – liposomy wielopęcherzykowe.

- **SUV - małe jednolamelarne liposomy (ang. small unilamellar vesicles)** – mają średnicę w granicach 50-100 nm. Od innych liposomów różnią się mniejszym promieniem krzywizny i znacznym naprężeniem w podwójnej warstwie lipidowej; ponadto charakteryzują się niskim stosunkiem objętości fazy wodnej do zawartości lipidów. Ze względu na powyższe właściwości, SUV mają ograniczone zastosowanie jako modele błon komórkowych i nośniki substancji leczniczych o charakterze hydrofilowym. Z uwagi na duże naprężenia, liposomy SUV są strukturami wysoce niestabilnymi termodynamicznie i wykazują skłonność do wzajemnej fuzji oraz łączenia się z dużymi cząstkami. Niewielkie rozmiary SUV sprzyjają dystrybucji substancji leczniczych w organizmie i zabezpieczają przed wychwytem SUV po podaniu przez fagocyty układu fagocytarnego (ang. mononuclear phagocyte system, MPS) w wątrobie i śledzionie, dawniej określanego jako system retikuloendotelialny.
- **LUV - duże jednolamelarne liposomy (ang. large unilamellar vesicles)** – charakteryzują się wielkością średnicy powyżej 100 nm, wykazują większą stabilność w trakcie przechowywania i duży współczynnik wewnętrznej fazy wodnej do lipidowej. LUV znalazły zastosowanie jako nośniki substancji hydrofilowych i makromolekuł, a ponadto są wykorzystywane jako modele błony komórkowej. Po podaniu dożylnym są szybko wychwytywane przez układ MPS.
- **MLV – wielkie wielolamelarne liposomy (ang. multilamellar large vesicles)** – obejmują struktury wielkości 100-1000 nm, których otoczka utworzona jest z wielu podwójnych warstw lipidowych. Wykazują zwiększoną zdolność inkorporacji

substancji lipofilnych i pośredni stosunek objętości wewnętrznej fazy wodnej względem lipidów. Ich wadą jest niemal natychmiastowy wychwyty przez komórki układu MPS.

- **MVV – liposomy wielopęcherzykowe (ang. multivesicular vesicles)** powstają jako produkt uboczny w trakcie wytwarzania MLV. W liposomach tych jedna podwójna błona lipidowa otacza dwa lub więcej mniejszych liposomów [35–38].

3. Lipidy do otrzymywania liposomów

Liposomy mogą być zbudowane z lipidów pochodzenia naturalnego, syntetycznego i półsyntetycznego [37]. Głównym składnikiem budulcowym liposomów są fosfolipidy, które stanowią również podstawową klasę lipidów błonowych. W cząsteczce fosfolipidu wyróżnić można rdzeń, który stanowi alkohol zawierający przynajmniej trzy grupy hydroksylowe, najczęściej glicerol (mówimy wówczas o fosfoglicerydach). W fosfoglicerydach, grupy wodorotlenowe przy atomach węgla C_1 i C_2 , są zestryfikowane grupami karboksylowymi dwóch cząsteczek kwasów tłuszczowych. Grupa hydroksylowa przy atomie węgla C_3 glicerolu jest natomiast zestryfikowana resztą kwasu ortofosforowego(V) z przyłączoną cząsteczką alkoholu, np. seryny, etanolaminy, choliny, glicerolu lub inozytolu [39].

Do otrzymywania liposomów najczęściej wykorzystywane są naturalne fosfolipidy, tj. fosfatydylocholina, której źródłem jest żółtko jaja kurzego lub soja. Fosfatydylocholina zawiera kwasy tłuszczowe, zbudowane z łańcuchów zawierających od 14-20 atomów węgla, o różnym stopniu nasycenia. Produkty komercyjne fosfatydylocholino pochodzenia naturalnego, charakteryzują się wysokim stopniem oczyszczenia i brakiem toksycznego działania. Natomiast ich wadą jest dość duża podatność na jętczenie, ze względu na obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych, łatwo ulegających procesom utleniania i hydrolizy. Duże zróżnicowanie, pod względem długości i stopnia nienasycenia, łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych naturalnych fosfolipidów, może prowadzić do braku powtarzalności procesu otrzymywania liposomów, a uzyskiwany produkt końcowy (liposomy) może wykazywać nieprzewidywalną stabilność chemiczną. Poniżej i powyżej temperatury 37 °C, fosfatydylocholino naturalne występują w fazie płynno-kryształicznej, wykazującej zwiększoną płynność i przepuszczalność. Stąd w celu zmniejszenia przepuszczalności błony liposomów, stosuje się dodatek cholesterolu bądź zmodyfikowanych fosfolipidów, uzyskanych w wyniku redukcji katalitycznej

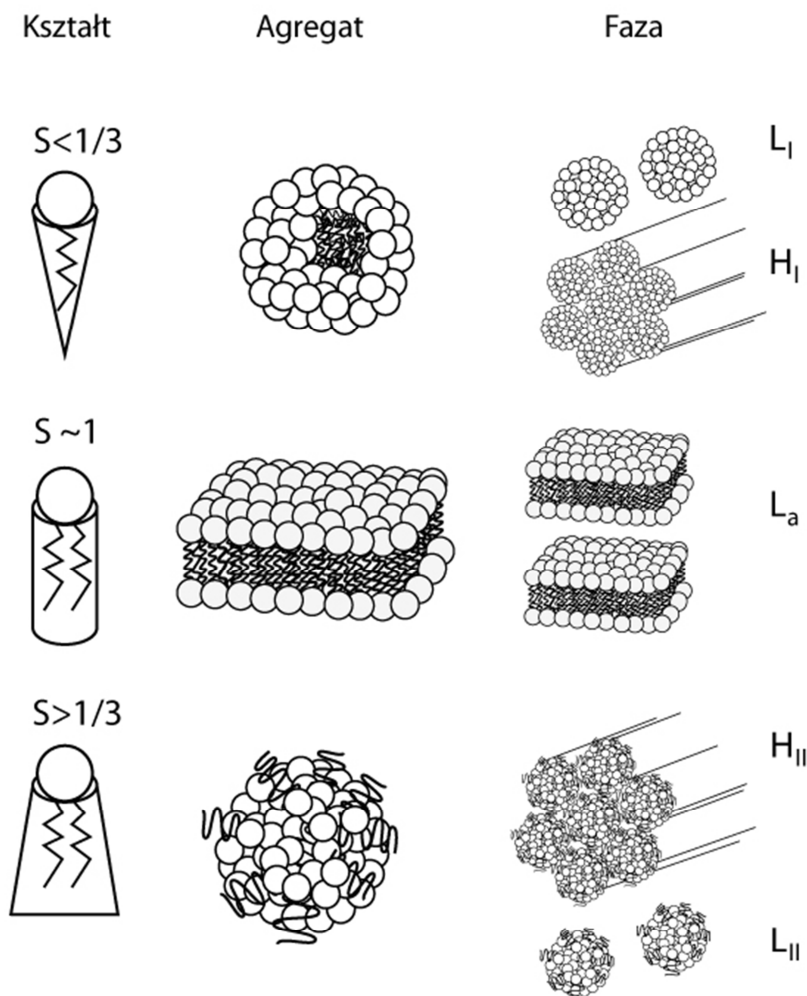
fosfatydylocholin z jaj i soi. Fosfolipidy zmodyfikowane tworzą fazę żelową powyżej temperatury 50 °C, sprawiają trudności technologiczne i mogą wpływać na proces uwalniania inkorporowanej substancji czynnej. Syntetyczne i półsyntetyczne lipidy mają określony skład reszt kwasów tłuszczowych oraz ściśle zdefiniowaną temperaturę przejścia fazowego między fazą żelową a płynno-krystaliczną, co podnosi ich wartość.

Fosfatydylocholiny naturalne są fosfolipidami o charakterze obojętnym. W celu zmiany ładunku błony liposomalnej oraz zwiększenia jej stabilności stosuje się często lipidy obdarzone ładunkiem ujemnym, takie jak fosfatydyloglicerol, fosfatydyloserynę, kardiolinę. Fosfolipidy kationowe (np. stearyloamina) stosowane są rzadziej i w mniejszych stężeniach ponieważ mogą wykazywać działania toksyczne. Niekiedy, w liposomy inkorporowane są lipidy pozwalające uzyskać zwiększone powinowactwo względem określonych komórek/tkanek, np. laktozyceramid zwiększa wychwyt liposomów przez hepatocyty [40]. Fosfolipidy błon liposomów mogą być również zmodyfikowane poprzez przyłączenie ligandów, spełniających określone funkcje jak np. wydłużony okres półtrwania w krwiobiegu, transport celowany [36–38].

4. Mechanizm powstawania liposomów

4.1. Lipidowa dwuwarstwa

Liposomy zbudowane są głównie z naturalnych i/lub syntetycznych lipidów (fosfolipidów), które mają właściwości amfipatyczne. Cechą charakterystyczną związków amfifilowych, jest zdolność do spontanicznej agregacji na granicy faz. W zetknięciu z wodą, cząsteczki fosfolipidów tworzą uporządkowane struktury, co pozwala zminimalizować niekorzystne hydrofobowe interakcje, pomiędzy cząsteczkami wody i niepolarnymi łańcuchami kwasów tłuszczowych. Struktura agregatu zależy od kształtu monomeru, tj. objętości i długości łańcucha hydrofobowego oraz powierzchni części polarnej. Agregaty związków amfifilowych formowane w środowisku wodnym tworzą różne fazy tj. micelarne, heksagonalne bądź lamelarne. Cząsteczki fosfolipidów mają w przybliżeniu jednakową szerokość, przez co osiągają cylindryczny kształt i w roztworze wodnym tworzą głównie układy dwuwarstwowe (Ryc. 4) [41].



Ryc. 4 Struktury agregatów cząsteczek amfifilowych. Badania polimorfizmu związków amfifilowych doprowadziły do sformułowania tzw. koncepcji kształtu molekularnego, według której różnym cząsteczkom amfifilowym można przypisać różne kształty w zależności od stosunku powierzchni przekroju poprzecznego polarnej główki, do przekroju poprzecznego hydrofobowych łańcuchów acylowych. W sposób ilościowy powyższy stosunek opisuje parametr S . W przypadku większych „główek” polarnych – $S < 1/3$ powstają struktury micelarne i faza heksagonalna (H_I). Dla cząsteczek o wartości $S \sim 1$ preferowaną formą agregatu jest dwuwarstwa i faza lamelarna. Dla małych „główek” polarnych – $S > 1/3$, preferowana jest struktura odwróconej miceli i faza heksagonalna (H_{II}) [41].

4.2. Formowanie liposomów

Pomimo szerokiego zastosowania liposomów, biofizyczny mechanizm ich powstawania, nie jest do końca wyjaśniony, choć dla każdej metody otrzymywania podejmowano próby jego opisanie. W 1988 r. Lasic zaproponował, że produktem pośrednim w procesie otrzymywania liposomów, niezależnie od zastosowanej metody, jest „dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek” (bilayered phospholipid flake, BPF). BPF jest

strukturą nietrwałą i charakteryzuje się wysokim napięciem na krawędziach dwuwarstwy. W wyniku działania dwóch czynników, tj. energii krawędzi (ang. edge energy) i energii zaginania płaskiej dwuwarstwy (ang. bending energy), następuje zamknięcie BPF i powstanie liposomu. Ponadto Lasic postulował, że większość liposomów to struktury termodynamicznie niestabilne i nie mogą powstać samoistnie w zetknięciu z wodą. W oparciu o teorię elastycznego zagięcia Helfrich'a, Lasic wykazał, że symetryczne dwuwarstwowe błony „preferują” układ „płaskiej kartki”, dla którego energia krzywizny wynosi 0. Stąd, zagięcie lipidowej dwuwarstwy i otrzymanie liposomów wymaga nakładu energii dostarczonej w procesie np. sonikacji, ekstruzji, wytrząsania, homogenizacji. Stanem o najniższej wolnej energii jest fosfolipidowa dwuwarstwa. „Pączkowanie” suchego fosfolipidowego filmu i formowanie MLV wymaga nakładu energii, która dostarczana jest np. podczas wytrząsania warstwy lipidowej z wodą (lub buforem) w procesie hydratacji. W związku z powyższym, MLV wykazują wyższą wolną energię niż dwuwarstwa. Dalej, otrzymywanie LUV i SUV wymaga jeszcze większego nakładu energii. Niestabilny charakter liposomów, potwierdza również fakt, że w trakcie przechowywania mniejsze pęcherzyki ulegają stopniowej fuzji tworząc większe struktury, z większą liczbą lamelarnych warstw, o większym promieniu krzywizny [42].

5. Metody otrzymywania liposomów

Każda z metod otrzymywania liposomów, niezależnie od ich rodzaju, zakłada wprowadzenie cząsteczek lipidów do środowiska wodnego. Rozwój technologii liposomowej, potrzeba uzyskiwania różnych typów liposomów, zarówno na skalę laboratoryjną jak i przemysłową, oraz transportu substancji o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, przyczyniły się do opracowania wielu różnych metod otrzymywania. Dlatego charakter liposomów i potrzeby badacza/wytwórcy decydują o wyborze odpowiedniej metody lub konieczności połączenia kilku metod.

Ogólny schemat przedstawiający otrzymywanie liposomów, został zaproponowany przez Lasic'a i wyróżnia trzy metody: mechaniczną, wymiany rozpuszczalnika organicznego na roztwór wodny, usuwania detergentu [43].

5.1. Metody mechaniczne

Metoda hydratacji cienkiego filmu lipidowego jest najprostszym i najczęściej stosowanym sposobem otrzymywania liposomów na skalę laboratoryjną. Polega na

przygotowaniu suchego filmu lipidowego, a następnie hydratacji w roztworze wodnym przez intensywne wytrząsanie i pozwala uzyskać zróżnicowaną populację MLV [35,44]. Wielkość uzyskanych liposomów zależy od rodzaju fosfolipidów, wchodzących w skład błony liposomalnej, składu fazy wodnej oraz intensywności wytrząsania (lipidy obdarzone ładunkiem tworzą zwykle mniejsze liposomy, z mniejszą liczbą błon). Zaletą tej metody jest możliwość przygotowania liposomów o zróżnicowanym składzie, prostota wykonania i wysoki stopień enkapsulacji, szczególnie substancji lipofilnych. Problem stanowi przeniesienie metody hydratacji filmu, na skalę półprodukcyjną i przemysłową (konieczność stosowania dużych objętości zawiesiny). Ponadto, uzupełnieniem metody hydratacji jest wymiarowa kalibracja zawiesiny MLV, w celu uzyskania bardziej homogennej próbki, co generuje dodatkowe koszty oraz związane z tym potencjalne ryzyko strat materiału [44].

Techniki stosowane do zmniejszenia liposomów MLV, wykorzystują energię ultradźwięków, energię mechaniczną, ciśnienie. Huang [45] jako pierwszy przedstawił pracę, w której do zmniejszenia liposomów zastosowano metodę ultradźwiękową. Stosowanie ultradźwięków do kalibracji wymiarowej liposomów ma pewne wady. Z jednej strony ultradźwięki o dużej energii, uzyskiwane w głowicach ultradźwiękowych, pozwalają otrzymać bardzo małe liposomy, jednak zanieczyszczone metalami [36,45]. Z drugiej zaś strony łańcze ultradźwiękowe nie generują zanieczyszczeń, ale uzyskiwana w nich energia jest zbyt niska i pozwala otrzymać jedynie mniejsze wielolamelarne nośniki [36].

Kolejna technika laboratoryjna, zakłada wykorzystanie prasy francuskiej wyposażonej w termostat, w której zawiesina liposomów jest przeciskana przez otwory, pod ciśnieniem w zakresie 0-200 bar. Następnie w komorze mieszającej dochodzi do kolizji liposomów i ich mechanicznego rozrywania. W skali produkcyjnej modyfikacją tej metody są techniki wykorzystujące aparaty do mikrofluidyzacji oraz wysokociśnieniowe homogenizatory. Pod wpływem ciśnienia powstają początkowo małe liposomy, jednak z powodu napięcia błony, ulegają fuzji tworząc mieszaninę LUV [44,46].

Popularną metodą laboratoryjnej kalibracji zawiesiny liposomów jest metoda ekstruzji, polegająca na przetłaczaniu liposomów przez błony poliwęglanowe, o ściśle określonej wielkości porów, po raz pierwszy zaprezentowana przez Olsona i wsp. [47]. W tym celu stosuje się ekstrudery ręczne, często umożliwiające kontrolę temperatury podczas kalibracji. Kalibracja wymiarowa liposomów powinna być prowadzona, powyżej temperatury przejścia fazowego T_c lipidów budujących otoczkę [35,36,44]. Obecnie

konstruowane są ekstrudery umożliwiające prowadzenie ekstruzji ciągłej, na większą skalę (urządzenie Maximator) [48]. Powyżej przedstawione metody kalibracji wymiarowej liposomów, charakteryzują się wysoką powtarzalnością, co jest szczególnie istotne w aspekcie zastosowań biomedycznych [44].

5.2. Metody z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych

W metodach z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych filmy lipidowe są rozpuszczane, a następnie wprowadzane do roztworu wodnego, czemu towarzyszy formowanie liposomów. Mechanizm powstawania liposomów, zależy od stopnia mieszania się rozpuszczalnika organicznego z wodą [36,44].

Metodę iniekcji rozpuszczalnika organicznego zastosowano po raz pierwszy w latach 70' XX w., jako alternatywę do przygotowania SUV, bez konieczności użycia ultradźwięków. Batzri i Korn [49] przeprowadzili doświadczenia stosując bardzo niskie stężenie lipidów w etanolu, jednak uzyskali bardzo małe struktury i jednocześnie słaby stopień enkapsulacji. Metoda iniekcji etanolowej pozwala uzyskać SUV, a wielkość liposomów oraz rozkład frakcji zmniejsza się ze stężeniem alkoholu. Rozcieńczenie roztworu etanolowego powinno być wystarczająco duże, aby rozpuszczone lipidy, przechodząc z fazy alkoholowej do fazy wodnej, mogły uporządkować się w liposomy typu SUV [49]. W przypadku rzadziej stosowanych roztworów eterowych, są one wstrzykiwane do ogrzanego roztworu buforowego, w którym na granicy faz tworzy się pojedyncza warstwa lipidów, która po odparowaniu rozpuszczalnika przekształca się częściowo w liposomy LUV [36,50]. Najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem organicznym do otrzymywania terapeutycznych liposomów jest etanol, który jest rozpuszczalnikiem dość powszechnie wykorzystywanym w przemyśle farmaceutycznym, również do przygotowywania parenteralnych postaci leków. Wśród zalet metody etanolowej iniekcji, wymienić można wysoki stopień enkapsulacji związków lipofilnych i zwiększoną trwałość uzyskanych liposomów [44,51]. Ponadto odpowiednie modyfikacje tej metody, pozwalają enkapsulować zróżnicowane pod względem chemicznym związki, np. proteiny – metodą enkapsulacji pasywnej oraz małe amfifilowe cząsteczki substancji leczniczych, antygeny. Technikę tę łatwo przystosować również do celów wymagających przygotowania liposomów na skalę przemysłową. W celu uzyskania jałowego produktu, roztwory wodne i etanolowe są wprowadzane do wysterylizowanych urządzeń przez filtry wyjaławiające [44].

Znacznie lepszą skutecznością enkapsulacji charakteryzuje się metoda „proliposom-liposom”, która polega na rozcieńczeniu fazą wodną, mieszaniny „proliposomów”, tj. roztworu lipidów w roztworze etanolowo-wodnym. W mieszaninie lipidów, wody i etanolu można wyróżnić trzy formy lipidów: lipidy rozpuszczone w wodnym roztworze etanolu oraz uformowane dwuwarstwy lipidowe i liposomy. Wraz ze zwiększaniem się objętości fazy wodnej, w mieszaninie powstaje coraz więcej liposomów [52]. Turanek i wsp. opracowali zestaw do otrzymywania MLV metodą „proliposom-liposom”, który składa się z układu dozującego odpowiednio fazę proliposomów i fazę wodną oraz termostatowanej komory z mieszałem [53]. Metoda może być stosowana na skalę przemysłową i laboratoryjną [54]. Otrzymane liposomy MLV muszą być następnie poddane procesowi kalibracji wymiarowej.

Duże jednowarstwowe liposomy LUV, ze znaczną objętością fazy wodnej, można uzyskać metodą odparowywania faz odwróconych (ang. reverse-phase evaporation). W przypadku powyższej metody, roztwór lipidów w lotnym rozpuszczalniku (eter dietylowy lub izopropylowy) wytrząsa się z roztworem wodnym, a następnie odparowuje rozpuszczalnik organiczny. Ze względu na pozostałości w preparacie rozpuszczalnika organicznego, zastosowanie otrzymanych w ten sposób liposomów jest ograniczone, szczególnie do celów biomedycznych. Metoda ta ma również mniejsze znaczenie w wytwarzaniu LUV na skalę przemysłową [44].

5.3. Metody z zastosowaniem detergentów

W tej grupie metod, do otrzymywania liposomów wykorzystywane są detergenty, które w przeciwieństwie do lipidów, wykazują rozpuszczalność zarówno w roztworach polarnych (woda), jak i niepolarnych. Jako detergenty najczęściej stosowane są sole kwasów żółciowych (sól sodowa kwasu cholowego), *n*-alkilosacharydy i *n*-alkilooligooksyetylenopochodne, które z fosfolipidami mogą tworzyć laminarne micle mieszane, powyżej krytycznego stężenia micelnego (CMC, ang. critical micelle concentration). CMC to stężenie detergentu w roztworze, przy którym jego wolne cząsteczki są w równowadze z formami zagregowanymi, czyli związanymi w micelach. Wskutek zmniejszenia stężenia wolnych cząsteczek detergentu, następuje proces przechodzenia cząsteczek detergentów z mieszanych miceli do ośrodka dyspergującego, a w konsekwencji fuzja i zwiększanie miceli laminarnych. Po przekroczeniu pewnej krytycznej wielkości, wytworzone napięcia, indukują zaokrąglenie i formowanie

liposomów. Wielkość i kształt uzyskiwanych liposomów, zależy od (i) rodzaju i stężenia zastosowanego detergentu, (ii) stosunku stężenia detergentu do stężenia wyjściowego lipidów, (iii) rodzaju lipidów, (iv) szybkości usuwania detergentu z roztworu i (v) warunków temperaturowych procesu. Optymalizacja powyższych parametrów umożliwia uzyskanie, metodą z zastosowaniem detergentów, liposomów o pożądanej wielkości [36,44].

Detergent z roztworu dyspergującego usuwany jest 1) przez rozcieńczenie, 2) metodą chromatografii żelowej, 3) na drodze dializy z użyciem włókien kapilarnych lub filtrów membranowych (błon półprzepuszczalnych), 4) w wyniku adsorpcji np. na hydrofobowej żywicy [44].

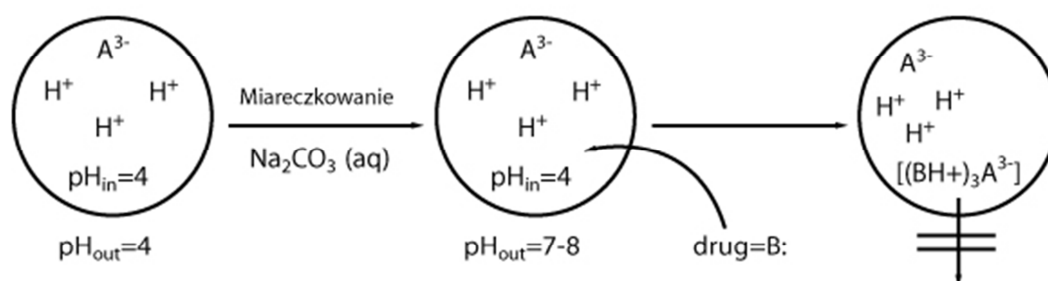
5.4. Mechanizmy wprowadzania substancji leczniczych w strukturę liposomu

O sposobie umiejscowienia cząsteczki substancji leczniczej w obrębie liposomu, decyduje jej rozpuszczalność i polarność. Substancje hydrofilowe i polarne zostają zamknięte w kompartmentcie wodnym liposomu otoczonym błoną, natomiast wykazujące bardziej lipofilny charakter i niepolarne związki wbudowują się w podwójną warstwę lipidową. Często wprowadzenie substancji leczniczej w strukturę liposomów, określa się powszechnie mianem enkapsulacji bądź inkorporacji, przy czym termin enkapsulacja określa również jeden, spośród trzech mechanizmów, pozwalających uzyskać liposomalną postać substancji leczniczej.

Substancje hydrofilowe, rozpuszczalne w wodzie ulegają (1) **enkapsulacji** w momencie hydratacji filmu lipidowego wodnym roztworem inkorporowanej substancji. W czasie formowania liposomów substancje lecznicze, są w sposób bierny zamykane w przestrzeni wodnej liposomu i/lub w przestrzeniach międzybłonowych.

Cząsteczki substancji leczniczych o charakterze hydrofobowym są dodawane do roztworu lipidów w organicznym rozpuszczalniku, a po odparowaniu i dodaniu fazy wodnej, związek wbudowuje się w hydrofobowym obszarze błony liposomów, co określa się terminem (2) **podziału (partycjonowania)**. Leki o charakterze słabych kwasów lub słabych zasad, mogą być wbudowywane przez wytworzenie gradientu pH w poprzek błony liposomalnej [37]. Metoda (3) **kontrolowanego ładowania gradientem pH** polega na transporcie substancji leczniczej w formie obojętnej cząsteczki do wnętrza liposomu, zawierającego przestrzeń wodną o innej wartości pH niż środowisko zewnętrzne. We

wnętrzu nośnika, cząsteczka ulega jonizacji, co uniemożliwia jej dyfuzję na zewnątrz liposomu. W celu enkapsulowania substancji o charakterze słabych zasad należy zastosować gradient stężenia dwuwęglanu sodu lub gradient pH, przy czym we wnętrzu liposomu powinno panować środowisko kwasowe, co zobrazowano na Ryc. 5. W przypadku enkapsulowania w liposomy słabych kwasów, należy analogicznie wykorzystać różnicę stężenia siarczanu amonu, a w przypadku gradientu pH, roztwór zamknięty w liposomie powinien wykazywać wyższą wartość pH niż roztwór otaczający nośnik. Metoda kontrolowanego wbudowywania pozwala uzyskać wysoki stopień enkapsulacji, jednak niekontrolowane zmiany pH środowiska zewnętrznego, mogą prowadzić do przedwczesnego uwolnienia substancji leczniczej [55,56].



Ryc. 5 Inkorporacja substancji leczniczej o charakterze słabej zasady w liposomy, z zastosowaniem gradientu pH na granicy błony liposomu.

6. Parametry charakteryzujące liposomy

Właściwości liposomów mogą wywierać znaczny wpływ na zachowanie nośnika w warunkach *in vivo*, np. stabilność, przedwczesne uwolnienie substancji leczniczej, biodystrybucję i wychwyty komórkowy liposomów transportujących substancję czynną.

6.1. Skład liposomów

Składniki błon liposomalnych obejmują szerokie spektrum fosfolipidów pochodzenia naturalnego i syntetycznego, co przedstawiono w rozdziale 3. Ich wybór determinuje wiele właściwości liposomów, m.in. płynność i ładunek błony liposomalnej, przepuszczalność, wpływa także na parametry farmakokinetyczne substancji inkorporowanej w nośnik, oraz działanie toksyczne *per se*, np. lipidów kationowych. Jednym z istotnych parametrów, w aspekcie farmaceutycznym, jest stabilność liposomalnej postaci, szczególnie w trakcie przechowywania [38]. Rodzaj fosfolipidów, a szczególnie kwasów tłuszczowych i stopień

ich nasycenia, istotnie wpływają na podatność preparatów na procesy utleniania i hydrolizy. Proces oksydacji lipidów zależy w głównej mierze od liczby wiązań podwójnych. Zjawisko to można spowolnić stosując niewielkie ilości przeciwutleniaczy, np. tokoferolu [36,37]. Ponadto, w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych dochodzi do powstania różnych rodników, mogących wywierać szkodliwe działanie względem błon komórkowych [37].

6.2. Wielkość średnicy i typ liposomów

Rozmiar średnicy oraz liczba podwójnych warstw lipidowych, określa objętość fazy wodnej zamkniętej wewnątrz liposomu, a to decyduje o zdolności do enkapsulacji substancji leczniczych o określonej polarności. W przypadku związków hydrofobowych parametry te nie mają większego znaczenia. Natomiast, dla związków hydrofilowych, stopień enkapsulacji wzrasta odpowiednio dla liposomów $MLV > SUV > LUV$. Liczba warstw lipidowych może wpływać na stopień i profil uwalniania substancji leczniczej z liposomu [38,57].

Dodatkowo, rozmiar liposomów ma istotne znaczenie dla szybkości usuwania liposomów z krwiobiegu, przez makrofagi układu MPS. Wkrótce po pojawieniu się w krwiobiegu, liposomy oddziałują z białkami osocza, opsoninami, które adsorbując na powierzchni liposomów przyspieszają ich usuwanie przez MPS. Większe liposomy (> 100 nm) są znacznie szybciej i łatwiej wychwytywane przez MPS. Dlatego małe liposomy (< 100 nm) charakteryzują się dłuższym czasem cyrkulacji w krwiobiegu. Z tego względu małe liposomy transportujące substancje przeciwnowotworowe wykazują zwiększoną akumulację w obrębie tkanki nowotworowej [57].

6.3. Płynność błony liposomalnej

Stan termodynamiczny błony liposomalnej tj. ruchliwość budujących ją cząsteczek zależy przede wszystkim od temperatury. Fosfolipidy charakteryzują się temperaturą przejścia fazowego (T_c) i występują w dwóch stanach fizycznych, poniżej i powyżej wartości temperatury T_c . Poniżej temperatury T_c , lipidy tworzą sztywną, uporządkowaną fazę żelową L_β , a powyżej T_c płynno-krystaliczną fazę L_α . T_c różnych fosfolipidów mieści się w szerokim zakresie -20 °C – 90 °C. Na wartość T_c wpływa długość łańcucha acylogowego kwasów tłuszczowych, liczba wiązań podwójnych, a także ładunek i rodzaj polarnych grup. Dobierając fosfolipidy o zróżnicowanych temperaturach T_c , można

otrzymać liposomy o pożądanej płynności błony. Obecność fosfolipidów o $T_c > 37^\circ\text{C}$, sprawia, że błona liposomalna w warunkach fizjologicznych ma strukturę żelu i mniejszą przepuszczalność. Wykazano również, że liposomy takie w mniejszym stopniu są wychwytywane przez MPS. Analogicznie lipidowa dwuwarstwa zbudowana z lipidów o $T_c < 37^\circ\text{C}$, charakteryzuje się większą płynnością w temperaturze ciała ludzkiego.

Dodatek cholesterolu wpływa na płynność dwuwarstwy w dwojaki sposób. Poniżej temperatury przejścia fazowego, wprowadza dezorganizację upakowania cząsteczek fosfolipidów (upłynnia). Natomiast powyżej temperatury przejścia fazowego prowadzi do wzrostu uporządkowania i ogranicza ruchliwość cząsteczek (usztywnia). Przy wysokim stężeniu cholesterolu (ok. 30 mol%), obserwuje się zanik termotropowego przejścia fazowego, a liposomy są bardziej stabilne [37,38].

6.4. Ładunek powierzchni liposomu

Liposomy mogą być zbudowane z mieszaniny wielu składników, które różnią się stopniem zjonizowania grup polarnych. Natura i gęstość rozmieszczenia ładunku na powierzchni liposomu, w sposób istotny wpływa na mechanizm i zakres oddziaływania liposomu z błonami komórkowymi. Niektóre badania wskazują, że liposomy o charakterze obojętnym w mniejszym stopniu oddziałują z komórkami. Substancja lecznicza uwalniana jest w bliskim sąsiedztwie komórek i następnie w formie wolnej przenika do ich wnętrza. Natomiast wysoki stopień zjonizowania błony liposomalnej, ułatwia oddziaływanie liposomów z błoną komórkową [38]. W przypadku liposomów o ujemnym ładunku, zwiększa się ich wychwyt przez komórki stanowiące cel terapeutyczny, ale także obserwuje się szybkie usuwanie przez układ MPS. Natomiast liposomy kationowe ulegają fuzji na powierzchni komórek i wnikają aktywnie do wnętrza [58]. Liposomy o ładunku dodatnim, okazały się skutecznym niewirusowym nośnikiem, który umożliwia transfekcję komórek, czyli dokomórkowy transport fragmentów kwasów nukleinowych w terapii genowej [59].

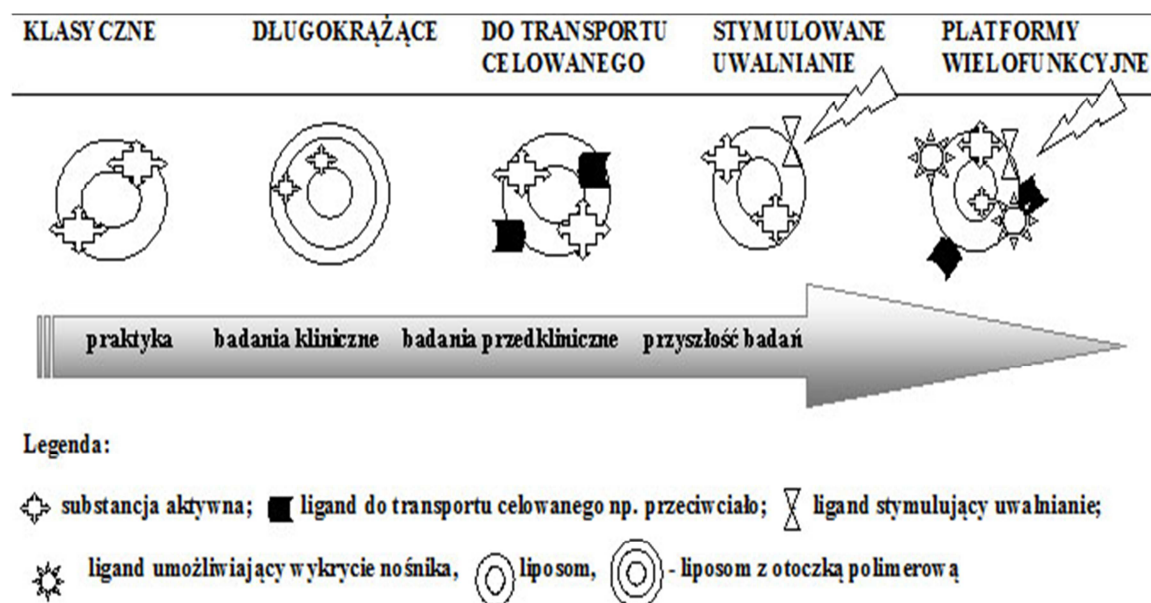
6.5. Potencjał zeta

Podwójna warstwa elektryczna istniejąca wokół każdej cząstki, składa się z wewnętrznej warstwy Stern'a, w której jony są silnie związane, oraz zewnętrznej, tzw. dyfuzyjnej, charakteryzującej się słabszym związaniem jonów z powierzchnią cząstki. W obrębie warstwy dyfuzyjnej znajduje się granica, poza którą cząstki zachowują się jak

niezależne indywidua. Potencjał na tej granicy nazywany jest potencjałem zeta. Wielkość potencjału zeta wskazuje na stabilność układów koloidalnych, takich jak np. zawiesina liposomów. Jeśli wszystkie cząstki mają duży ujemny lub dodatni potencjał zeta, wówczas wzajemnie się odpychają, stąd można wnioskować o dużej stabilności układu. W przypadku niskiego potencjału zeta, nie ma siły zapobiegającej zbliżaniu się cząstek, co świadczy o niskiej stabilności układu. Wówczas, liposomy ulegają fuzji i agregacji, tworząc większe struktury, co zmienia ich właściwości i w przypadku zastosowania jako nośników substancji leczniczych, może prowadzić do zmiany profilu działania farmakologicznego i nieoczekiwanych zmian aktywności *in vivo* [60].

7. Rodzaje terapeutycznych liposomów

Jedną z zalet liposomów, wśród wielu koloidalnych nośników leków, jest ogromna ilość możliwości modyfikacji właściwości fizykochemicznych i strukturalnych. Z tego względu w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, nastąpił ogromny postęp w opracowywaniu nośników liposomalnych, które starają się sprostać kolejnym wyzwaniom terapeutycznym, szczególnie w nieprzewidywalnych warunkach *in vivo* (Ryc. 6) [61].



Ryc. 6 Rodzaje terapeutycznych liposomów.

7.1. Klasyczne liposomy

Pierwsza generacja liposomów obejmuje klasyczne nośniki zbudowane wyłącznie z fosfolipidów, głównie o charakterze obojętnym i anionowym, oraz cholesterolu. Klasyczne liposomy są również najczęściej badane jako potencjalne nośniki leków, od ich odkrycia w latach 60' do zarejestrowania pierwszych liposomalnych postaci leków w latach 90' XX w., tj. liposomalnej amfoterycyny B, Ambisome (Nexstar, Boulder, CO, USA) oraz doksorubicyny, Myocet (Elan Pharma Int, Princeton, NJ, USA) [62,63].

Istotną wadą konwencjonalnych liposomów, jest stosunkowo krótki czas cyrkulacji w krwiobiegu. W warunkach *in vivo*, po podaniu parenteralnym, klasyczne liposomy są wychwytywane niemal natychmiast przez MPS i gromadzone w wątrobie i śledzionie [64,65]. Klasyczne liposomy wykazują również większą podatność na destabilizację i przedwczesne uwolnienie substancji leczniczej, w wyniku interakcji fosfolipidów z osoczowymi lipoproteinami [66,67]. Ta wada liposomów klasycznych, została wykorzystana w celowanym transporcie substancji leczniczych do układu fagocytarnego [62], m.in. w celu leczenia zainfekowanych makrofagów [68], a także do uzyskania efektu immunomodulującego aktywność makrofagów, w unieszkodliwianiu komórek neoplazmatycznych i zwiększaniu odporności względem czynników infekcyjnych. Pozwoliło to na opracowanie modeli szczepionek przeciwko chorobom wirusowym, bakteryjnym i pasożytniczym [62]. Obecnie, liderem w produkcji szczepionek wytwarzanych w oparciu o technologię liposomalną jest firma Crucell, która opracowała m.in. szczepionkę przeciwko wirusowi grypy Inflexal V i przeciwko wirusowi wirusowego zapalenia wątroby typu A, Epaxal. W badaniach poświęconych fotodynamicznej inaktywacji nowotworów, najczęściej wykorzystywane są klasyczne liposomalne postaci fotouczulaczy [27,29].

7.2. Liposomy długokrążące (ang. long-circulating liposomes)

W celu zwiększenia stabilności konwencjonalnych liposomów w krwiobiegu, do błony liposomalnej wprowadzono cholesterol [69,70]. Efekty tego postępowania nie były jednak w pełni zadowalające. Zwiększoną stabilność liposomów zaobserwowano dla struktur o wielkości poniżej 100 nm, składających się z cholesterolu i fosfolipidów, zawierających długie nasycone łańcuchy acylowe, np. 1,2-distearoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholinę, DSPC [70,71]. Metodyka ta została określona terminem „pure lipid approach”, ponieważ są to jedyne liposomy długokrążące o składzie wyłącznie lipidowym.

Przykładem terapeutycznej postaci tego rodzaju liposomów jest Daunoxome (liposomalna postać daunorubicyny), preparat zarejestrowany na terenie USA i Unii Europejskiej w leczeniu mięsaka Kaposi'ego [63]. Kolejną klasę liposomów długokrażących otrzymał Gabizon i wsp. poprzez wbudowywanie w strukturę liposomów reszt cukrowych kwasu sialowego, sfingolipidów i gangliozydów [72]. Wreszcie, przełomowym wydarzeniem w dziedzinie liposomalnych postaci leku, było otrzymanie liposomów z otoczką hydropolimerową, w których cząsteczki hydrofilowych polimerów są związane kowalencyjnie z powierzchnią nośnika. Stosowane są zarówno polimery naturalne i syntetyczne, takie jak chitosan [73,74], fibroina [75], alkohol poliwinylowy [76], polietylenoglikole (PEG) [77,78]. Polimery wykorzystywane do otrzymywania liposomalnych nośników leków, powinny spełniać szereg wymagań, tj. posiadać wysoką biokompatybilność, niski stopień immunogenności i antygenowości oraz brak toksyczności [70]. Już niewielka liczba polimerowych ligandów na powierzchni liposomu, skutecznie wydłuża czas cyrkulacji nośnika w krwiobiegu. Allen i wsp. wykazali, że liposomy długokrażące wykazują farmakokinetykę liniową pierwszego rzędu, w przeciwieństwie do liposomów klasycznych charakteryzujących się farmakokinetyką nieliniową [79]. PEG jest najczęściej stosowanym polimerowym koniugatem w technologii liposomów. Liposomy pegylowane z otoczką z polietylenoglikolu, są często określane terminem liposomów typu „stealth” ze względu na zminimalizowany wychwyty przez układ MPS. Opisywane są także jako „przestrzennie stabilizowane” (ang. sterically stabilized) z uwagi na zawady przestrzenne wynikające z obecności warstwy PEG, która zabezpiecza przed interakcją liposomów z komponentami komórek oraz środowiskiem biologicznym. Dlatego czas półtrwania liposomów pegylowanych w organizmie człowieka wynosi nawet do 48 h [62]. Wydłużenie czasu cyrkulacji liposomów w krwiobiegu, nasila zdolność ich wychwyty przez tkanki docelowe, np. tkanki nowotworowe, które charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością oraz zdolnością retencji liposomów [80]. Obecnie prowadzone badania dotyczące liposomów pegylowanych, zmierzają do uzyskania takiej formy wiązania polimeru z powierzchnią liposomu, która umożliwi ich akumulację w sąsiedztwie komórek docelowych, a następnie odszczepienie łańcucha polimerowego, pod wpływem mikrośrodowiska panującego w obszarze patologicznej zmiany, np. obniżonego pH w obrębie tkanki zapalnej lub nowotworowej [81,82]. Polimerowe otoczki pozwalają również uzyskać zwiększoną biodostępność liposomalnych postaci leków, podawanych doustnie lub wziewnie [74,82].

Obecnie, jedynym dostępnym produktem zawierającym pegylowane liposomy jest Caelyx/Doxil, zarejestrowany w terapii mięsaka Kaposi'ego, raka jajnika opornego na leczenie i przerzutowego raka piersi [83].

7.3. Liposomy do terapii celowanej

Liposomy do terapii celowanej zostały opracowane w odpowiedzi na konieczność zwiększenia wychwytu substancji aktywnej przez komórki docelowe, przy jednoczesnym zmniejszeniu akumulacji w komórkach zdrowych, będących celem niespecyficznym. Za celowany transport liposomów odpowiadają ligandy np. przeciwciała, peptydy, glikoproteiny, oligopeptydy, polisacharydy, czynniki wzrostu, a także inne cząsteczki np. kwas foliowy, cukry itp. Biologicznym celem liposomów do terapii celowanej są najczęściej różne typy komórek nowotworowych, komórki nabłonkowe, komórki układu immunologicznego [84]. Liposomy do terapii celowanej zaproponowano również do penetracji bariery krew-mózg [85] oraz do uzupełniania ubytków błony komórkowej kardiomiocytów, co pozwala chronić komórki serca przed obumieraniem wskutek niedotlenienia [86].

Ligandy mogą być związane z liposomem wiązaniami kowalencyjnymi i niekowalencyjnymi. W przypadku wiązań kowalencyjnych ligandy mogą łączyć się z fosfolipidami błony liposomalnej, dzięki bezpośrednim lub pośrednim wiązaniom poprzez tzw. spacer zawierający ugrupowanie tioeterowe, amidowe, estrowe lub hydrazonowe. Natomiast wiązania niekowalencyjne powstają wówczas, gdy ligand jest wbudowywany w strukturę błony liposomu [87]. Szczególnie interesującą strategią jest przyłączenie ligandu do warstwy PEG. Ten rodzaj połączenia, z jednej strony pozwala zachować ochronny aspekt warstwy PEG, zapewniającej odpowiednio długi okres cykulacji w krwiobiegu aby dotrzeć w okolice zmiany chorobowej (site targeting). Z drugiej strony, przyłączenie ligandu do dystalnej części łańcucha polietylenoglikolu, zwiększa zdolność interakcji między ligandem a molekularnym celem (cell targeting). Wykazano, że tak skonstruowane liposomy pegylowane z przyłączonym ligandem, wykazują zwiększoną skuteczność terapeutyczną [87,88].

Aby ligand umożliwiał skuteczny wychwyt liposomów przez komórki docelowe, liczba miejsc wiążących na ich powierzchni powinna być odpowiednio duża, żeby efekt terapeutyczny transportowej substancji leczniczej został osiągnięty. Miejsca wiążące (np. określone receptory) muszą być dostępne z krwiobiegu i w sposób ilościowy, powinny

różnić się od zdrowych tkanek. Ponadto, w idealnym układzie miejsca wiążące powinny wykazywać „regulację w górę” (up-regulation) pod wpływem stymulacji ligandu, dostarczanego w każdym kolejnym cyklu terapii [84].

Najprostsze ligandy to małe cząsteczki takie jak kwas foliowy, hormony (np. estrogen), cukry (Tabela 1). Ligandy niskocząsteczkowe mają wiele zalet, gdyż wykazują małą immunogenność, znaczną stabilność chemiczną, a ich synteza jest zwykle prosta [61]. W Tabeli 1 przedstawiono przykłady ligandów wykorzystywanych do otrzymywania liposomalnych postaci substancji o działaniu przeciwnowotworowym, stosowanych w leczeniu nowotworów wykazujących nadekspresję odpowiednich receptorów.

Komórki niektórych ludzkich nowotworów, m.in. raka jajnika, nowotwory nabłonkowe (rak jelita grubego), wykazują zwiększoną ekspresję receptorów folinianowych, ponieważ kwas foliowy jest niezbędny do syntezy kwasów nukleinowych w szybko namnażającej się strukturze nowotworu. Kwas foliowy ma wysokie powinowactwo względem receptorów folinianowych i przenika do komórek w drodze endocytozy [89]. To powinowactwo wykorzystano do transportu wielu substancji przeciwnowotworowych np. doksorubicyny, irinotekanu oraz 5-fluorouracilu przez liposomy z ligandem kwasu foliowego [90–92]. Badania prowadzone w warunkach *in vitro*, wykazywały zwiększony wychwyt liposomów z kwasem foliowym przez komórki nowotworu oraz silniejsze działanie cytotoksyczne leku. Natomiast w warunkach *in vivo* obserwowano zwiększoną skuteczność przeciwnowotworową i zmniejszoną liczbę działań niepożądanych. Liposomy z kwasem foliowym znalazły również zastosowanie w terapii fotodynamicznej nowotworów, zapewniając większy wychwyt fotouczulacza przez komórki z nadekspresją receptorów folinianowych [93].

Kolejną grupę ligandów stanowią ligandy peptydowe o bardziej złożonej strukturze chemicznej. W celu pozyskiwania ligandów peptydowych często stosuje się strategię polegającą na przeszukiwaniu bibliotek fagowych (ang. phage display library). W takich zbiorach gromadzone są zrekombinowane klony bakteriofagów, będące źródłem protein i peptydów o wysokim powinowactwie do określonych typów komórek, w tym komórek nowotworowych. W ten sposób He i wsp. [94] zidentyfikowali peptyd CSNIDARAC, silnie wiążący się z komórkami nowotworu płuc H460, dzięki czemu opracowali liposomalną postać doksorubicyny z ligandem peptydowym, o dużej zdolności internalizacji komórkowej. Podobnie, zidentyfikowano proteinę posiadającą zdolność selektywnego wiązania ze streptawidyną. Wyizolowana proteina została wbudowana do

blony liposomalnej preparatu doksorubicyny - Doxil. Obecnie trwają badania aktywności biologicznej uzyskanego nośnika z proteinami fagowymi na liniach komórkowych [95].

Tabela 1 Przykłady ligandów wykorzystywanych do otrzymywania liposomów stosowanych w terapii celowanej określonych typów nowotworów.

Ligand	Receptor	Typ nowotworu	Substancja przeciwnowotworowa	Ref.
estron	estrogenowy	Rak piersi	doksorubicyna	[96]
hormon uwalniający hormon luteinizujący (LHRH) i analogi	receptory LHRH	Rak jajnika	docetaksel	[97]
siarczan chondroityny	CD44	Rak piersi	etopozyd	[98]
hialuronian	CD44	Guzy lite i przerzuty	-	[99]
laktoza	asialoglikoproteina	Rak wątroby	doksorubicyna	[100]

Molekularnym celem peptydu ApoPep1 są komórki nowotworowe w fazie apoptozy, wykazujące znaczny wzrost ekspresji markerów apoptotycznych. Peptyd ApoPep1 posiada zdolność rozpoznawania komórek w fazie apoptozy, poprzez wiązanie z histonem H1. W badaniach wykazano, że liposomy z ligandem ApoPep1, hamowały wzrost guza nowotworowego u myszy bardziej efektywnie niż „niecelowane” nośniki lipidowe [101]. Ichikawa i wsp. [102] zastosowali pentapeptyd Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) w celu zwiększenia biodostępności pegylowanych liposomów (PegLip) ze związkami fotouczulającym, verteporfin (BPD-MA). Peptyd APRPG został uprzednio pozyskany jako peptyd specyficzny dla pro-angiogennych komórek nabłonkowych. W badaniach *in vivo* na mysim modelu, uzyskano zaskakujące wyniki tj. stwierdzono słabszą akumulację PegLip z ligandem APRPG i inkorporowanym związkiem BPD-MA w obrębie guza. Natomiast w porównaniu do liposomów PegLip BPD-MA, działanie cytotoksyczne liposomów BPD-MA z ligandem peptydowym było czterokrotnie silniejsze w porównaniu do liposomów niemodyfikowanych. Nasileniu działania przeciwnowotworowego, towarzyszyło uszkodzenie naczyń krwionośnych zasilających tkankę nowotworową, co świadczyło o wychwycie liposomów z ligandem peptydowym przez komórki

endotelialne i efekcie antyangiogennym, uzyskanym pod wpływem fotoaktywacji verteporfinu.

Wśród proteinowych ligandów przyłączanych do liposomów w celu zwiększenia selektywnego wychwytu przez tkanki docelowe, najczęściej badana jest transferyna (Tf). Tf jest glikoproteina, która odpowiada za transport jonów żelaza i ulega internalizacji komórkowej na drodze endocytozy, przy udziale receptorów transferyny. Podobnie, jak receptory folinianowe, komórki nowotworów wykazują zwiększoną ekspresję receptorów Tf [88]. Dlatego, Tf i inni agoniści receptorów Tf wykorzystywane są w badaniach jako ligandy dla celowanych liposomów zawierających substancje przeciwnowotworowe np. oksaliplatynę i doksorubicynę [103,104]. Kobayashi i wsp. [105] zaproponowali wykorzystanie mechanizmu celowanego transportu doksorubicyny liposomalnej przy udziale transferyny, umożliwiającego ominięcie mechanizmu oporności lekowej, wynikającego z aktywności glikoproteiny P.

Transferyna jest również stosowana w liposomach wykorzystywanych w PDT do transportowania fotouczulaczy, np. hiperycyny, pochodnych ftalocyjaniny [106–109]. Gijssens i wsp. [107] uzyskali selektywny wychwyty ftalocyjaniny ALPcS4 w liposomach z Tf przez komórki HeLa, i 10-krotnie wyższy efekt cytotoksyczny w porównaniu do wolnej formy badanego związku. Niestety część prób zastosowania liposomów z Tf nie powiodła się. W badaniach hiperycyny, Derycke i wsp. [106] zaobserwowali przedwczesne uwolnienie z liposomów fotouczulacza, którego hydrofilowe cząsteczki wykazują duże powinowactwo do białek osocza. Nie powiodła się również próba nasilenia aktywności przeciwnowotworowej temoporfinu, przez inkorporowanie związku do liposomów z ligandami Tf [109]. Jak wykazują badania, uzyskanie efektu transportu celowanego liposomów do komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*, jest dużo łatwiejsze niż na modelach zwierzęcych. Derycke i wsp. [108], aby zwiększyć wychwyty ALPcS4 przez komórki nowotworu pęcherza moczowego u szczurów, przed rozpoczęciem terapii usunęli enzymatycznie (za pomocą chondroitynazy) warstwę glikokaliksu, która blokowała dostęp do receptorów Tf na powierzchni komórek nowotworowych.

8. Drogi podania substancji leczniczych inkorporowanych w liposomy

Najpowszechniejszym sposobem podawania liposomalnych substancji leczniczych jest droga dożylna, tj. wstrzyknięcie lub wlew dożylny. Szczepionki, wykorzystujące nośniki lipidowe, są najczęściej aplikowane domięśniowo. Wybór drogi podania jest często podyktowany efektem, jaki ma wywołać substancja czynna. Układ chłonny uczestniczy w rozprzestrzenianiu się chorób nowotworowych i infekcyjnych. Leki podawane podskórnym w ograniczonym stopniu przenikają do krwiobiegu i są wychwytywane w dużym stopniu przez naczynia limfatyczne. Dlatego właśnie ta droga podania umożliwia dostarczanie leków i środków diagnostycznych bezpośrednio do układu chłonnego [88,110]. Strategię taką zastosował Fujimoto i wsp. [111], podając podskórnym nośnik liposomalny, z fosfolipidem zawierającym jony gadolinu, do wykrywania przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych królików, metodą magnetycznego rezonansu jądrowego.

8.1. Droga doustna

Podaż doustna liposomów jest utrudniona, ponieważ, struktury lipidowe, ulegają degradacji w wyniku działania enzymów trawiennych, obecnych w przewodzie pokarmowym. Dlatego też, liposomy do podawania drogą *per os* są pokrywane ochronną warstwą polimerową [88].

Zespół badawczy pod kierunkiem Wu [112,113], opracował doustną postać insuliny oraz cyklosporyny A, które zostały inkorporowane w liposomy pokryte warstwą utworzoną z soli kwasu glikocholowego. Liposomalna cyklosporyna A, w badaniach *in vivo* na szczurach wykazała lepszą biodostępność w porównaniu z preparatem Neoral [113]. Natomiast, liposomy transportujące insulinę nie zostały poddane badaniom *in vivo*, ale stanowiły skuteczną ochronę przed enzymatycznym rozkładem w warunkach *in vitro* [112]. Zachowanie hipoglikemicznej aktywności insuliny, po podaniu doustnym, wykazano dla liposomów zawierających otoczkę z PEG, mucyny [114] oraz chitosanu [115].

W ostatnich latach, na rynku farmaceutycznym pojawia się coraz więcej leków przeciwnowotworowych w formie doustnej. Jain i wsp. [116] otrzymali doustną, liposomalną postać doksorubicyny. Zewnętrzna błona liposomalna jest stabilizowana polimerową otoczką złożoną z dwóch polimerów o przeciwnym ładunku, tj. poliakryloamidu i chlorowodorku polialliloaminy.

Badania doustnych form liposomalnych obejmują także szczepionki, szczególnie nowej generacji, zawierające kwasy nukleinowe. Ocena skuteczności doustnej podaży liposomalnych szczepionek jest skomplikowana, często niezależna od sposobu podania, ponieważ wynika z właściwości i niskiej stabilności transportowanych fragmentów DNA lub RNA [117,118].

8.2. Wziewna droga podania

Wziewna droga podania leków, umożliwia leczenie nie tylko chorób dróg oddechowych takich jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, gruźlica, mukowiscydoza, ale w niektórych przypadkach pozwala uzyskać działanie ogólnoustrojowe. W 2008 roku Gaspar i wsp. [119] dokonali szczegółowego przeglądu leków, których liposomalna postać jest stosowana w formie inhalacji. Obecnie leki do podawania drogą wziewną, znajdujące się w badaniach przedklinicznych, klinicznych lub w praktyce klinicznej, obejmują liposomalne formułacje, takich substancji leczniczych, jak: beklometazon [120,121], salbutamol [122], triamcinolon [123], interleukina-2 [124], morfina [125], fentanyl [126].

Ciekawym przykładem rozwoju liposomalnej formułacji, są badania dotyczące opracowania liposomalnej postaci iloprostu. Ventavis (Iloprost) jest stosowany w leczeniu pierwotnego nadciśnienia płucnego, rzadkiej choroby przewlekłej o niekorzystnym rokowaniu. Iloprost charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania i wynikającą stąd koniecznością dość częstego dawkowania leku, nawet do 6-9 razy w ciągu doby. Częste inhalacje są kłopotliwe dla pacjentów, co często przyczynia się do nieprzestrzegania zasad terapii. Dlatego też, oczekuje się, że liposomalna postać iloprostu pozwoli uzyskać produkt o zmodyfikowanym profilu uwalniania, dzięki czemu możliwe będzie zmniejszenie częstotliwości dawkowania i poprawienie jakości życia pacjentów [127].

8.3. Liposomalne postaci leków do użytku zewnętrznego

Liposomy wzbudzały duże nadzieje jako potencjalne nośniki leków o działaniu miejscowym. Okazało się jednak, że lipidowe struktury są zbyt duże i za mało elastyczne, aby mogły łatwo penetrować i przenikać warstwę rogową naskórka. Mimo to, nośniki o składzie zbliżonym do elementów budulcowych naskórka, posiadają zdolność efektywnego dostarczania substancji leczniczych w schorzeniach dermatologicznych

[128,129]. W celu zwiększenia elastyczności klasycznych liposomów, opracowano nowe struktury zbudowane z fosfolipidów (głównie lecytyny), surfaktantów (chołanu i deoksychołanu sodu, polisorbatu) i alkoholu etylowego (do 10%). Elastyczne liposomy, nazwane terminem transferosomy, zostały po raz pierwszy zastosowane przez Gregora Cevc'a (Idea, Monachium). Transferosomy łatwo ulegają odkształceniom i dlatego są zdolne do przenikania przez warstwę rogową. Transferosomy mogą przenikać do krwiobiegu i pozwalają uzyskać stężenie substancji leczniczej we krwi, zbliżone do podania podskórnego. Pierwszym produktem, w którym wykorzystano technologię transferosomów był Diractin – liposomalna postać ketoprofenu, przeznaczona do objawowego leczenia zapalenia i bólu w chorobie zwyrodnieniowej stawów [130].

Liposomy zostały wykorzystane w badaniach jako nośniki wielu substancji leczniczych stosowanych miejscowo, na skórę, m.in. anestetyków lidokainy [131] i ropiwakainy [132], leków przeciwgrzybiczych – amfoterycyny B [133], przeciwnowotworowych – 5-fluorouracylu [134], stosowanych w terapii hormonalnej, jak np. tamoksifen [135]. Maghraby i wsp. przedstawili wiele przykładów leków transportowanych w liposomach do podawania przezskórnego oraz transdermalnego, jak również zastosowania liposomów jako modelu błon komórkowych [129].

8.4. Drogi podania liposomalnych fotouczulaczy

Związki fotouczulające stosowane w praktyce klinicznej są podawane pacjentom drogą dożylną. Ta droga podania dominuje również w prowadzonych badaniach przedklinicznych i klinicznych. Jedyne dostępne na rynku fotouczulacz w formie liposomalnej, Visudyne, jest podawany w postaci 10 min. infuzji dożylniej [136].

Ponieważ jednym ze wskazań terapeutycznych PDT są schorzenia dermatologiczne, opracowywane są formy liposomalnych fotouczulaczy do aplikacji na skórę. Według Dragicevic-Curic i wsp., fotouczulacze inkorporowane w liposomy wykazują większą zdolność penetracji. Spośród fotouczulaczy porfirynoidowych w liposomach badano kwas 5-aminolewulinowy (ALA) i 5,10,15,20-tetrakis(3'-hydroksyfenylo)-chlorynę (Temoporfin, mTHPC, Foscan) [137]. ALA podawany jest miejscowo głównie w leczeniu łuszczycy, rógowacenia słonecznego, trądziku, niestety jako związek hydrofilowy wykazuje słabą penetrację naskórka i skóry. Dlatego też poszukiwano nowej strategii pozwalającej poprawić penetrację tkankową ALA. Dwa równoległe i z powodzeniem rozwijane nurty badawcze, to synteza hydrofobowych estrów ALA oraz inkorporacja

w lipidowe struktury [138]. Początkowe badania nie wskazywały na poprawę skuteczności terapeutycznej ALA w następstwie liposomalnej inkorporacji. Dopiero, Pierre i wsp. [139], opracowali liposomy o składzie zbliżonym do warstwy rogowej naskórka ssaków, uzyskując takie nasilenie penetracji ALA w obrębie skóry, które umożliwiłoby leczenie zmian nowotworowych. Oh i wsp. [140] oceniali stopień penetracji i retencji ALA stosowanej miejscowo w formie elastycznych liposomów, ze zróżnicowanym ładunkiem powierzchniowym (UDL). W porównaniu do liposomów obojętnych, UDL wykazały, przy tej samej efektywności inkorporacji ALA, większą stabilność, lepszą zdolność penetracji i dłuższy czas retencji w obrębie naskórka.

Johansson i wsp. [141] uzyskali obiecujący efekt terapeutyczny stosując żel zawierający liposomalną mTHPC, w miejscowym leczeniu skórnych zmian nowotworowych na mysim modelu zwierzęcym. Zaplanowano wdrożenie formułacji liposomalnej mTHPC do oceny skuteczności leczenia nowotworów skóry w badaniach klinicznych. Ostatnio, Dragicevic-Curic i wsp. [142] przedstawili badania opisujące procedurę przygotowania oraz oceny właściwości reologicznych i stabilności hydrożelowych formułacji liposomalnych mTHPC do użytku zewnętrznego.

Kolejnym sposobem podawania liposomalnych fotouczulaczy jest aplikacja bezpośrednio do guza, stosowana w tzw. śródmiąższowej PDT. Po podaży fotouczulacza, podskórnice wprowadzany jest światłowód wbudowany w igłę, w celu równomiernego naświetlenia guza i aktywacji zakumulowanego fotouczulacza. Strategię taką zastosował Jeżek i wsp. [143] porównując efektywności działania liposomalnej meso-tetrakisfenyloporfiryny po podaniu dożylnym i bezpośrednio do guza. Wykazano większą skuteczność działania fotouczulacza po zastosowaniu wstrzyknięcia i.v. Xiao i wsp. [144] oceniali skuteczność fotodynamicznego leczenia nowotworów prostaty u psów, podając lipofilny fotouczulacz, inkorporowany w liposomy w postaci wstrzyknięcia do tętnicy, bezpośrednio unaczyniającej tkankę guza.

9. Zastosowanie liposomalnych postaci leków w terapii przeciwnowotworowej

Leki przeciwnowotworowe to najintensywniej badana grupa środków leczniczych w technologii liposomalnej. Pierwsze wzmianki o korzystnym wpływie liposomów na właściwości farmakokinetyczno-farmakodynamiczne leków o aktywności przeciwnowotworowej, pojawiły się już w latach 70' XX w. [145]. W kolejnym dziesięcioleciu nastąpił znaczny postęp rozwoju liposomalnych postaci leków,

uwarunkowany pracami badawczo-rozwojowymi firm biotechnologicznych, głównie w USA (Tabela 2) [52,146].

Tabela 2 Produkty zarejestrowane oraz znajdujące się w badaniach klinicznych, zawierające liposomalną postać substancji leczniczej i posiadające wskazania w terapii przeciwnowotworowej [146].

Nazwa produktu leczniczego (Producent)	Substancja lecznicza	Wskazania	Status
Zarejestrowane produkty lecznicze			
Doxil/Caelyx (Johnson&Johnson)	Dokсорubicyna	mięsak Kaposi'ego, rak jajnika rak piersi szpiczak mnogi (w skojarzeniu z Velcade)	1995 1999 2003 2007 (Kanada, EMA)
DaunoXome (Galen)	Daunorubicyna	Mięsak Kaposi'ego	1996 (EMA, FDA)
Myocet (Cephalon)	Dokсорubicyna	Rak piersi	2000 (EMA)
DepoCyte (Pacira)	Arabinozyd cytozyny (Cytarabina)	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych w przebiegu chłoniaka	1999 (EMA, FDA)
Lipo-Dox (Taiwan Liposome)	Dokсорubicyna	mięsak Kaposi'ego, rak jajnika i piersi	2001 (Tajwan)
Marqibo (Talon)	Winkrystyna	Ostra białaczka limfoblastyczna	2012 (FDA)
Przykłady produktów badanych w badaniach klinicznych			
CPX-351 (Celator)	Cytarabina:Daunorubicyna	Ostra białaczka szpikowa	Faza II
MM-302 (Merrimack)	Dokсорubicyna z przeciwciałem HER2	Rak piersi z nadekspresją receptora HER2	Faza I
ThermoDox (Celsion)	Dokсорubicyna inkorporowana w liposomy wrażliwe na podwyższoną temperaturę,	w skojarzeniu z ablacją przezskórną w: pierwotnym raku wątroby miejscowym nawrocie raka piersi przerzutach nowotworu jelita grubego do wątroby	Faza III Faza II Faza II
Stimuvax (Oncothyreon/Merck)	Szczepionka przeciwnowotworowa Anti-MUC1	Niedrobnokomórkowy rak płuc wykazujący nadekspresję MUC1	Faza III

Wczesne badania na modelach zwierzęcych wykazały, że stężenie leku przeciwnowotworowego jest wyższe w niektórych rodzajach komórek nowotworowych w porównaniu do zdrowych tkanek. Gregoriadis i wsp. przedstawili następujące czynniki odpowiedzialne za zjawisko nasilonego wychwytu leku przez tkankę nowotworową: 1) efekt zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych cząstek przez naczynia guza (tzw. efekt EPR, ang. enhanced vascular permeability and retention), 2) powolne uwalnianie leku z liposomu, 3) zwiększoną aktywność endocytarną w komórkach nowotworowych, 4) wychwyt liposomów przez makrofagi, które następnie transportują liposomalną formę leku do komórek nowotworowych [147]. Efekt EPR jest często wykorzystywany w pasywnym dostarczaniu leków przeciwnowotworowych w formie połączeń z nośnikami lipidowymi, co uwarunkowane jest anatomiczną budową naczyń krwionośnych guza [148]. Zdrowe tkanki najczęściej posiadają zwartą strukturę śródbłonna naczyń włosowatych (wielkość porów 2-6 nm), natomiast sieć naczyń krwionośnych zaopatrujących tkankę nowotworową jest nieszczelna, ponieważ powstaje w wyniku chaotycznej neoangiogenezy (wielkość porów 100-800 nm). Większość niskocząsteczkowych leków przeciwnowotworowych, z powodu małego rozmiaru cząsteczek, dyfunduje dość swobodnie przez śródbłonek naczyń zarówno do prawidłowych, jak i nowotworowych tkanek. Z tego względu efekt cytotoksyczny wywierany jest wobec zdrowych tkanek, co prowadzi do działań niepożądanych i determinuje niską wartość indeksu terapeutycznego. Pod wpływem inkorporacji leku w liposomy, przenikanie lipidowego nośnika wraz z lekiem przez zdrowy nabłonek naczyniowy jest utrudnione. Ponadto cząsteczka substancji leczniczej w liposomach jest chroniona przed inaktywacją w krwiobiegu i rozkładem enzymatycznym, co wydłuża czas cyrkulacji w krwiobiegu i sprzyja bardziej efektywnemu dostarczaniu leku do tkanki nowotworowej. Powyższe czynniki wyjaśniają zmniejszoną toksyczność leków przeciwnowotworowych enkapsulowanych w liposomy [149,150].

W roku 1999, zespół wybitnego badacza liposomalnych nośników leków, Demetrios Papahadjopoulos'a, przedstawił artykuł przeglądowy opisujący wpływ różnych właściwości liposomów na profil działania leków onkologicznych oraz optymalizację składu liposomów, zapewniającą jak najlepszy efekt terapeutyczny inkorporowanego leku [57]. Według ww. autorów, lek przeciwnowotworowy, który poddawany jest inkorporacji liposomalnej powinien mieć dobrze zdefiniowane spektrum działania przeciwnowotworowego, wykazywać aktywność przeciwko różnym typom nowotworów, efektywną zdolność enkapsulacji oraz stabilność w formie liposomalnej.

Wiele zróżnicowanych chemicznie, leków przeciwnowotworowych badano z zastosowaniem liposomów głównie: antybiotyki antracyklinowe (doksorubicynę, daunorubicynę), alkaloidy *Vinca* (winkrystynę, winorelbinę, winblastynę), cytarabinę, topotekan, paklitaksel. Część z nich uzyskała akceptację władz rejestracyjnych w USA i Europie, a wiele innych produktów jest poddawanych badaniom w różnych fazach badań klinicznych (Tabela 2).

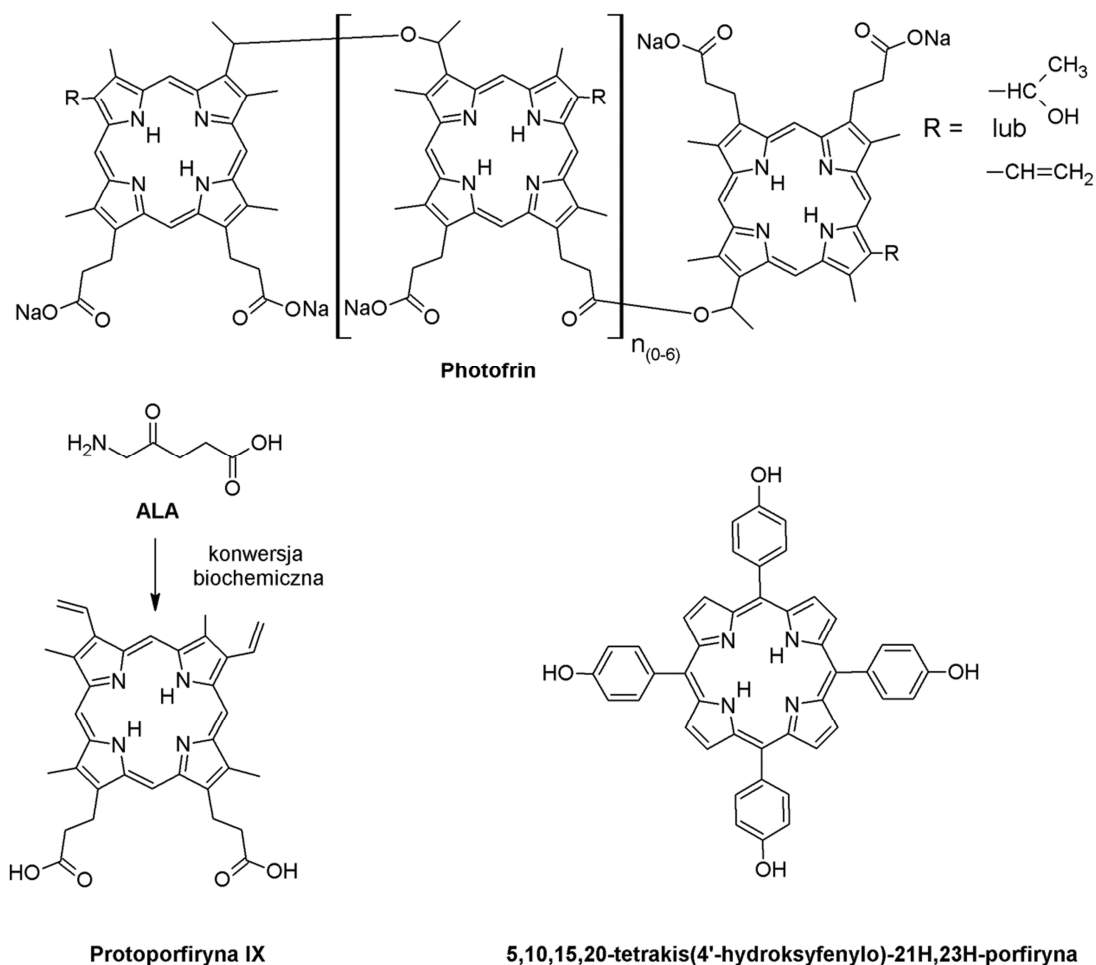
Barenholz i wsp. podzielili substancje przeciwnowotworowe stosując jako kryterium m.in. współczynnik podziału oktanol/woda [151]. W przypadku substancji hydrofilowych, ich liposomalne formułacje mają ograniczone znaczenie, z uwagi na niską biodostępność i stopień uwolnienia z nośnika. Jednak, leki hydrofile transportowane przez nośniki błonowe, jak np. cytarabina czy metotreksat, mogą być stosowane z powodzeniem w postaci liposomalnej, o ile lek zostanie uwolniony w wystarczającej ilości w sąsiedztwie tkanki nowotworowej. W odniesieniu do lipofilnych substancji leczniczych, liposomy pełnią bardziej rolę „solubilizatora” niż nośnika zwiększającego transport leku do tkanki nowotworowej. Dobrze obrazuje to przykład paklitakselu, związku wysoce hydrofobowego, który związany jest głównie w zewnętrznej powierzchni błony liposomalnej, skąd może szybko ulec redystrybucji do osocza. Grupą leków, które w największym stopniu „wykorzystują” transportowe zdolności liposomów są leki amfipatyczne, takie jak np. antracykliny i alkaloidy *Vinca*. Dzięki opracowaniu metody enkapsulacji leku, wykorzystującej gradient pH, uzyskać można stabilne liposomy, a transportowane przez nie amfipatyczne substancje lecznicze są uwalniane w obrębie nowotworu [57,151].

10. Liposomalne fotouczulacze stosowane w PDT

Liposomy są nośnikami najczęściej wykorzystywanymi do transportu substancji fotouczulających w PDT. Liposomalny nośnik, w przypadku substancji fotouczulających, pełni przede wszystkim rolę czynnika „solubilizującego”, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie biokompatybilnej formy fotouczulacza do podaży pozajelitowej. Ponadto, w strukturze liposomu cząsteczka fotouczulacza występuje w formie monomerycznej, co jest istotne z uwagi na negatywny wpływ agregacji fotouczulacza, na właściwości fizykochemiczne, a przede wszystkim zdolność generowania tlenu singletowego, decydującego o skuteczności terapeutycznej. Zauważono także, że liposomalna (zwłaszcza pegylowana) postać fotouczulacza, niejednokrotnie wykazuje wydłużony okres półtrwania

w krwiobiegu i lepszy wychwyty przez tkankę nowotworową. Inkorporacji liposomalnej poddawano fotouczulacze zróżnicowane pod względem struktury chemicznej i właściwości fotochemicznych, reprezentujące liczne związki fotouczulające pierwszej i drugiej generacji [27–29].

10.1. Liposomalne pochodne porfiryn



Ryc. 7 Pochodne porfiryn inkorporowane w liposomy do badań w PDT (ALA – kwas 5-aminolewulinowy).

Pierwsza generacja fotouczulaczy obejmuje pochodne hematoporfiryny (HPD), które zostały wyizolowane z hemoglobiny, przy użyciu 5% roztworu kwasu siarkowego w kwasie octowym w temperaturze pokojowej. Następnie w wyniku alkalizacji, otrzymano mieszaninę dimerów i oligomerów połączonych wiązaniami estrowymi i eterowymi. Dzięki zastosowaniu metod HPLC oraz chromatografii żelowej, wyselekcjonowano najbardziej aktywne jednostki [22]. Uzyskany produkt Photofrin (porfimer sodowy, QLT

PhotoTherapeutics, Ryc. 7), został zarejestrowany przez FDA w USA i w Kanadzie w leczeniu nowotworu przetyku, nowotworu Barrett'a, niedrobnokomórkowego raka płuc [20]. Natomiast jego analog europejski, Photobarr, został wycofany przez EMA w 2012 roku [152].

HPD była pierwszym fotouczulaczem wprowadzonym do praktyki klinicznej oraz pierwszym, który został enkapsulowany w liposomy z uwagi na słabą rozpuszczalność w wodzie i formowanie agregatów [153]. Pierwsze badania farmakokinetyczne HPD, inkorporowanej w małe liposomy z 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DPPC), przeprowadzono u myszy z mięsakiem MS-2 (podanie dootrzewnowe, 5 mg/kg m.c.). Wykazano, że liposomalna HPD w porównaniu z roztworem HPD, znacznie wolniej gromadziła się w tkance nowotworowej, osiągając dwukrotnie wyższe stężenie niż w skórze, przy czym jednocześnie stężenie fotouczulacza w powłokach ciała było bardzo niskie, co sprzyjało redukcji ryzyka wystąpienia działania fototoksycznego [154]. Jiang i wsp. otrzymali liposomy zbudowane z DPPC z inkorporowanym porfimerem sodu i porównywali wychwyty leku przez szczurze i ludzkie komórki glejakomięsaka. Porfimer sodu podawano w formie liposomalnej oraz w postaci roztworu w glukozie. Zwiększony wychwyty liposomalnej postaci fotouczulacza wywołał znacznie silniejszy efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych [155].

Przedmiotem wielu badań, było określenie podatności określonych struktur fotouczulaczy na inkorporację liposomalną, ocena wpływu inkorporacji liposomalnej fotouczulaczy na ich właściwości, czy badanie lokalizacji fotouczulaczy porfiryroidowych w obrębie podwójnej lipidowej błony. Liposomy stanowiły w tych badaniach zarówno model błony komórkowej, jak też potencjalnego nośnika. Ricchelli i wsp. [156] oceniali powinowactwo HPD i protoporfiryny (PP) do polarnych i niepolarnych regionów lipidowej monowarstwy o zróżnicowanej budowie chemicznej. Zarówno HPD jak też PP, wybiórczo gromadzą się w obrębie wewnętrznej monowarstwy lipidowej liposomu, przy czym HPD w sąsiedztwie polarnych grup, natomiast PP w pobliżu łańcuchów acylowych. Wzrost płynności błony lipidowej w skutek zmiany składników lipidowych (dodatek kardiolipiny) lub wzrostu temperatury, sprzyjał przesunięciu porfiryn w zewnętrzne rejony lipidowej dwuwarstwy. Liposomy są doskonałym nośnikiem dla hydrofobowych porfiryn i jak przedstawiają badania, porfiryny inkorporowane w strukturę lipidową zachowują właściwości spektralne i zdolność generowania tlenu singletowego. Oznacza to, że po inkorporacji liposomalnej, porfiryny występują w formie monomerów. Ponadto Postigo i wsp. [157] wykazali, że podatność hydrofobowych porfiryn na enkapsulację w liposomy jest skorelowana

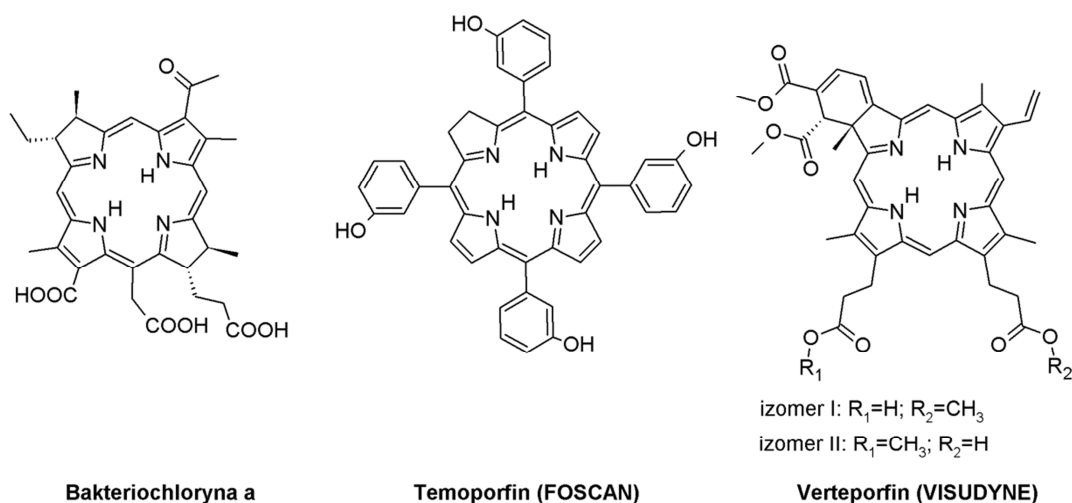
z tendencją do tworzenia agregatów w roztworach wodnych. Inkorporacja liposomalna tetrafenylporfiryny cynkowej, która nie agregowała w roztworze wodnym, okazała się najbardziej efektywna w porównaniu do innych metalowanych i demetalowanych tetrafenylowych i tetrapirydylowych pochodnych porfiryny.

Nawalany i wsp. [158] zbadali dwa układy fotouczulające: 1) 5,10,15,20-tetrakis(4'-hydroksyfenilo)porfirynę (pTHPP, Ryc. 7) inkorporowaną w liposomy typu Stealth oraz 2) pTHPP z kowalencyjnie przyłączonymi łańcuchami PEG. W badaniach aktywności biologicznej wykorzystano linie komórkowe wyizolowane z nowotworu okrężnicy i prostaty. Liposomalny nośnik wykazał największą skuteczność w aspekcie dostarczania do komórek docelowych, monomerycznej formy hydrofobowego fotouczulacza, w przeciwieństwie do pegylowanej i wolnej formy leku. Obydwa układy fotouczulające pTHPP, spowodowały spadek toksyczności w tzw. fazie ciemnej badania, natomiast ich efekt fotocytotoksyczny okazał się słabszy niż dla formy „wolnej” pTHPP.

Liposomalne formy porfiryn zyskały także zainteresowanie w mikrobiologii i parazytologii. Ferro i wsp. [159] z powodzeniem eradykowali metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus*, stosując porfiryny obdarzone ładunkiem dodatnim, inkorporowane w kationowe liposomy. Natomiast nowe fotouczulacze acenaftalenoporfiryny, w warunkach *in vivo*, wykazały lepszy efekt przeciwko gatunkowi *Leishmania panamensis* niż stosowany w leczeniu leishmaniozy, antymonian megluminy [160].

Kwas 5-aminolewulinowy (ALA, Ryc. 7) jest związkiem endogennym, produktem pośrednim w procesie biosyntezy hemu. W wyniku jego konwersji powstaje protoporfiryna IX (PP IX), skuteczny endogenne fotouczulacz. ALA wykorzystywany jest jako pro-lek do otrzymywania endogennej PP IX, która gromadzi się w zmianach patologicznych, ale również w zdrowych tkankach. Pewną selektywność działania ALA, uzyskano stosując leczenie miejscowe, w terapii chorób dermatologicznych np. łuszczycy, rogowacenia słonecznego, trądziku. Liposomalne postaci ALA opracowywano w celu uzyskania lepszej penetracji warstw skóry przez związek fotouczulający, co opisano w punkcie 8.4. Ponadto 0,5% spray zawierający liposomalną postać ALA wykorzystywano w leczeniu trądziku, uzyskując bardzo dobry efekt terapeutyczny przy minimalnych działaniach niepożądanych. Dzięki tym zaletom ALA-PDT stanowi alternatywę dla antybiotykoterapii, zwłaszcza gdy uwzględni się narastającą oporność bakterii na szereg antybiotyków [161,162]. Dodatkowo o profilu bezpieczeństwa liposomalnej ALA świadczą doniesienia o dobrych efektach kosmetycznych, uzyskiwanych w zabiegu usuwania zmarszczek z zastosowaniem preparatu Photospray [163].

10.2. Liposomalne pochodne bakteriochloryn i chloryn



Ryc. 8 Pochodne bakteriochloryn i chloryn inkorporowane w liposomy do badań w PDT.

Chloryny i bakteriochloryny to zredukowane porfiryny, powstające w wyniku rozerwania wiązań podwójnych pierścieni pirolowych i przyłączenia 2 lub 4 atomów wodoru.

Bakteriochloryna a (BCA, Ryc. 8) o potencjalnym zastosowaniu w fotodynamicznej terapii nowotworów, należy do fotouczulaczy drugiej generacji. Właściwości fotochemiczne BCA w formie wolnej i liposomalnej intensywnie badał belgijski zespół Damoiseau i wsp. [164,165]. BCA w roztworach wodnych ulega częściowej agregacji, przy czym ustala się stan równowagi między monomerem a dimerem. Dla postaci liposomalnej BCA, Damoiseau i wsp. stwierdzili, dziewięciokrotny wzrost wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego oraz niemal czterokrotny wzrost wydajności kwantowej stanu trypletowego, w porównaniu do wartości uzyskanych w wodnym roztworze BCA. Powyższe obserwacje przypisali, zwiększeniu udziału formy monomerycznej BCA, po wbudowaniu związku w liposomy.

10.2.1. Liposomalne postaci temoporfinu

Chloryny to dotychczas najbardziej efektywna klinicznie grupa fotouczulaczy. Aż dwa fotouczulacze, będące pochodnymi chloryn, tj. Foscan (mTHPC) i Visudyne (Verteporfin), zostały zarejestrowane przez FDA i EMA (Foscan tylko przez EMA) i są

stosowane w praktyce klinicznej (Ryc. 8). Foscan jest stosowany w formie „wolnej”, jednak jego dwie formy liposomalne są doskonałym przykładem rozwoju liposomalnego nośnika, począwszy od formy konwencjonalnych liposomów (klasycznych) do bardziej złożonych nośników. Temoporfin jest jednym z najbardziej skutecznych fotouczulaczy drugiej generacji [166]. Charakteryzuje się ściśle określoną strukturą chemiczną (w przeciwieństwie do Photofrinu), maksimum absorpcji pasma Q odpowiada promieniowaniu o długości fali 652 nm, a skuteczność terapeutyczna została oceniona jako ok. 100-200 razy silniejsza niż w przypadku Photofrinu [167]. Badania i rozwój cząsteczki mTHPC był prowadzony przez firmę biotechnologiczną Scotia Pharmaceuticals Ltd, we współpracy z Boehringer Ingelheim, w Wielkiej Brytanii. W 1999 r., FDA przyznała mTHPC status leku sierociego, a EMA rozpoczęła procedurę rejestracyjną. Niestety, zgoda rejestracyjna została uchylona najpierw przez FDA, a następnie przez EMA. Ostatecznie, mTHPC została zarejestrowana przez EMA w 2001 pod nazwą Foscan, ze wskazaniami do paliatywnego leczenia zaawansowanego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi u pacjentów, u których nie można zastosować radioterapii oraz zawiodły wcześniej stosowane metody leczenia chirurgicznego lub ogólnoustrojowego. Trudności rejestracyjne spowodowały przejście Scotia Pharmaceuticals przez niemiecką firmę Biolitec AG, która od 2002 r. zajmuje się dystrybucją Foscanu i wspiera dalsze prace badawczo-rozwojowe [166].

Zgodnie z Charakterystyką Produktu Leczniczego, Foscan podaje się w powolnym wstrzyknięciu dożylnym, trwającym nie krócej niż 6 minut, w dawce 0,15 mg/kg masy ciała. mTHPC jest związkiem trudno rozpuszczalnym w wodzie, a roztwór do wstrzykiwań przygotowywany jest przez rozpuszczenie liofilizatu w mieszaninie bezwodnego etanolu i glikolu propylenowego. Foscanu nie należy rozcieńczać roztworem wodnym, z uwagi na podatność do tworzenia agregatów. Agregacja wpływa na profil farmakokinetyczny (pojawianie się następujących po sobie wartości stężeń maksymalnych), ogranicza biodystrybucję i może zmniejszać skuteczność leczenia. Ponadto, agregaty tworzące się w okolicy miejsca podania leku, mogą prowadzić do rozwoju stanu zapalnego [168]. Firma Biolitec podjęła badania mające na celu opracowanie liposomalnej postaci temoporfinu. Foslip to pierwsza z zaproponowanych formułacji liposomalnych mTHPC. Podstawowe składniki lipidowe nośnika to DPPC i 1,2-dipalimitoilo-*sn*-glycero-3-fosfoglicerol (DPPG). Rola DPPG polega na zwiększeniu fizykochemicznej stabilności formułacji, dzięki obecności ujemnego ładunku [169]. Kolejny etap prac nad rozwojem liposomalnej postaci mTHPC, zaowocował uzyskaniem liposomów długokrzążących Fospeg. Formułacja

ta ma skład konwencjonalnych liposomów (Foslip), wzbogacony pegylovaną 1,2-distearoiloilo-*sn*-glycero-3-fosfoetanolaminą, stanowiącą 2% całkowitej zawartości lipidów [169,170]. Obydwie formułacje liposomalne temoporfenu, Foslip i Fospeg, zostały poddane intensywnym badaniom obejmującym zakres badań podstawowych, tj. charakterystyki dotyczącej zarówno właściwości fizykochemicznych mTHPC inkorporowanej w liposomy, jak również samych liposomów. Ocena obejmowała również badania biologiczne na modelach komórkowych i zwierzęcych, włącznie z analizą właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

Na przykładzie dwóch formułacji Foslip i Fospeg, można zauważyć w jaki sposób skład lipidowy liposomów determinuje stan termodynamiczny, a tym samym płynność błony liposomalnej, co istotnie wpływa na uwalnianie leku i farmakokinetykę. Stosunek molowy mTHPC do lipidów w formułacji Foslip i Fospeg wynosi 1:10, a temperatura przejścia fazowego występuje poniżej temperatury 37 °C, dlatego uporządkowanie lipidów ma charakter płynno-krystaliczny [169,171]. Skład lipidowy formułacji Foslip, bez inkorporowanej mTHPC wskazuje, że w temperaturze 37 °C posiada ona charakter żelu ($T_c = 42$ °C). W wyniku inkorporacji mTHPC, następuje obniżenie temperatury przejścia fazowego. Obecność pegylovanych lipidów w strukturze Fospeg, nie wpływa znacznie na właściwości termodynamiczne. Jednak, Kuntsche i wsp. [169] badając formułacje liposomalne mTHPC, zidentyfikowali w pegylovanych liposomach wiele struktur micelarnych, które mogą zmieniać profil uwalniania inkorporowanego leku. Badania Compagnin i wsp. [170] wykazały, że obecność i rodzaj warstwy polietylenoglikolowej, tzn. zawartość PEG, długość łańcucha PEG, może wywierać wpływ zarówno na stopień wychwytu liposomów przez komórki docelowe jak również efekt cytotoksyczny inkorporowanej mTHPC.

W badaniach liposomalnych postaci temoporfenu, tj. Foslip i Fospeg, analizowano stopień agregacji związku w lipidowym nośniku. Przeprowadzona analiza widm absorpcji mTHPC inkorporowanej w liposomy oraz w roztworze etanolowym, jednoznacznie wykazała, że temoporfenu w liposomach występuje w postaci monomeru [172,173]. Reshetov i wsp. [174] zaobserwowali jednak przesunięcie pasma Soreta w kierunku dłuższych fal, wraz ze wzrostem stosunku molowego fotouczulacz : lipidy. Przesunięcie pasma Soreta, które było bardziej zaznaczone w przypadku formułacji pegylowanej (Fospeg) niż Foslip, przypisano tworzeniu agregatów. Według w/w autorów tylko niewielka część mTHPC w liposomach występuje w formie agregatów, ponieważ przesunięciu pasma, nie towarzyszyła zmiana jego kształtu ani wartości współczynnika molowego absorpcji.

Metodę analizy wygaszania fluorescencji i absorpcji, zastosowano do oceny lokalizacji mTHPC w obrębie struktury liposomów, uwalniania mTHPC z liposomów oraz redystrybucji do białek osocza np. albumin i lipoprotein [171,172,174,175]. Jak wykazano w wielu badaniach, rozmieszczenie mTHPC jest zróżnicowane w obydwu formułacjach liposomalnych i wpływa na profil farmakokinetyczny mTHPC. W klasycznych liposomach Foslip, mTHPC jest rozmieszczona w obrębie lipidowej dwuwarstwy, a jej uwalnianie przebiega powoli i ma charakter jednoetapowy. Natomiast, w produkcie Fospeg, stwierdzono obecność dwóch rezerwuarów mTHPC [170,174]. Wynikiem takiego rozmieszczenia fotouczulacza jest dwuetapowy schemat uwalniania. Pierwszy rezerwuar znajduje się w warstwie PEG i charakteryzuje się niemal natychmiastowym procesem uwalniania mTHPC [174,175]. Drugi stanowi warstwa lipidowa, a mTHPC uwalniana jest w podobny sposób jak w przypadku Foslipu [174].

Terapeutyczne wskazania temoporfenu obejmują przede wszystkim choroby nowotworowe. Stąd, Foslip i Fospeg były przedmiotem wielu badań komórkowych, w których oceniano działanie cytotoksyczne i fotocytotoksyczne wykorzystując linie komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego, wyizolowane z nowotworów płuc, prostaty, skóry [176,177]. Fospeg wykazuje również obiecujące właściwości antyangiogenne i podobnie jak Visudyne może znaleźć zastosowanie w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem [178]. Badania porównawcze wychwytu komórkowego mTHPC w formie „wolnej” i enkapsulowanej, wykazały znacznie lepsze wyniki dla form liposomalnych, z pewną przewagą stopnia wychwytu formy pegylowanej [170,173].

Jak wspomniano wcześniej, farmakokinetyka Foscanu („wolnego” temoporfenu) jest dość nieprzewidywalna na skutek agregacji mTHPC w płynach biologicznych. W postaciach liposomalnych natomiast, jak pokazują badania, przeważa forma monomeryczna. Potwierdzają to badania kinetyczne na modelach zwierzęcych [179,180]. W doniesieniach literaturowych pojawiają się również publikacje, dotyczące stosowania liposomalnych form mTHPC w badaniach klinicznych u ludzi. Pierwsze wzmianki o zastosowaniu liposomalnej postaci mTHPC w postaci żelu do użytku zewnętrznego u ludzi, przedstawił Bendsoe i wsp. w 2007 r. Żel z liposomalną mTHPC zastosowano w terapii fotodynamicznej złośliwych zmian na skórze [181].

Dalsze tendencje rozwoju liposomalnych postaci mTHPC widoczne są w prowadzonych badaniach naukowych. Pierwsza strategia polega na minimalizowaniu efektów ubocznych, poprzez wstrzyknięcie liposomalnej postaci temoporfenu bezpośrednio do guza, czyli

w terapii śródmiąższowej [182]. Kolejna grupa badań poświęcona jest poszukiwaniu nowych wskazań terapeutycznych dla produktów Foslip i Fospeg, jak np. terapia fotodynamiczna zmian zwyrodnieniowych [183]. Podjęto również próbę zwiększenia selektywnego transportu liposomów z mTHPC poprzez przyłączenie ligandu, tj. transferyny. Jednak, jak już wspomniano, nie wykazano poprawy efektu fotodynamicznego przy zastosowaniu „celowanych” liposomów [109].

10.2.2. Visudyne – pierwsza liposomalna postać fotouczulacza w praktyce klinicznej

Verteoporfin składa się z mieszaniny aktywnych izomerów monokwasów pochodnych benzoporfiryny (ang. benzoporphyrin derivative monoacids – BPD-MA): BPD-MA C oraz BPD-MA D w stosunku molowym 1:1. Został otrzymany z dimetylowych estrów protoporfiryny IX, a badania jego aktywności fotodynamicznej rozpoczęto w latach 90' XX w. [184]. Charakterystyka BPD-MA została szczegółowo opisana w wielu pracach naukowych. Verteoporfin posiada wiele cech „idealnego fotouczulacza”: wykazuje chemiczną stabilność, ściśle zdefiniowaną strukturę chemiczną, silną absorpcję w zakresie długości fal 600-800 nm, efektywnie generuje tlen singletowy. Maksimum absorpcji przy $\lambda = 690$ nm pozwala potencjalnie na odpowiednio głęboką penetrację tkanek podczas naświetlania. Lek ulega szybkiej akumulacji i następnie eliminacji, dzięki czemu ograniczona zostaje fotowrażliwość skórna (nawet po upływie 24 h od podania) [12]. Richter i wsp. [184] przedstawili porównanie właściwości verteoporfinu i hematoporfiryny, z których wynika, że BPM-DA wykazuje dziesięciokrotnie silniejsze działanie cytotoksyczne względem adherentnych komórek ludzkich. Hydrofobowa natura BPM-DA niesie dwojakie konsekwencje. Z jednej strony, charakter lipofilny jest korzystny, gdyż zapewnia szybkie wchłanianie komórkowe i lokalizację w wewnątrzkomórkowych strukturach błonowych. Z drugiej strony, hydrofobowe właściwości sprzyjają formowaniu agregatów w roztworach wodnych, zmniejszając biodostępność i skuteczność fotodynamiczną [185]. Wobec powyższej charakterystyki, BPM-DA już na wczesnym etapie badań, został inkorporowany w liposomy, by ograniczyć negatywne aspekty hydrofobowej natury i jednocześnie jak najlepiej wykorzystać korzystne właściwości. Inkorporacja liposomalna verteoporfinu przyniosła bardzo dobry efekt. Jak wykazał Richter i wsp. [186], verteoporfin inkorporowany w liposomy, osiąga wyższe stężenie w tkance patologicznej i naczyniach neowaskularnych oraz silniejsze działanie cytotoksyczne *in vivo*. W 2000 r. Visudyne, liposomalna postać verteoporfinu,

została wprowadzona do praktyki klinicznej, w terapii zwyrodnienia plamki żółtej związanej z wiekiem. Liposomy Visudyne zbudowane są z obojętnych cząsteczek 1,2-dimirystoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholiny (DMPC) i fosfatydyloglicerolu (PG) obdarzonego ładunkiem ujemnym [187].

Produkt leczniczy Visudyne jest wskazany w leczeniu dorosłych pacjentów z wysiękowym (mokrym) zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem z dominującą klasyczną postacią poddołkowej neowaskularyzacji podsiatkówkowej (ang. choroidal neovascularisation), lub dorosłych pacjentów z poddołkową neowaskularyzacją podsiatkówkową występującą w przebiegu wysokiej krótkowzroczności [136]. AMD jest chorobą zwyrodnieniową oka, prowadzącą często do nieodwracalnej utraty wzroku. Najczęściej dotyka osób po 60 roku życia, częściej także chorują kobiety. Wyróżnić można dwie postaci zaawansowanej AMD: nie-neowaskularną (tzw. suchą) i neowaskularną (tzw. mokrą). Postać neowaskularna występuje u < 20% pacjentów cierpiących na AMD, ale często charakteryzuje się gwałtownym i postępującym przebiegiem, a nieleczona prawie zawsze prowadzi do trwałej ślepoty. U podstaw patogenezy AMD leży formowanie nowych naczyń krwionośnych w obrębie naczyniówki oka, w obszarze plamki żółtej, odpowiadającej za widzenie centralne. Nowopowstające naczynia krwionośne są kruche i nieszczelne. W obszarze siatkówki, tworzą tzw. błonę podsiatkówkową (neowaskularną), w której pojawiają się przesięki i krwotoki. W końcowym stadium może dojść do powstania tarczowatej blizny, która prowadzi do trwałego uszkodzenia siatkówki. Mechanizm działania verteporfinu w AMD, polega na okluzji i niszczeniu neowaskularnych naczyń, przy zachowaniu perfuzji w prawidłowych naczyniach błony naczyniowej i siatkówki oka. Ponadto celem terapii jest uzyskanie selektywnego działania verteporfinu, które chroni przed uszkodzeniem czynności naczyniówki i siatkówki. Visudyne jest w większym stopniu wychwytywany przez tkanki zmienione chorobowo, jak również nabłonek neowaskularnych naczyń krwionośnych. Schmidt-Erfurth i wsp. [12] zaproponowali mechanizm selektywnego wychwytu fotouczulacza przez naczynia neowaskularne, związany z nadekspresją receptorów dla lipoprotein LDL. W krwiobiegu liposomalny verteporfin wiąże się z lipoproteinami LDL, tworząc kompleks o wysokim powinowactwie do komórek endotelialnych. Komórki te wykazują zwiększoną ekspresję receptorów LDL i zwiększone zapotrzebowanie na lipoproteiny, stąd zwiększony wychwyt kompleksu LDL z Visudyne i wnikanie do komórek w drodze endocytozy. Przedstawiony mechanizm potwierdzają badania Chowdhary'ego i wsp. [187], którzy zaobserwowali korelację pomiędzy stopniem wiązania BPD-MA z lipoproteinami a efektem terapeutycznym PDT,

uzyskany *in vivo*. O zdolności Visudyne do szybkiego wiązania z lipoproteinami w krwiobiegu decyduje skład lipidowy. Obecność fosfatydyloglicerolu pochodzącego z jaja kurzego, zawierającego wiązania nienasycone, destabilizuje i zwiększa płynność błony liposomu. Ponadto, jak dalej wyjaśniają Chowdhary i wsp., brak uporządkowania w strukturze liposomów Visudyne, wynika ze znacznej różnicy pomiędzy wartościami temperatury przejścia fazowego DMPC i PG. Takie struktury są bardziej podatne na interakcje z proteinami osocza, w porównaniu do struktur liposomalnych zawierających cholesterol lub kwasy tłuszczowe, o dużym stopniu nasycenia. Jednak w przypadku Visudyne, właściwości te decydują o skuteczności terapeutycznej.

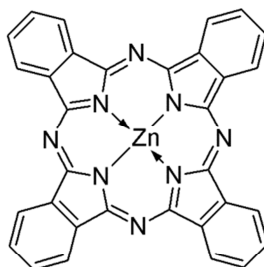
Liposomalny verteporfin jest dostarczany na rynek farmaceutyczny w formie ciemnozielonego liofilizatu. Produkt należy rozpuścić przed podaniem w 7,0 ml wody do wstrzykiwań, aby uzyskać 7,5 ml roztworu o stężeniu 2 mg/ml. Rozpuszczony produkt leczniczy Visudyne, jest nieprzejrystym roztworem o barwie ciemnozielonej. Przed podaniem roztwór należy ocenić wizualnie pod względem braku zanieczyszczeń nierozpuszczalnych lub zmiany barwy. W celu uzyskania dawki 6 mg/m² należy rozcieńczyć odpowiednią ilość roztworu produktu leczniczego Visudyne, roztworem glukozy do wstrzykiwań 50 mg/ml (5%) do końcowej objętości 30 ml.

Terapia fotodynamiczna z zastosowaniem produktu leczniczego Visudyne, przebiega w dwóch etapach. Pierwszym etapem jest 10 minutowa infuzja 30 ml roztworu Visudyne w dawce 6 mg/m² powierzchni ciała. Drugim etapem jest aktywacja produktu leczniczego Visudyne światłem, dokładnie w 15 minut od rozpoczęcia infuzji. Co 3 miesiące należy wykonywać u pacjentów badania kontrolne. W przypadku nawrotów przenikania krwinek przez nowo utworzone naczynia naczyniówki, można powtarzać leczenie Visudyne do 4 razy w roku. W celu aktywacji produktu leczniczego Visudyne światłem, stosuje się laser diodowy, wytwarzający światło czerwone bez oddziaływania termicznego (długość fali 689 nm ± 3 nm). Światło przechodzi przez urządzenie światłowodowe zamontowane w lampie szczelinowej oraz odpowiednią soczewkę kontaktową. Przy zalecanym natężeniu światła 600 mW/cm², wymagana dawka światła 50 J/cm² jest dostarczana w ciągu 83 sekund [136].

Terapia fotodynamiczna z zastosowaniem Visudyne to pierwsza skuteczna metoda leczenia AMD, która pozwoliła na znacząco poprawę zdrowia oraz jakości życia pacjentów. Nie bez znaczenia dla efektywności terapii, było zastosowanie formułacji liposomalnej verteporfinu. Obecnie w terapii AMD coraz częściej stosowane są leki biologiczne, tzn. przeciwciała monoklonalne o działaniu antyangiogennym (pegaptanib, ranibizumab,

bevacizumab). Mimo to, Visudyne wciąż pozostaje lekiem referencyjnym w wielu badaniach klinicznych.

10.3. Liposomalne pochodne ftalocyjaniny



Ftalocyjanina cynkowa ZnPc - CGP55847

Ryc. 9 Ftalocyjanina cynkowa (ZnPc) jako główny przedstawiciel pochodnych ftalocyjanin badany w formie liposomalnej do zastosowania w PDT.

Ftalocyjaniny, określane również jako tetraazaporfiryny, posiadają cztery atomy azotu w pozycji *meso*, w miejscu atomów węgla tworzących mostki metinowe w strukturze porfiryń. Cztery pierścienie pirolu są połączone mostkami azowymi, a w pozycji β każdej z jednostek pirolowych, przyłączone są pierścienie benzenu. Dzięki wprowadzeniu atomów azotu oraz pierścieni benzenu otrzymano grupę związków, tj. ftalocyjaniny, o wysokim współczynniku molowym absorpcji w zakresie 600-800 nm. Właściwości spektralne ftalocyjanin oraz możliwość pozyskania wielu pochodnych w wyniku chemicznej modyfikacji, przyczyniło się do poszukiwania w tej grupie związków potencjalnych fotouczulaczy do terapii fotodynamicznej. Istotną wadą ftalocyjanin jest słaba rozpuszczalność, szczególnie w rozpuszczalnikach polarnych. Dlatego też, w obszarze zastosowania tych związków w terapii fotodynamicznej, ftalocyjaniny stosowane są bardzo często w postaci liposomalnej [188].

Ftalocyjanina cynkowa (ZnPc, CGP55847, Ryc. 9) to aktywny fotouczulacz, inkorporowany w liposomy o składzie: 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholina (POPC) 1,2-dioleoilo-*sn*-glycero-3-fosfoseryna (OOPS) (1:90:10 w/w/w) [189]. W latach 90' XX w., firma QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Kanada), we współpracy z Ciba Geigy (Novartis, Basel, Szwajcaria), rozpoczęła badania kliniczne I i II fazy liposomalnej ZnPc w leczeniu raka kolczystokomórkowego [22]. Pomimo obiecujących wyników badań przedklinicznych ZnPc, badania z udziałem ludzi zakończyły się niepowodzeniem.

Ftalocyjanina cynkowa wciąż pozostaje związkiem modelowym wykorzystywanym w badaniach wielu nowych formułacji liposomalnych. De Oliveira i wsp. badali wpływ zawartości cholesterolu na aktywność fotodynamiczną ZnPc, inkorporowanej w liposomy zbudowane z fosfatydylocholinoi sojowej. Wykazano, że jedynie formułacja z dodatkiem cholesterolu, charakteryzuje się zwiększoną stabilnością i wywołuje istotne działanie fotocytotoksyczne, w przeciwieństwie do ZnPc w liposomach bez cholesterolu i w formie „wolnej” [190].

W celu zwiększenia skuteczności terapeutycznej PDT, jest ona często kojarzona z innymi metodami leczenia. Maranhão i wsp. [191] enkapsulowali nitrozyl rutenu w liposomy z inkorporowaną ZnPc, uzyskując układ generujący pod wpływem naświetlania tlenek azotu i tlen singletowy. Dzięki synergistycznemu działaniu oksydacyjnemu NO i tlenu singletowego, zaobserwowano wzmożoną aktywność fotodynamiczną skierowaną przeciwko komórkom czerniaka B16-F10. Natomiast Bolfarini i wsp. [192] otrzymali magnetoliposomy zawierające ZnPc i nanocząstki magnetyczne. Eksperymentalne połączenie dwóch metod terapeutycznych, tj. PDT i hipertermii magnetycznej, pozwoliło uzyskać lepsze wyniki leczenia w porównaniu do efektów uzyskanych dla każdej techniki oddzielnie.

Ftalocyjanina cynkowa została również zastosowana jako fotoaktywator, do otrzymania liposomów o kontrolowanym uwalnianiu. Aygun i wsp. [193] opracowali liposomy zbudowane z DMPC, DSPC i ftalocyjaniny cynkowej, z inkorporowanym o-nitrofenylo- β ,D-galaktopiranozydem (ONPG). Kontrolowany profil uwalniania ONPG z badanych liposomów, uzyskano dzięki powolnemu niszczeniu struktury liposomów. Rozpad lipidowych struktur następował w wyniku wzbudzenia fotoaktywatora ZnPc, przy użyciu różnych źródeł promieniowania tj. promieniowania UV-A, widzialnego i z zakresu 600-700 nm. Autorzy zaproponowali zastosowanie takiego kontrolowanego systemu uwalniania do dekontaminacji urządzeń wentylacyjnych i klimatyzacji.

Przedmiotem badań liposomalnych ftalocyjanin, poza ftalocyjaniną cynkową, były także inne związki m.in. modyfikowane pochodne ZnPc, ftalocyjaniny krzemowe (SiPc), ftalocyjaniny germanu(IV) (GePc) i glinu (AlPc).

Decréau i wsp. [194] porównywali aktywność fotodynamiczną ftalocyjaniny dichlorokrzemowej i bis(tri-*n*-heksylosiloksy) krzem(IV) ftalocyjaniny (HexSiPc), enkapsulowanych w liposomy z lecytyny żółtka jaja lub w micelle zbudowane z Cremophoru EL. Celem komórkowym PDT w powyższym badaniu były ludzkie komórki czerniaka linii M6. Wykazano, że efekt fotocytotoksyczny zależy nie tylko od dawki

promieniowania, rodzaju i dawki fotouczulacza, ale także od zastosowanej formulacji. Najbardziej aktywnym związkiem okazała się ftalocyjanina HexSiPc w postaci liposomalnej. Wysoką skuteczność fotodynamiczną HexSiPc udokumentowano najsilniejszym hamowaniem wzrostu komórek M6, stopniem uszkodzenia lipidów w komórkach M6 oraz zmianą aktywności enzymów biorących udział w reakcjach antyoksydacyjnych np. dysmutazy ponadtlenkowej.

Transport celowany jest jedną ze strategii, mających na celu poprawę wychwyty leku przez tkanki docelowe np. komórki nowotworowe. Strategia ta zyskała również zainteresowanie w badaniach liposomalnych ftalocyjanin. Sulfonowe pochodne ftalocyjaniny glinowej inkorporowano w liposomy, zawierające ligandy w postaci przeciwciał [195,196] oraz małowcząsteczkowe jak kwas foliowy [197] lub transferyna [107].

III. CEL I ZAKRES PRACY

Wyzwaniem współczesnej medycyny, szczególnie w obszarze onkologii oraz terapii chorób infekcyjnych i pasożytniczych, jest poszukiwanie metod leczenia, które będą charakteryzowały się wysoką skutecznością terapeutyczną, przy zapewnieniu jak najwyższego bezpieczeństwa pacjentowi. Terapia fotodynamiczna, oparta na fizykochemicznym mechanizmie działania spełnia powyższe kryteria; jest metodą o niskim stopniu inwazyjności, ograniczonej liczbie potencjalnych działań niepożądanych oraz możliwości wykształcenia mechanizmów oporności. Liczba publikacji poświęcona PDT, wskazuje na duże zainteresowanie oraz ogromną intensyfikację prac badawczych prowadzonych w celu jej udoskonalania. Kierunki rozwoju PDT są niezwykle różnorodne, a z uwagi na specyficzny mechanizm działania, wymagają często współpracy przedstawicieli różnych dziedzin nauki: fizyki, chemii, nauk technicznych, fotochemii, medycyny i biologii molekularnej.

Istotnym obszarem badań PDT, jest poszukiwanie nowych fotouczulaczy w grupie związków makrocyklicznych, będących pochodnymi porfiryny. Szczególnie obiecujące właściwości, uwzględniając cechy idealnego fotouczulacza, wykazują ftalocyjaniny. Są to syntetyczne analogi porfiryn, które posiadają rozbudowany układ makrocykliczny, dzięki czemu wykazują silną absorpcję promieniowania. Większość kompleksów ftalocyjanin z jonami, np. Zn(II), Al(III), Si(IV), Mg(II) posiada zdolność generowania tlenu singletowego z dużą wydajnością. Natomiast istotnym ograniczeniem zastosowania większości ftalocyjanin jako potencjalnych fotouczulaczy, jest znacznie hydrofobowy charakter, determinujący tendencję do agregacji i słabą rozpuszczalność. Powyższe właściwości, a szczególnie zjawisko agregacji, w dużym stopniu ograniczają efektywność wytwarzania tlenu singletowego w układzie biologicznym, zmniejszając skuteczność terapeutyczną. Istotnym problemem w odniesieniu do ograniczonej rozpuszczalności ftalocyjanin, jest przygotowanie postaci farmaceutycznej np. do podawania drogą dożylną. Aby otrzymać ftalocyjaniny o bardziej hydrofilowych właściwościach, w pozycjach peryferyjnych makrocykla wprowadzane są ugrupowania zawierające heteroatomy, jak np. azot, siarka, tlen. Inną strategią, wykorzystywaną zwłaszcza do opracowania postaci farmaceutycznej, jest inkorporacja ftalocyjanin w strukturę liposomu. Analizując liczne doniesienia literaturowe poświęcone fotouczulaczom inkorporowanym w liposomy, w tym również pochodnym ftalocyjaniny, zastosowanie liposomów, przyniosło duży przełom w PDT i zaowocowało rozpoczęciem badań i wprowadzeniem do praktyki klinicznej

niektórych hydrofobowych związków fotouczulających. Praca doktorska wpisuje się w nurt poszukiwań nowych fotouczulaczy.

Celem głównym pracy doktorskiej jest ocena właściwości fotochemicznych i fotodynamicznych nowych ftalocyjanin posiadających w położeniach nieperyferyjnych podstawniki morfolinoetoksyłowe. Dwa z analizowanych związków, zawierały w centrum koordynacyjnym jony cynku(II) oraz odpowiednio dwa (**Pc1**) oraz osiem podstawników (**Pc3**). Natomiast ftalocyjaniny **Pc2** i **Pc4**, posiadały wbudowane jony Mg(II) oraz osiem podstawników morfolinoetoksyłowych. Ftalocyjanina **Pc4** miała postać czwartorzędowej soli amoniowej, i była jonową formą związku **Pc2**. Uwzględniając dotychczasowe doniesienia literaturowe, a także niektóre kryteria zdefiniowane dla idealnego fotouczulacza, sformułowano cele szczegółowe badań, realizowanych w następujących etapach:

1. Ocena czystości chemicznej ftalocyjanin **Pc1-4** metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.
2. Analiza właściwości spektralnych obejmująca identyfikację i charakterystykę pasm absorpcji Soret'a i Q.
3. Ocena wpływu rodzaju rozpuszczalnika na przebieg elektronowych widm absorpcji ftalocyjanin, ze szczególnym uwzględnieniem położenia pasma Q.
4. Charakterystyka właściwości agregacyjnych ftalocyjanin w różnych rozpuszczalnikach.
5. Analiza właściwości emisyjnych oraz wyznaczenie wydajności kwantowej fluorescencji.
6. Ocena zdolności i wyznaczenie wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego.
7. Badanie trwałości fotochemicznej fotouczulaczy oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych zachodzących procesów.
8. Przygotowanie i charakterystyka formulacji liposomalnych badanych ftalocyjanin.
9. Porównanie aktywności biologicznej ftalocyjanin w formie wolnej i inkorporowanych w liposomy na komórkach raka kolczystokomórkowego.

Założono, że wykonanie badań i analiza uzyskanych wyników, pozwoli odpowiedzieć na pytania (i) czy badane ftalocyjaniny są potencjalnymi kandydatami do zastosowania w PDT, (ii) jak obecność podstawników morfolinoetoksyłowych w cząsteczce ftalocyjanin wpływa na ich właściwości fizykochemiczne i fotodynamiczne oraz (iii) jaki wpływ

wywierają inkorporacja liposomalna ftalocyjanin **Pc1-4** na aktywność fotodynamiczną w inaktywacji komórek raka kolczystokomórkowego.

IV. APARATURA I MATERIAŁ DO BADAŃ

1. Aparatura

- badania fizyko-chemiczne:

- chromatograf cieczowy model 1200 - Agilent, wyposażony w detektor diodowy – Diode Array 1200, Agilent Technologies
- spektrofotometr UV-160 A, Shimadzu, z oprogramowaniem PC 160 Plus
- 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
- spektrofluorymetr Jasco FP-6200
- filtr szklany odcinający promieniowanie powyżej 450 nm HCC-16
- kuwety kwarcowe o grubości warstwy $l = 1$ cm, Hellma
- cylindryczna kuweta kwarcowa o grubości warstwy $l = 1$ cm, Hellma
- waga Mettler-Toledo UMT-2 oraz waga Sartorius M2P do odważania mikrodważek – Pracownia Analizy Elementarnej, Środowiskowe Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

- badania aktywności biologicznej i technologia liposomów:

- płytki do hodowli komórek 48-dołkowe, BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA
- płytki 96-dołkowe MICROTTEST™ 96, Becton Dickinson Labware
- mikroskop kontrastowo-fazowy Nikon TMS
- mikroskop fluorescencyjny Nikon Diaphot z kamerą Jenoptik i oprogramowaniem ProgRes Capture
- czytnik mikroplątek Versa Max
- aparat do mierzenia wielkości cząstek oparty na technologii dynamicznego rozpraszania światła (DLS) – N4Plus Coulter, Beckman
- ekstruder do ręcznej kalibracji wymiarowej liposomów Avanti Polar Lipids Inc.
- radiometr Thorlabs PM100A Optical Power Meter
- spektrofotometr Perkin Elmer Lambda 4B

- diody laserowe emitujące promieniowanie o długości fali $\lambda_{\max}=690$ nm lub $\lambda_{\max}=735$ nm, LED MultiChip Emitter 60 high efficiency AlGaAs, Roithner LaserTechnik GmbH, Wiedeń, Austria
- zestaw filtrów do mikroskopu fluorescencyjnego Chroma 61000v2, Chroma 49006, Chroma 61002, ET DAPI Chroma 49000, Chroma Technology Corp, USA.

2. Odczynniki

- badania fizyko-chemiczne:

- metanol, J. T. Baker
- dichlorometan, J. T. Baker
- trietyloamina, J. T. Baker
- *n*-heksan, POCH
- cykloheksan, POCH
- 1,4-dioksan, POCH
- toluen, POCH
- eter dietylowy, POCH
- dimetylosulfotlenek (DMSO), Fluka
- chloroform, Sigma Aldrich
- octan etylu, POCH
- tetrahydrofuran (THF), Sigma Aldrich
- pirydyna, Alfa Aesar
- izopropanol, POCH
- aceton, POCH
- N,N-dimetyloformamid (DMF), Sigma Aldrich
- acetonitryl, POCH
- N,N-dimetyloacetamid (DMA), POCH
- woda destylowana otrzymana przy zastosowaniu systemu Simplicity UV, Millipore
- 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF), Sigma Aldrich
- ftalocyjanina cynkowa, Sigma Aldrich.

- badania aktywności biologicznej i technologia liposomów:

- a) media i odczynniki do hodowli komórkowych

- DME - Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose, DME H-21 (glukoza 4500 mg/l), z (lub bez) dodatkiem soli sodowej czerwieni fenolowej (15mg/l), Cell Culture Facility, University of California San Francisco (CCF/UCSF)
- DME F12 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose/Ham's F-12, 1:1 v/v, DME H-21/F12 (glukoza 3151 mg/l), z (lub bez) dodatkiem soli sodowej czerwieni fenolowej (8,12 mg/l), CCF/UCSF
- penicylina (100 U/ml) - streptomycyna (100 µg/ml), CCF/UCSF
- L-glutamina, CCF/UCSF
- kompleks trypsyna-EDTA 0,25%, CCF/UCSF
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), CCF/UCSF
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline bez wapnia i magnezu (DPBS), CCF/UCSF
- Płodowa surowica bydlęca inaktywowana ciepłem, FBS (ang. fetal bovine serum), CCF/UCSF
- dimetylosulfotlenek (DMSO), Sigma Aldrich, BioReagent
- błękit Trypan 0,4% roztwór, Gibco-Invitrogen Corporation
- błękit Alamar, Gibco-Invitrogen Corporation

b) markery fluorescencyjne

- Cell Trace Calcein Red-orange AM, cell-permeant dye, Invitrogen
- SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains, Invitrogen
- Barwnik Hoechst'a, Hoechst stain 33342, trihydrochloride trihydrate, FluoroPure™ grade (MW 615.99) (H21492), Invitrogen
- MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes, Invitrogen

c) odczynniki do preparatyki liposomów

- 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholina (POPC), Avanti Polar Lipids Inc.
- L- α -fosfatydylo-DL glicerol (żółtko jaja kurzego, PG), Avanti Polar Lipids Inc.
- chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (DOTAP), Avanti Polar Lipids Inc.
- cholesterol (Chol), Avanti Polar Lipids Inc.
- chloroform, Fisher Scientific
- chlorek sodu (99,5%), Sigma Aldrich
- kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy (HEPES, 99,5%), Sigma Aldrich.

3. Materiał biologiczny

Badania aktywności biologicznej wykonano na liniach ludzkich komórek raka kolczystokomórkowego:

- komórki HSC3 zostały wyizolowane z nowotworu języka i udostępnione przez Dr. R. Kramer'a (University of California San Francisco, USA)
- komórki H413 zostały wyizolowane z nowotworu języka i udostępnione przez Dr. R. Jordan'a (University of California San Francisco, USA).

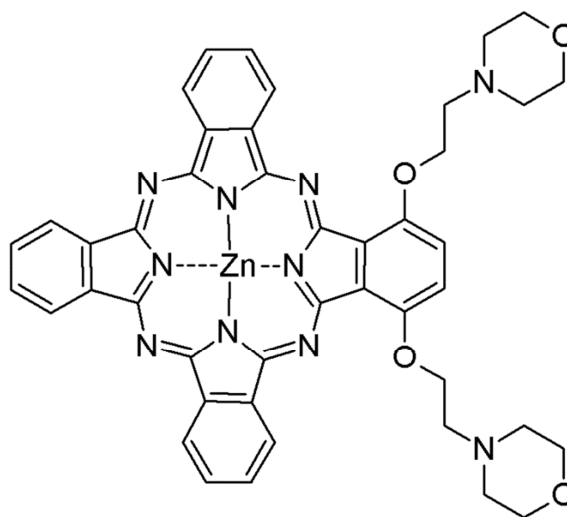
4. Substancje do badań

Ftalocyjaniny **Pc1-4** zostały zsyntetyzowane przez Pracowników Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu:

- **Cynk(II) 1,4-bis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina**, określana w pracy jako **Pc1**

Wzór sumaryczny: $C_{44}H_{38}N_{10}O_4Zn$

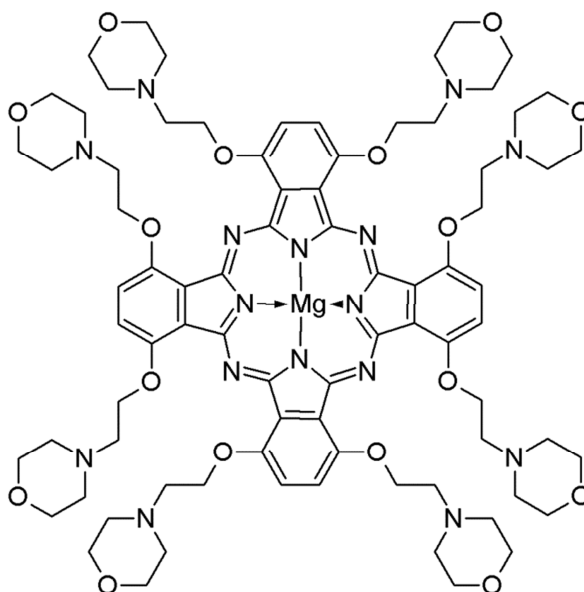
Masa molowa: 836,25 g/mol



- **Magnez(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina**, określana w pracy jako **Pc2**

Wzór sumaryczny: $C_{80}H_{104}N_{16}O_{16}Mg$

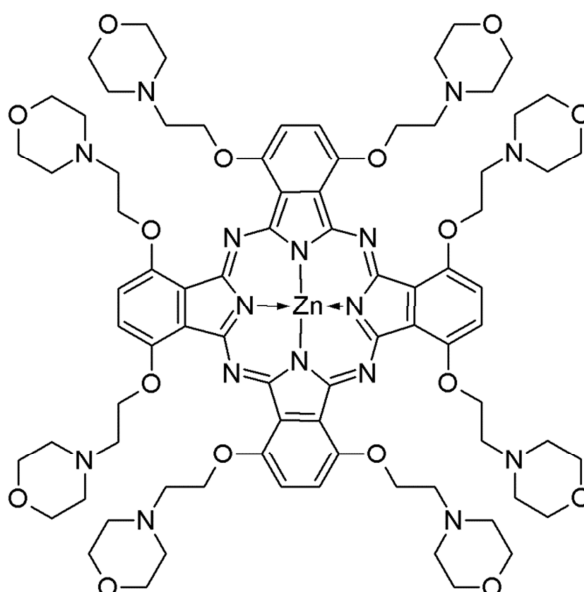
Masa molowa: 1570,08 g/mol



- **Cynk(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]ftalocyjanina**, określana w pracy doktorskiej jako **Pc3**

Wzór sumaryczny: $C_{80}H_{104}N_{16}O_{16}Zn$

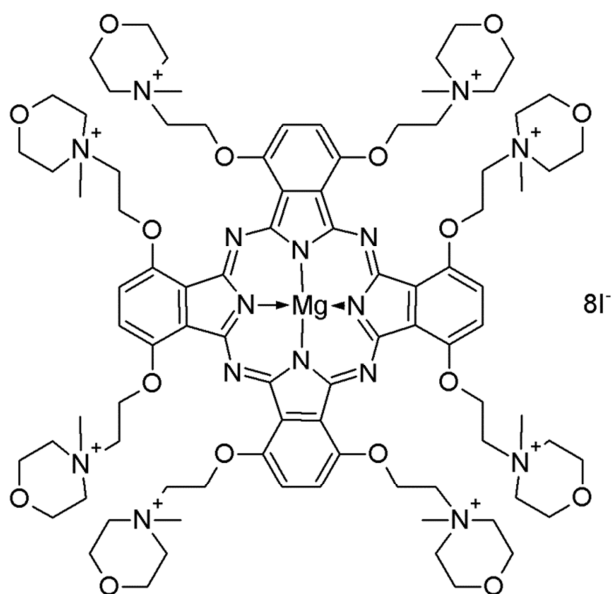
Masa molowa: 1611,19 g/mol



- **Jodek magnez(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[2-(4-N-metylomorfolin-4-ilo)etoksy]ftalocyjaniny**, określany w pracy jako **Pc4**

Wzór sumaryczny: $[C_{88}H_{128}N_{16}O_{16}Mg]^{8+} 8I^{-}$

Masa molowa: 2705,55 g/mol



V. METODYKA I WYNIKI BADAŃ

1. Ocena czystości chemicznej ftalocyjanin

1.1. Metodyka badania czystości chemicznej

Czystość badanych ftalocyjanin **Pc1-3** z nieperyferyjnymi podstawnikami 2-morfolino-4-etoksyłowymi określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Do analizy wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy Agilent 1200, Agilent Technologies Inc. (USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w odwróconym układzie 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 . W analizie chromatograficznej wykorzystano roztwory ftalocyjanin w dichlorometanie. Badania przeprowadzono w temperaturze pokojowej, w trzech układach chromatograficznych dla każdej z badanych ftalocyjanin. Warunki oraz wyniki analizy chromatograficznej przedstawiono poniżej w punktach 1.2-1.4.

1.2. Ocena czystości ftalocyjaniny Pc1

1.2.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1

Analizę czystości ftalocyjaniny **Pc1** przeprowadzono w trzech układach chromatograficznych w odwróconym układzie faz, z wykorzystaniem gradientu stężeń eluentów. Warunki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc1** przedstawiono w Tabelach 3-5:

Tabela 3 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)	
	MeOH	CH ₂ Cl ₂
0	95	5
2	95	5
3	0	100
15	0	100

Tabela 4 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)	
	MeOH	CH ₂ Cl ₂
0	95	5
4	95	5
5	0	100
15	0	100

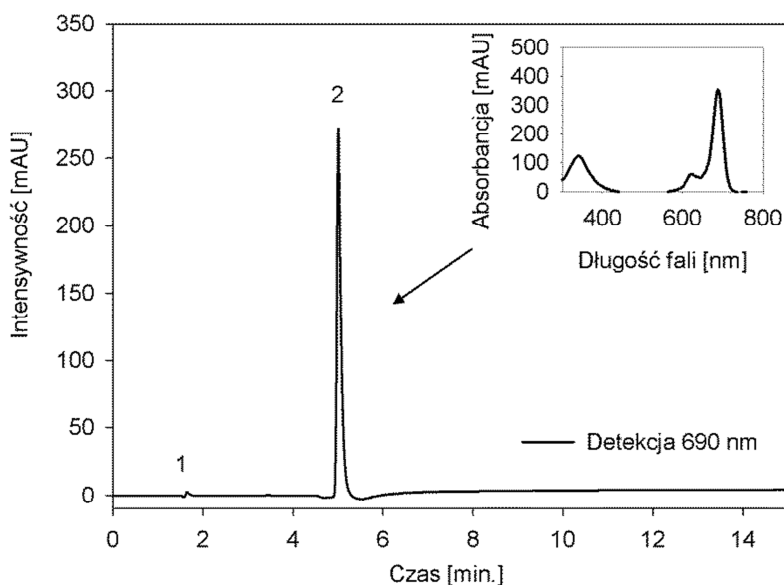
Tabela 5 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)		
	MeOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
0	85	5	10
3	95	5	0
4	0	100	0
15	0	100	0

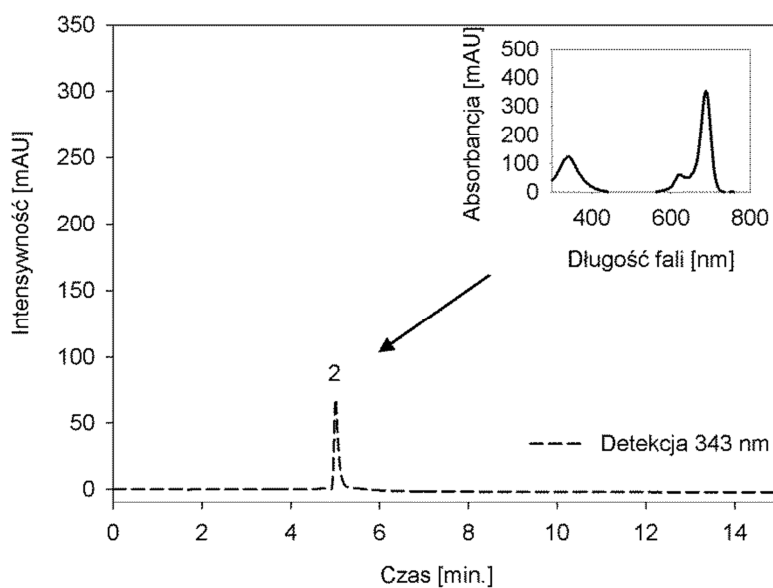
1.2.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem układów I-III

Tabela 6 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem I układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=690$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,65	19,48	1,09	-	-	-	-
2	5,01	1763,21	98,91	2	5,01	452,49	100,00



Ryc. 10 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1.



Ryc. 11 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1.

Tabela 7 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc1** z zastosowaniem II układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=690$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,66	21,39	0,97	-	-	-	-
2	7,01	2185,77	99,03	2	7,01	549,61	100,00

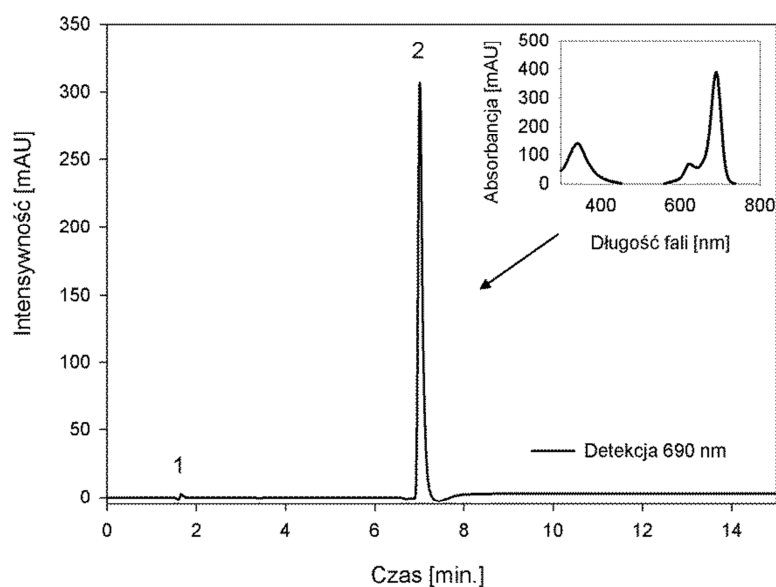
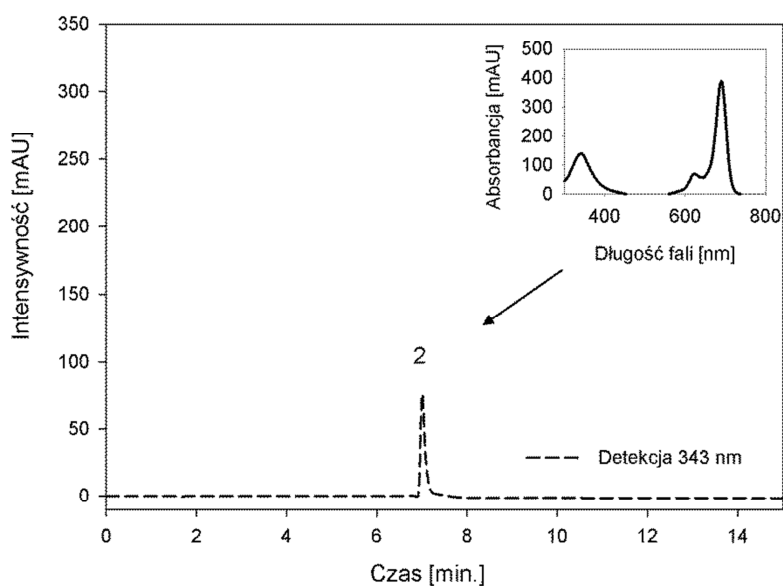
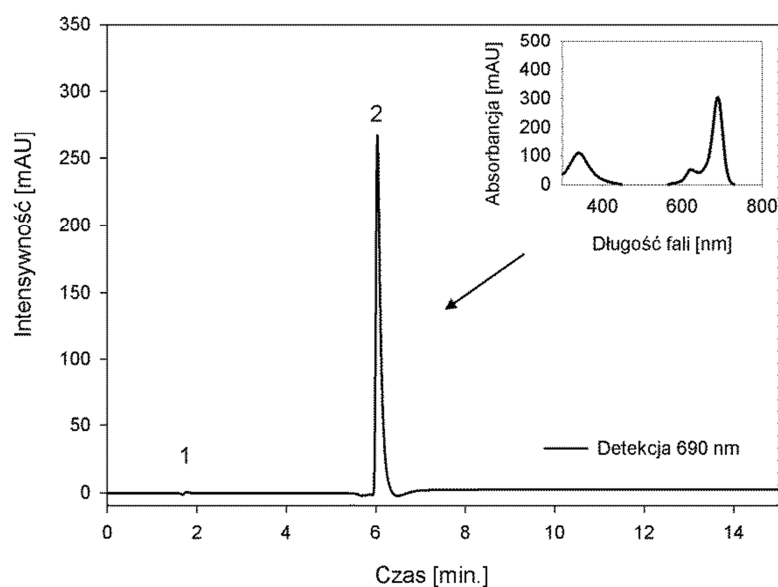
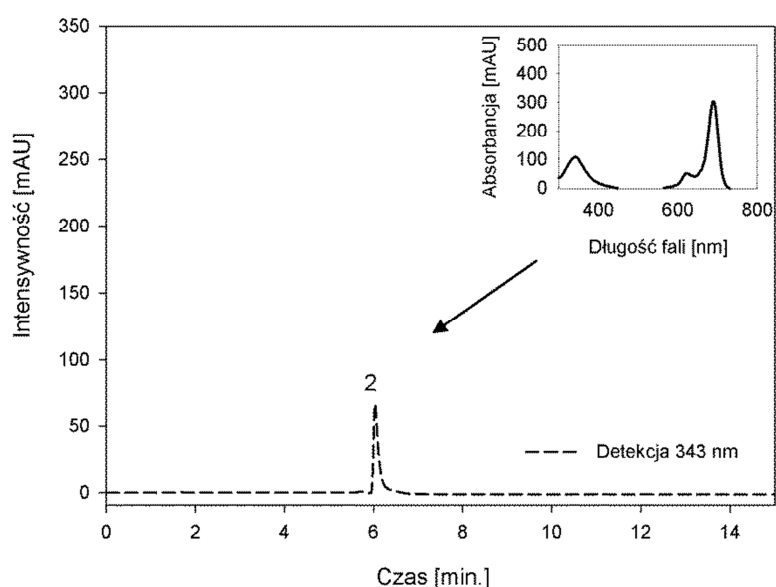
Ryc. 12 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc1**.Ryc. 13 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc1**.

Tabela 8 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc1** z zastosowaniem III układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=690$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,77	10,27	0,50	-	-	-	-
2	6,04	2039,10	99,50	2	6,04	564,17	100,00



Ryc. 14 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc1**.



Ryc. 15 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc1**.

1.3. Ocena czystości ftalocyjaniny Pc2

1.3.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2

Analizę czystości ftalocyjaniny **Pc2** przeprowadzono w trzech układach chromatograficznych w odwróconym układzie faz, z wykorzystaniem gradientu stężeń eluentów. Warunki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc2** przedstawiono w Tabelach 9-11:

Tabela 9 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.

Gradient		Skład fazy ruchomej (v/v)		
Czas [min.]	MeOH	TEA	H ₂ O	
0	70	0	30	
5	70	0	30	
6	70	5	25	
15	70	5	25	

Tabela 10 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.

Gradient		Skład fazy ruchomej (v/v)		
Czas [min.]	MeOH	TEA	H ₂ O	
0	59	1	40	
4	59	1	40	
5	65	5	30	
15	65	5	30	

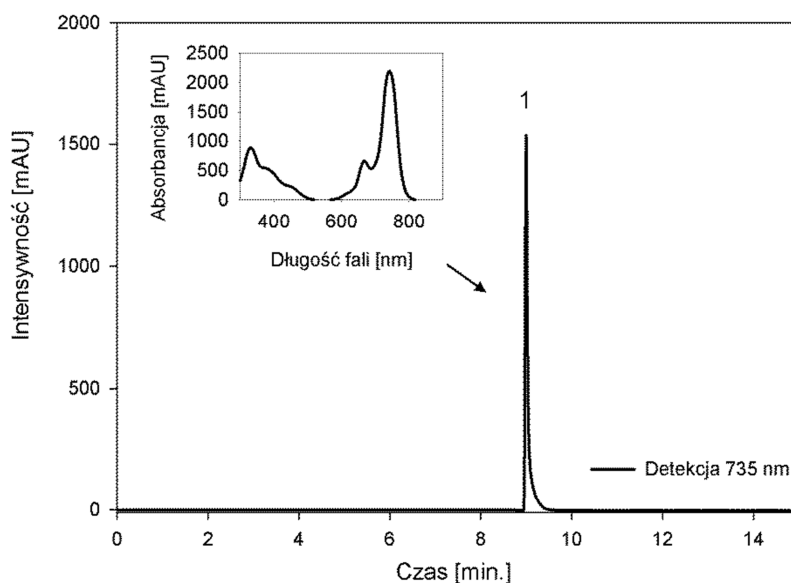
Tabela 11 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.

Gradient		Skład fazy ruchomej (v/v)		
Czas [min.]	MeOH	TEA	H ₂ O	
0	49	1	50	
2	49	1	40	
3	65	5	30	
15	65	5	30	

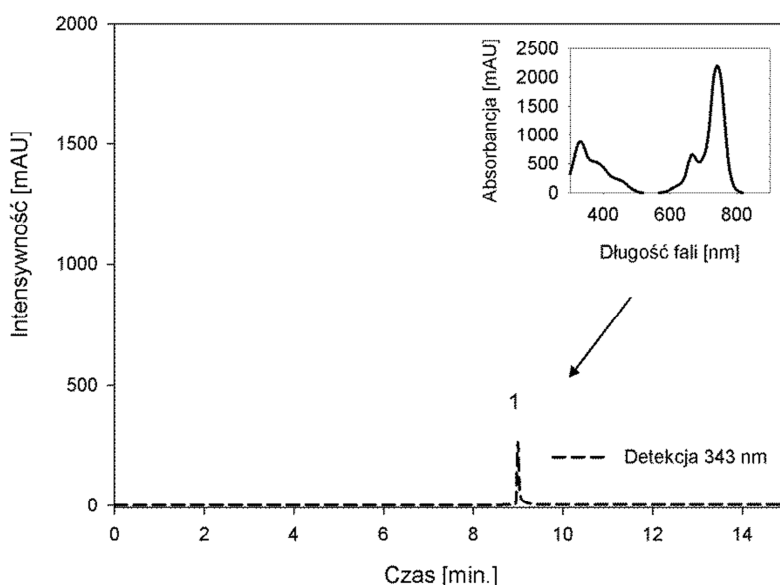
1.3.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc2** z zastosowaniem układów I-III

Tabela 12 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc2** z zastosowaniem I układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=735$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	9,00	6733,13	100,00	1	9,00	1000,12	100,00



Ryc. 16 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.



Ryc. 17 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.

Tabela 13 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc2** z zastosowaniem II układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=735$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	2,53	22,91	0,15	-	-	-	-
2	3,01	19,58	0,13	-	-	-	-
3	5,37	15486,9	99,33	3	5,37	1550,04	97,9
4	7,57	27,55	0,18	4	7,57	22,67	1,43
5	7,79	35,11	0,23	5	7,78	10,57	0,67

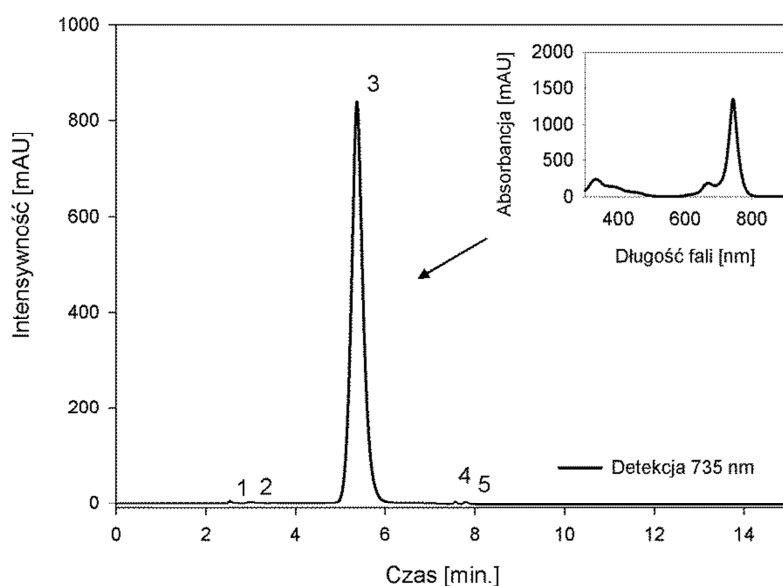
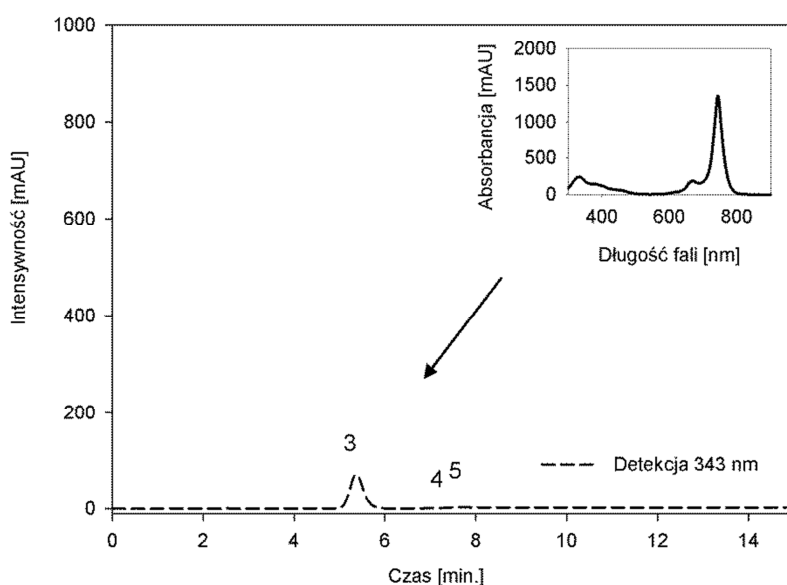
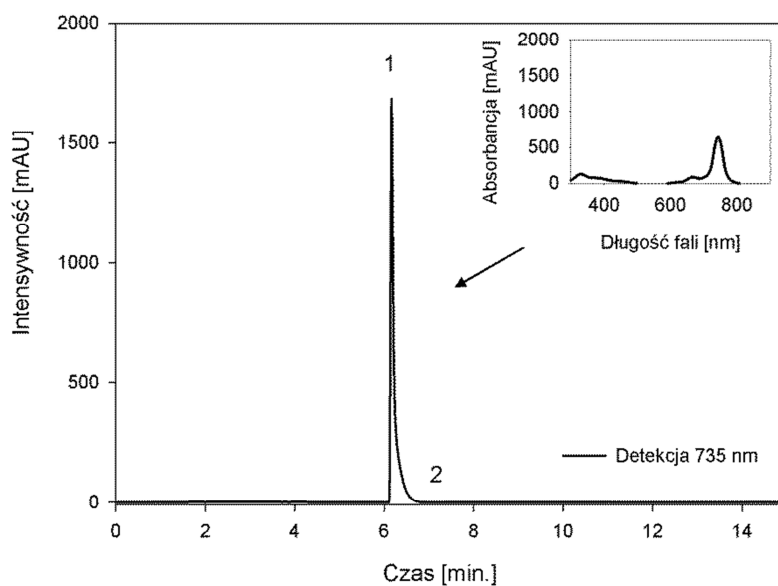
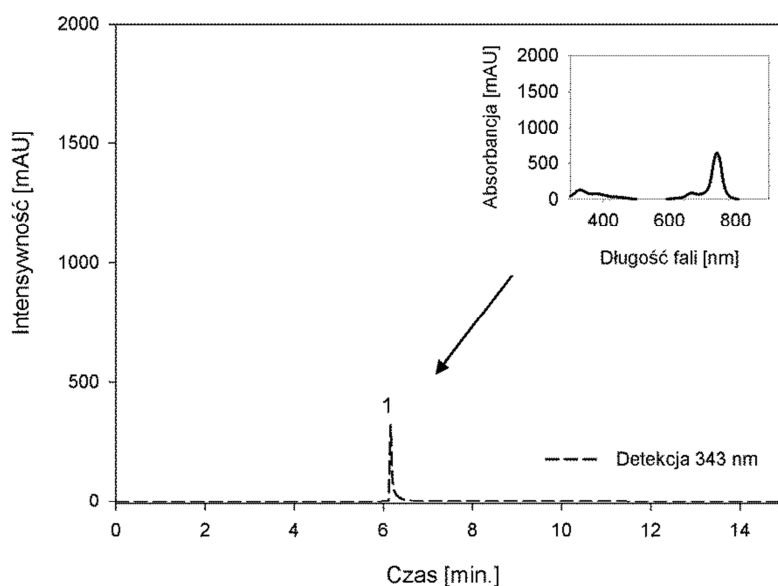
Ryc. 18 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.Ryc. 19 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.

Tabela 14 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc2** z zastosowaniem III układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=735$ nm				Detekcja $\lambda=343$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	6,17	9350,18	99,76	1	6,16	1455,83	100,00
2	6,97	22,25	0,24	-	-	-	-



Ryc. 20 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.



Ryc. 21 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc2**.

1.4. Ocena czystości ftalocyjaniny Pc3

1.4.1. Parametry analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3

Analizę czystości ftalocyjaniny **Pc3** przeprowadzono w trzech układach chromatograficznych w odwróconym układzie faz, z wykorzystaniem gradientu stężeń eluentów. Warunki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc3** przedstawiono w Tabelach 15-17:

Tabela 15 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)	
	MeOH	CH ₂ Cl ₂
0	0	100
4	0	100
5	20	80
15	20	80

Tabela 16 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)	
	MeOH	CH ₂ Cl ₂
0	0	100
2	0	100
3	10	90
15	10	90

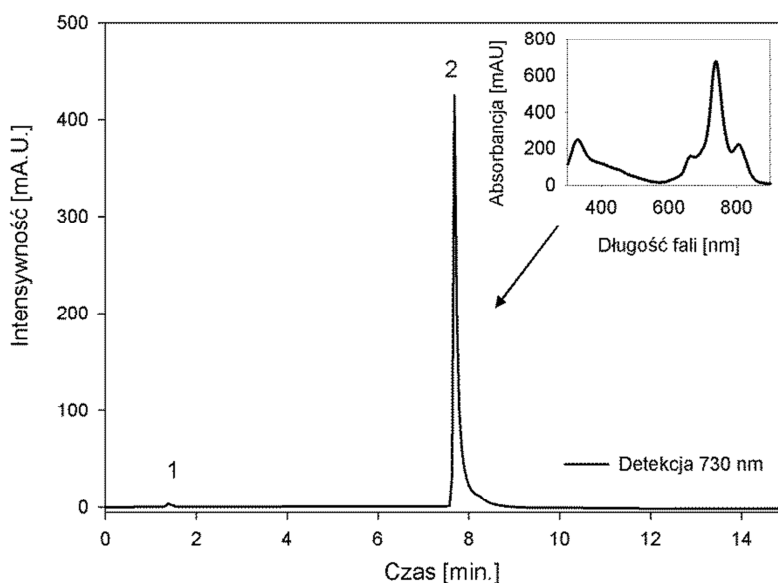
Tabela 17 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.

Gradient Czas [min.]	Skład fazy ruchomej (v/v)	
	MeOH	TEA
0	0	100
0,5	5	95
15	5	95

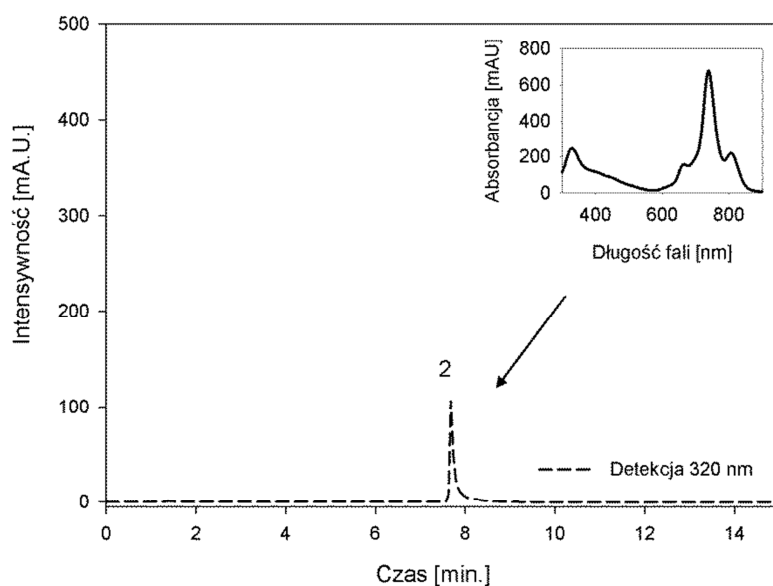
1.4.2. Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc3** z zastosowaniem układów I-III

Tabela 18 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc3** z zastosowaniem I układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=730$ nm				Detekcja $\lambda=320$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,39	0,32	0,63	-	-	-	-
2	7,68	50,36	99,37	2	7,68	13,85	100,00



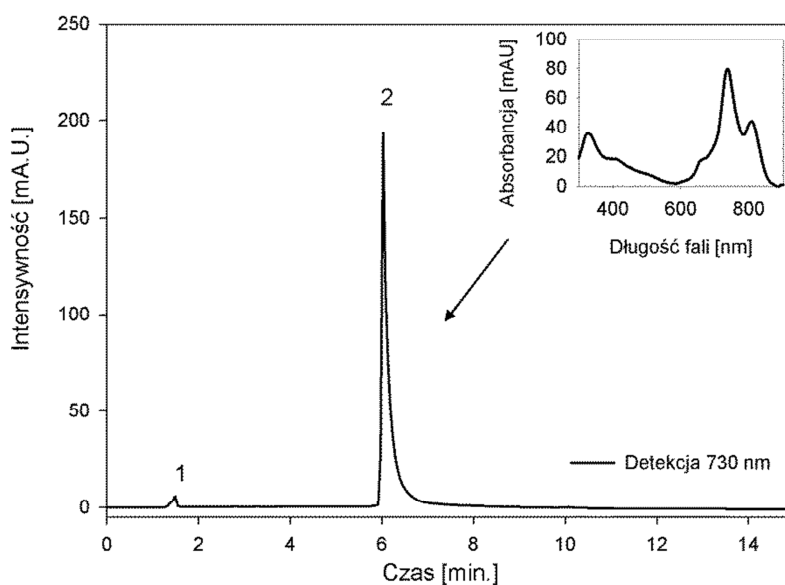
Ryc. 22 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.



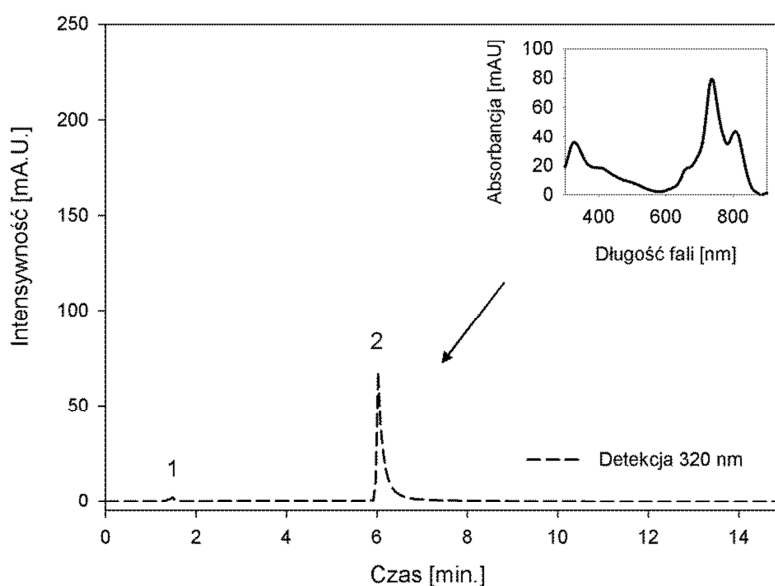
Ryc. 23 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.

Tabela 19 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc3** z zastosowaniem II układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=730$ nm				Detekcja $\lambda=320$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,49	0,44	1,37	1	1,49	0,16	1,42
2	6,03	31,79	98,63	2	6,03	11,13	98,58



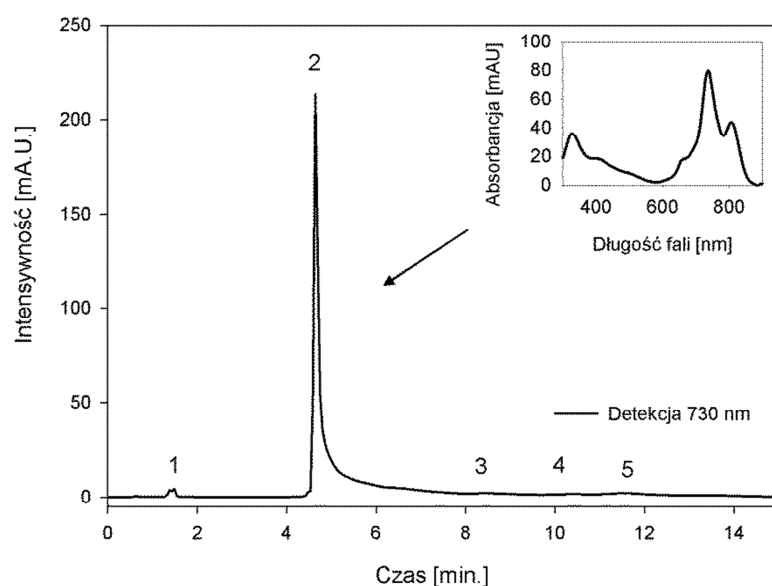
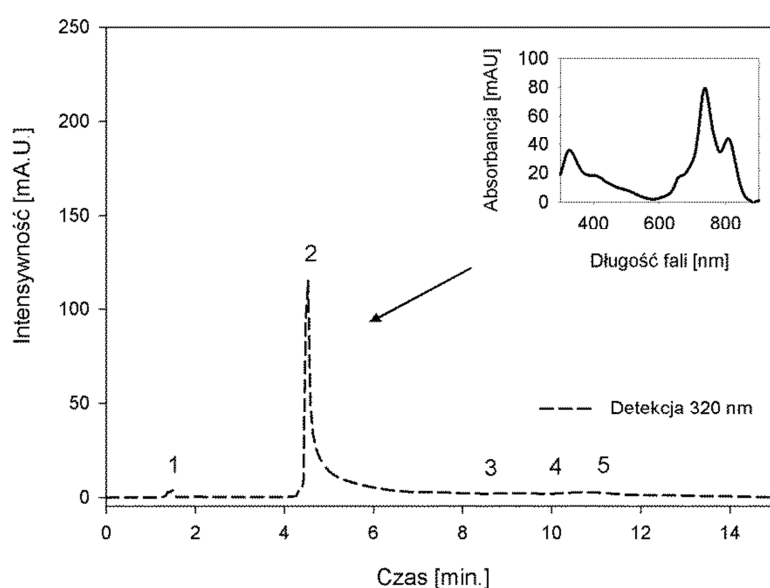
Ryc. 24 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.



Ryc. 25 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.

Tabela 20 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny **Pc3** z zastosowaniem III układu chromatograficznego.

Detekcja $\lambda=730$ nm				Detekcja $\lambda=320$ nm			
Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]	Pik	Czas retencji [min.]	Powierzchnia piku	Zawartość [%]
1	1,49	0,34	0,89	1	1,49	0,30	0,92
2	4,64	37,27	97,62	2	4,64	31,41	96,62
3	8,48	0,21	0,55	3	8,48	0,29	0,89
4	10,40	0,15	0,39	4	10,40	0,23	0,71
5	11,57	0,21	0,55	5	11,57	0,28	0,86

Ryc. 26 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.Ryc. 27 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny **Pc3**.

2. Wyznaczenie molowych współczynników absorpcji

2.1. Metodyka wyznaczania molowych współczynników absorpcji

W kolbkach miarowych o poj. 5,0 cm³ rozpuszczono odważki o masie dokładnie około 0,100 mg ftalocyjanin **Pc1-4** w odpowiednich rozpuszczalnikach. Elektronowe widma absorpcji wykreślono w zakresie 200-900 nm w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej $l=1$ cm, wykorzystując spektrofotometr Shimadzu UV-160 A, wyposażony w oprogramowanie PC 160 Plus. Jednocześnie mierzono wartość absorbancji przy długości fali, odpowiadającej maksimum absorpcji i obliczano molowe współczynniki absorpcji wg wzoru (1):

$$\varepsilon = \frac{A}{l \times c} \quad (1)$$

gdzie:

A – absorbancja

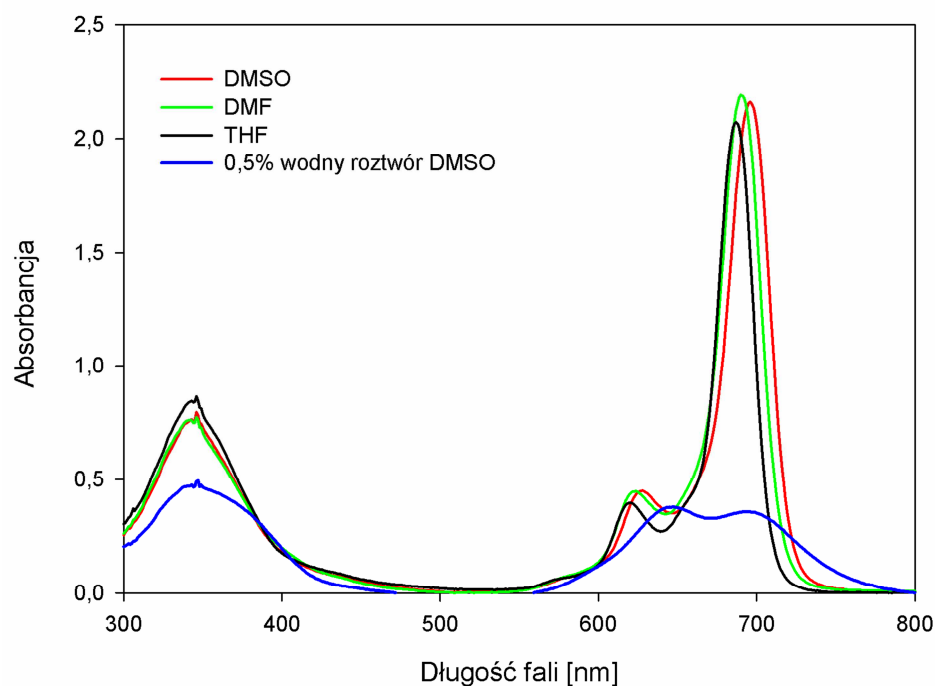
ε – molowy współczynnik absorpcji [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹]

l – grubość warstwy absorbującej [cm]

c – stężenie roztworu [mol·dm⁻³]

Elektronowe widma absorpcji ftalocyjanin **Pc1-4** przedstawiono na Ryc. 28-31, a wartości molowych współczynników absorpcji zestawiono w Tabelach 21-24.

2.2. Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc1

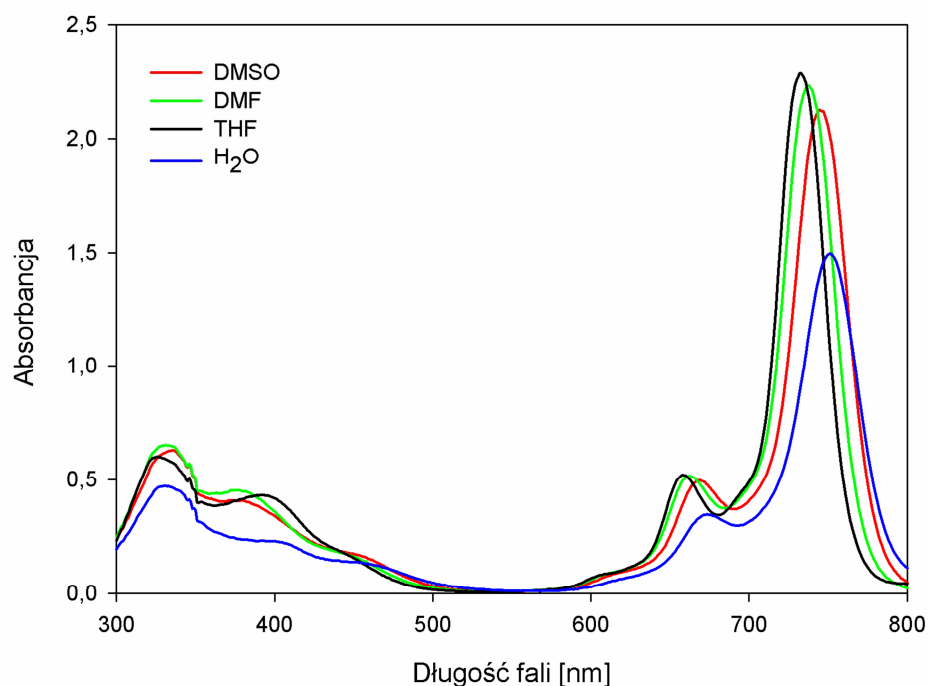


Ryc. 28 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc1** w różnych rozpuszczalnikach.

Tabela 21 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny **Pc1**.

Rozpuszczalnik	λ [nm]	A	Odważka [mg]	$10^5 \cdot c$ [mol·dm ⁻³]	ϵ [mol ⁻¹ ·dm ³ ·cm ⁻¹]	log ϵ
DMSO	347	0,8007	0,148	1,77	45243	4,7
	628	0,4550			25710	4,4
	696	2,1606			122081	5,1
DMF	347	0,7634	0,152	1,82	agregacja	
	624	0,4371				
	691	2,1908				
THF	346	0,8687	0,109	2,61	33322	4,5
	620	0,4003			15354	4,2
	687	2,0728			79513	4,9
0,5% wodny roztwór DMSO	347	0,4940	0,105	2,51	agregacja	
	647	0,3786				
	695	0,3586				

2.3. Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc2

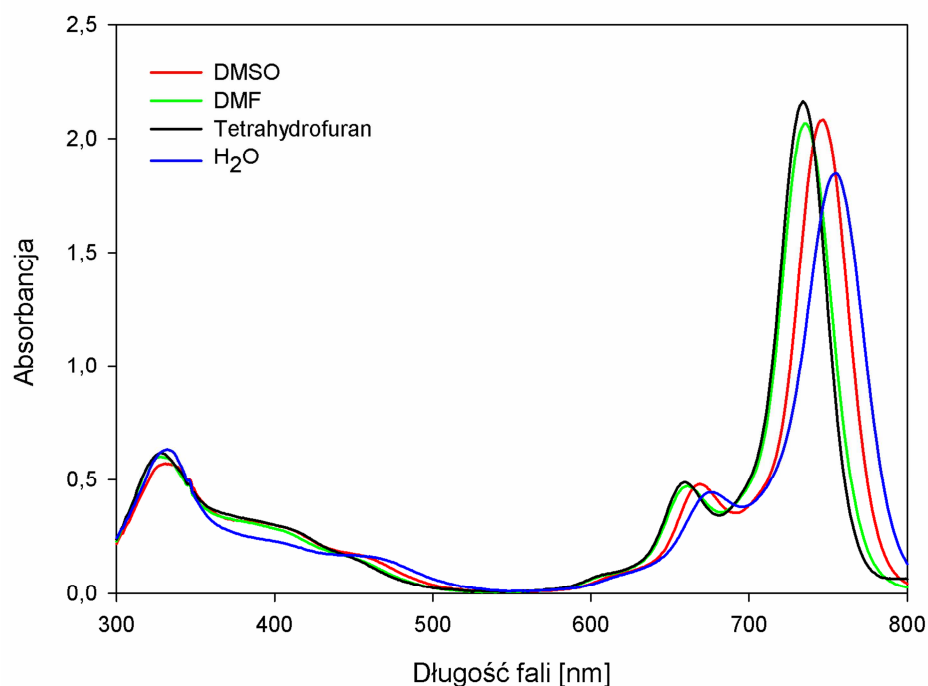


Ryc. 29 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc2** w różnych rozpuszczalnikach.

Tabela 22 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny **Pc2**.

Rozpuszczalnik	λ [nm]	A	Odważka [mg]	$10^5 \cdot c$ [mol·dm ⁻³]	ϵ [mol ⁻¹ ·dm ³ ·cm ⁻¹]	log ϵ
DMSO	335	0,6289	0,105	1,34	47020	4,7
	380	0,4078			30489	4,5
	666	0,4892			36575	4,6
	745	2,1251			158885	5,2
DMF	331	0,6526	0,109	1,39	47002	4,7
	378	0,4529			32619	4,5
	662	0,5163			37185	4,6
	738	2,2309			160674	5,2
THF	326	0,6008	0,107	1,36	44080	4,6
	392	0,4327			31746	4,5
	658	0,5215			38262	4,6
	732	2,2845			167610	5,2
H ₂ O	331	0,4721	0,101	1,29	36695	4,6
	400	0,2296			17846	4,3
	673	0,3467			26948	4,4
	751	1,4969			116349	5,1

2.4. Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc3

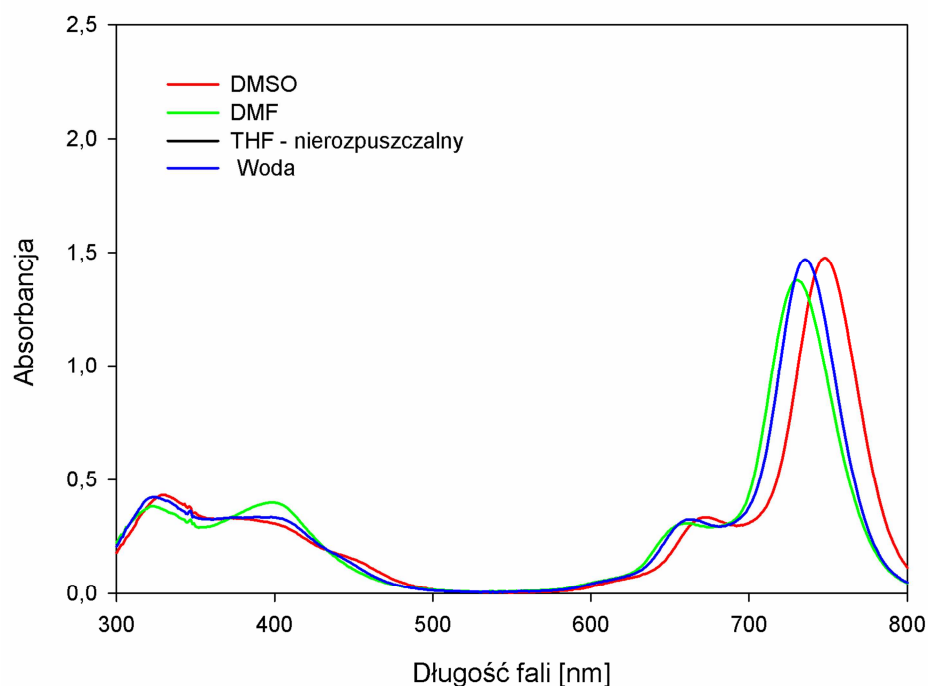


Ryc. 30 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc3** w różnych rozpuszczalnikach.

Tabela 23 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny **Pc3**.

Rozpuszczalnik	λ [nm]	A	Odważka [mg]	$10^5 \cdot c$ [mol·dm ⁻³]	ϵ [mol ⁻¹ ·dm ³ ·cm ⁻¹]	log ϵ
DMSO	331	0,5716	0,101	1,25	45592	4,7
	398	0,3026			24136	4,4
	669	0,4802			38302	4,6
	746	2,0836			166192	5,2
DMF	330	0,5759	0,105	1,30	44185	4,6
	663	0,4886			37487	4,6
	738	2,1389			164104	5,2
THF	328	0,6181	0,104	1,29	agregacja	
	659	0,4887				
	734	2,1629				
H ₂ O	332	0,6634	0,105	1,30	50898	4,7
	460	0,1627			12483	4,1
	676	0,4442			34081	4,5
	755	1,8481			141792	5,2

2.5. Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc4



Ryc. 31 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc4** w różnych rozpuszczalnikach.

Tabela 24 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny **Pc4**.

Rozpuszczalnik	λ [nm]	A	Odważka [mg]	$10^5 \cdot c$ [mol·dm ⁻³]	ϵ [mol·dm ⁻³ ·cm ⁻¹]	log ϵ
DMSO	328	0,4319	0,143	1,06	agregacja	
	375	0,3298				
	673	0,3344				
	748	1,4763				
DMF	322	0,3835	0,145	1,07	35779	4,6
	398	0,3991			37234	4,6
	660	0,3081			28744	4,5
	730	1,3770			128467	5,1
THF	nierozpuszczalny					
H ₂ O	323	0,4227	0,146	1,08	agregacja	
	398	0,3348				
	662	0,3243				
	735	1,4691				

3. Wpływ rozpuszczalników na elektronowe widma absorpcji ftalocyjanin **Pc1-4**

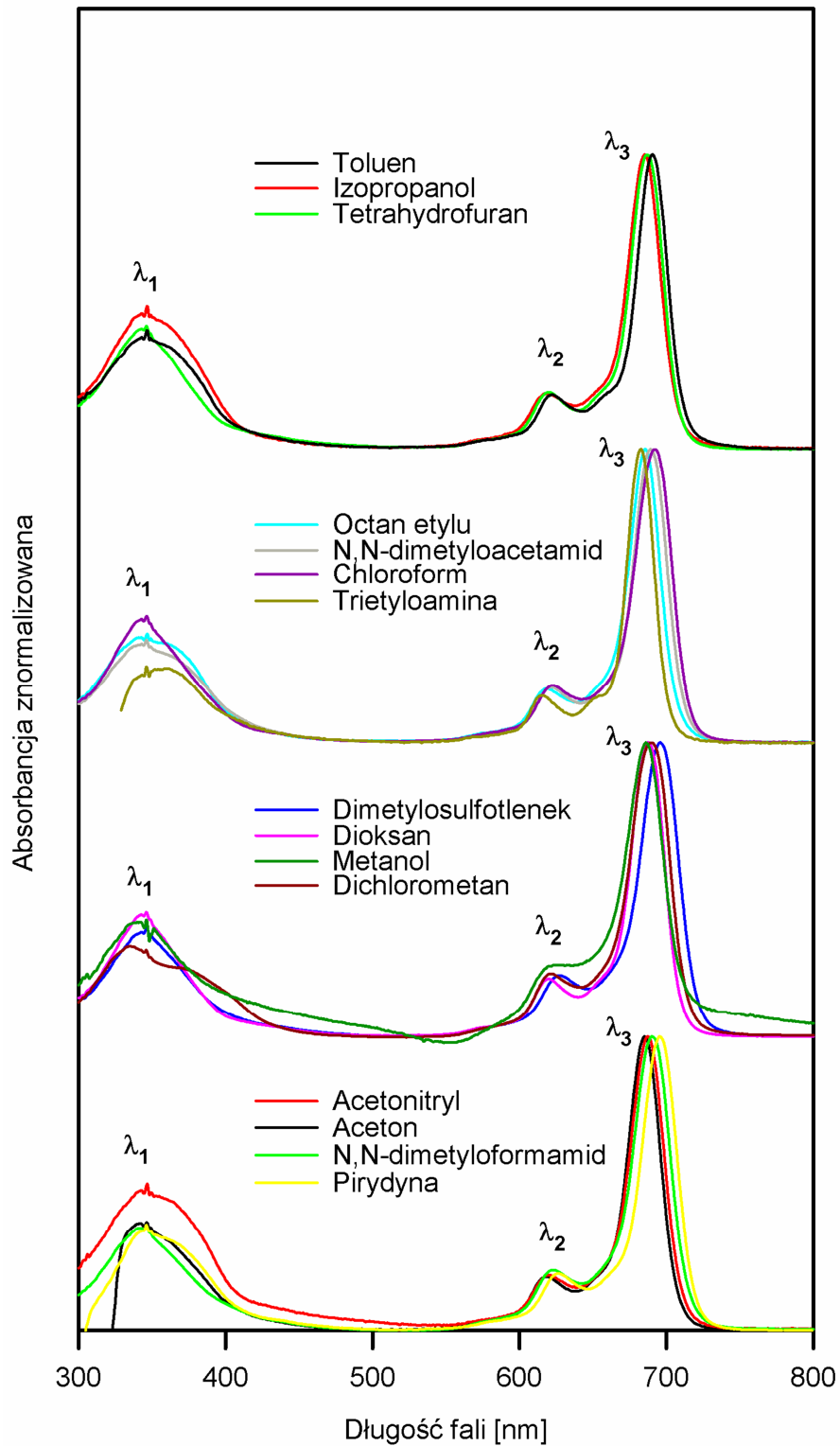
3.1. Metodyka badania

Wpływ rozpuszczalników na przebieg elektronowego widma absorpcji ftalocyjanin **Pc1-4**, analizowano porównując położenie maksimów absorpcji poszczególnych pasm dla 19 rozpuszczalników (Tabela 25).

Odważki substancji o masie dokładnie około 0,100 mg odważono w łódeczkach aluminiowych i umieszczono w kolbkach miarowych o objętości 5 cm³. Odważki rozpuszczano w 19 rozpuszczalnikach (Tabela 25), a następnie wykreślano widma absorpcji roztworów ftalocyjanin **Pc1-4**, w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej $l=1$ cm, w zakresie 200-900 nm. Uzyskane widma przedstawiono w formie znormalizowanej na Ryc. 32-35, natomiast położenie maksimów absorpcji pasm Soret'a i Q, w Tabelach 26-29.

Tabela 25 Charakterystyka rozpuszczalników zastosowanych w analizie przebiegu widm ftalocyjanin **Pc1-4**. Jako kryterium podziału rozpuszczalników na niepolarne i polarne, przyjęto wartość stałej dielektrycznej, ϵ (niepolarne – $\epsilon < 15$, polarne – $\epsilon > 15$).

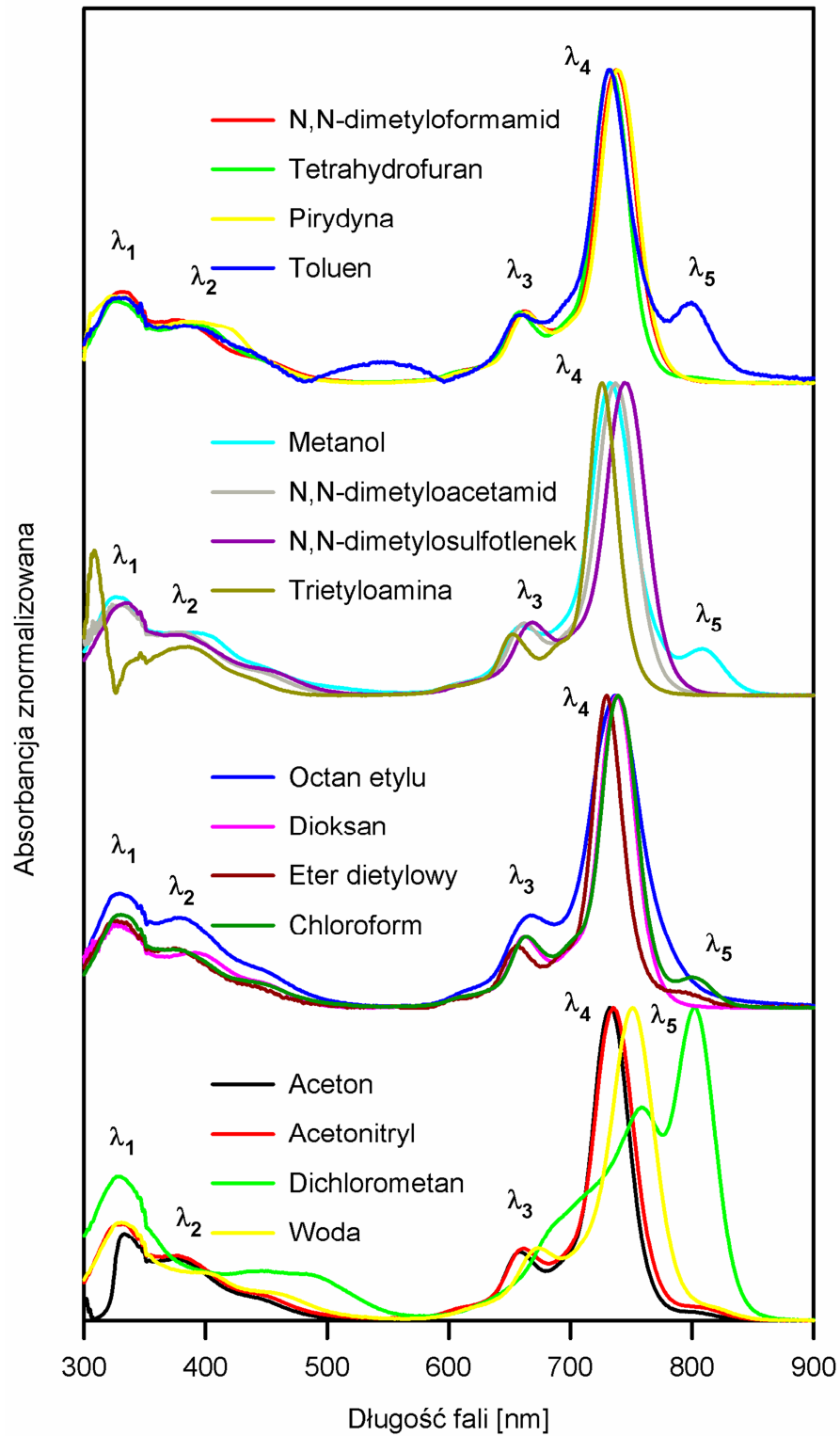
Rozpuszczalnik	Współczynnik załamania światła [n] (20 °C)	Stała dielektryczna [ϵ] (20 °C)	Moment dipolowy [μ , D]	$\frac{(n^2-1)}{(2n^2+1)}$	$\frac{(n^2-1)(2n^2+1) + (2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)}{}$
Rozpuszczalniki niepolarne					
<i>n</i> -Heksan	1,375	1,890	0,00	4,258	8,760
Cykloheksan	1,426	2,023	0,00	5,237	10,340
1,4-Dioksan	1,422	2,209	0,00	5,156	11,086
Toluen	1,497	2,379	0,37	6,803	13,479
TEA	1,401	2,420	3,60	4,742	11,596
Eter dietylowy	1,350	4,220	1,15	3,821	18,227
DMSO	1,478	4,700	3,96	6,359	22,734
Chloroform	1,446	4,806	1,04	5,653	22,461
Octan etylu	1,372	6,020	1,78	4,204	25,952
THF	1,407	7,600	1,75	4,858	32,995
Dichlorometan	1,445	8,930	1,60	5,632	39,128
Pirydyna	1,509	12,400	2,21	7,093	54,532
Rozpuszczalniki polarne					
Izopropanol	1,377	18,300	1,66	4,294	75,385
Aceton	1,359	20,700	2,88	3,975	84,678
Metanol	1,328	32,630	1,70	3,457	131,916
DMF	1,430	36,700	3,82	5,318	150,064
Acetonitryl	1,334	37,500	3,92	3,554	151,501
DMA	1,438	37,800	3,70	5,484	154,631
Woda	1,333	78,540	1,85	3,538	315,672



Ryc. 32 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc1** wykreślone w 15 rozpuszczalnikach.

Tabela 26 Położenie maksimum absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny **Pc1** wykreślonych w 15 rozpuszczalnikach.

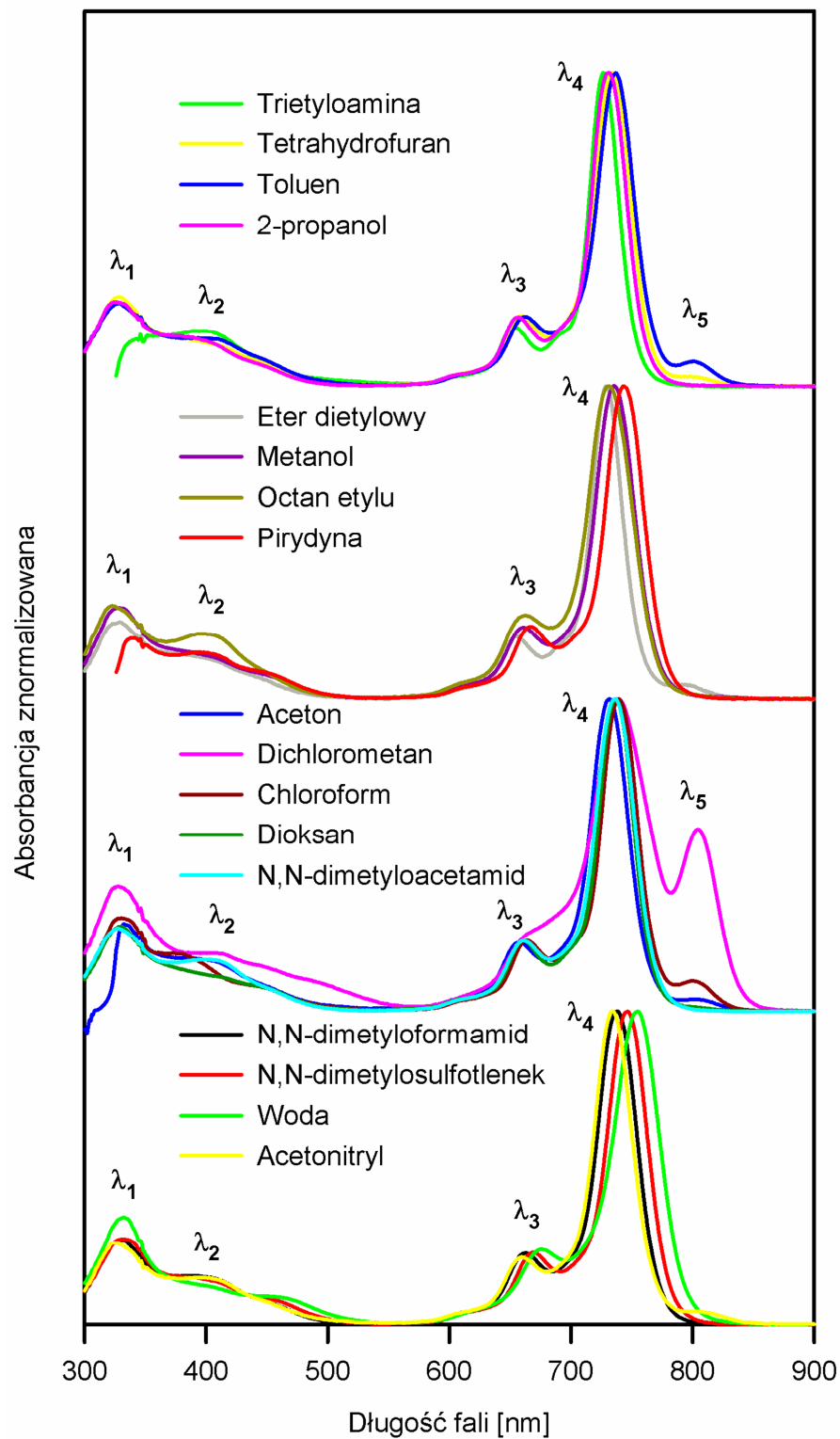
Rozpuszczalnik	Pasmo Soret'a	Pasmo Q	
	λ_1 [nm]	λ_2 [nm]	λ_3 [nm]
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny		
Cykloheksan	nierozpuszczalny		
1,4-Dioksan	346	619	688
Toluen	347	622	691
TEA	346	616	683
Eter dietylowy	nierozpuszczalny		
DMSO	346	628	696
Chloroform	346	624	692
Octan etylu	347	617	686
THF	347	619	687
Dichlorometan	336	621	690
Pirydyna	346	625	695
Izopropanol	347	621	685
Aceton	347	618	685
Metanol	342	621	686
DMF	346	624	691
Acetonitryl	347	620	687
DMA	347	622	689
Woda	nierozpuszczalny		



Ryc. 33 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc2** wykreślone w 16 rozpuszczalnikach.

Tabela 27 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny **Pc2**, wykreślonych w 16 rozpuszczalnikach.

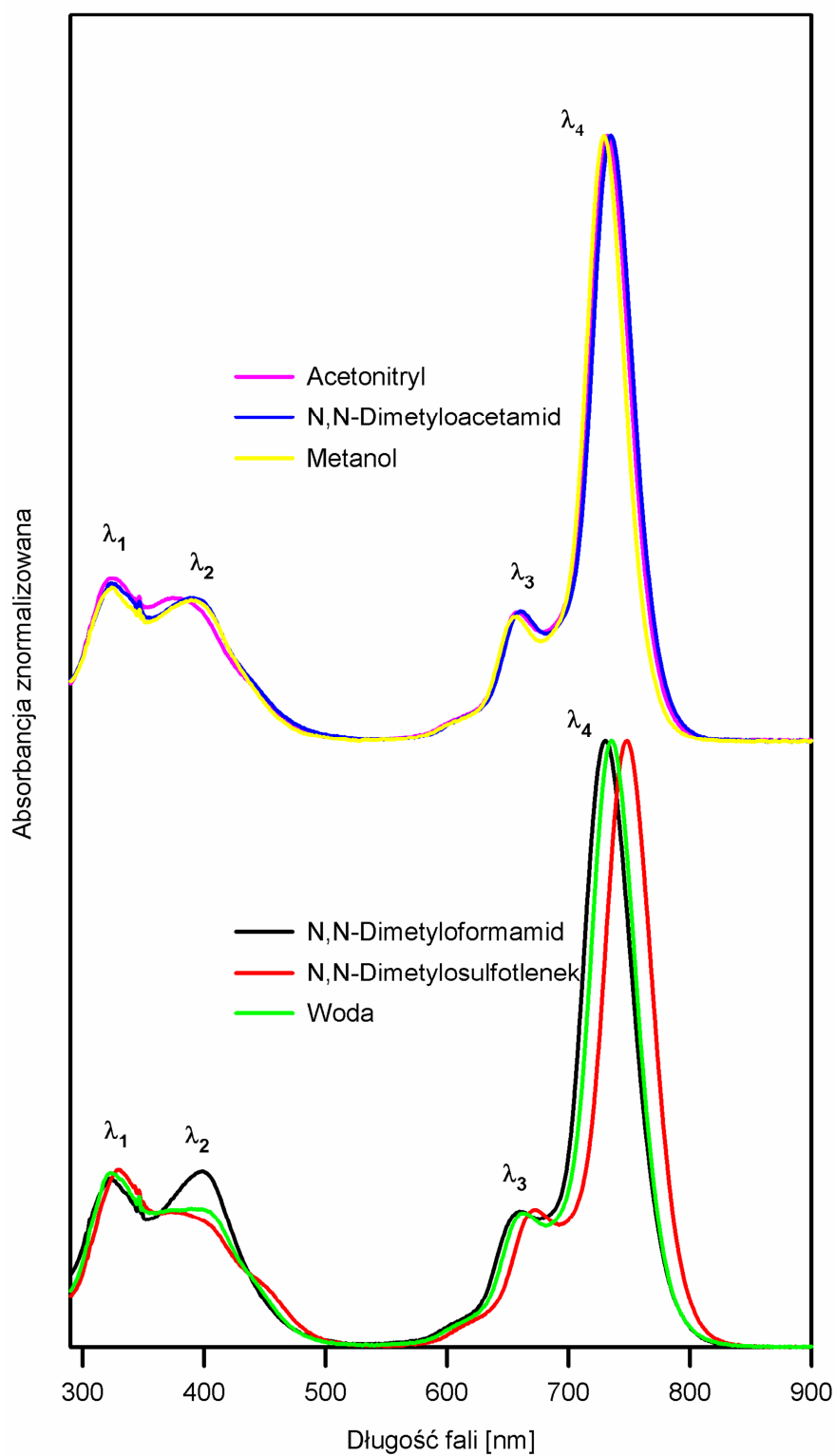
Rozpuszczalnik	Pasma Soret'a		Pasma Q		
	λ_1 [nm]	λ_2 [nm]	λ_3 [nm]	λ_4 [nm]	λ_5 [nm]
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny				
Cykloheksan	nierozpuszczalny				
1,4-Dioksan	323	391	662	738	-
Toluen	334	382	659	731	800
TEA	309	387	651	726	-
Eter dietylowy	327	-	655	730	-
DMSO	336	381	667	744	-
Chloroform	330	378	664	739	800
Octan etylu	330	379	688	737	-
THF	326	392	659	732	-
Dichlorometan	327	-		761	802
Pirydyna	323	388	664	738	-
Izopropanol	nierozpuszczalny				
Aceton	333	374	658	733	-
Metanol	325	389	659	733	808
DMF	331	374	662	738	-
Acetonitryl	332	376	661	735	-
DMA	334	377	661	737	-
Woda	331	-	671	751	-



Ryc. 34 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc3** wykreślone w 17 rozpuszczalnikach.

Tabela 28 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny **Pc3** wykreślonych w 17 rozpuszczalnikach.

Rozpuszczalnik	Pasma Soret'a		Pasma Q		
	λ_1 [nm]	λ_2 [nm]	λ_3 [nm]	λ_4 [nm]	λ_5 [nm]
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny				
Cykloheksan	nierozpuszczalny				
1,4-Dioksan	329	-	661	737	-
Toluen	328	-	662	737	802
TEA	393	-	652	727	-
Eter dietylowy	329	-	655	727	
DMSO	331	-	668	747	-
Chloroform	330	377	659	739	795
Octan etylu	323	399	662	731	-
THF	328	-	660	734	-
Dichlorometan	328	404		739	805
Pirydyna	340	395	668	743	-
Izopropanol	325	-	656	731	-
Aceton	332	394	657	732	-
Metanol	328	-	660	735	-
DMF	332	390	661	738	-
Acetonitryl	324	394	659	734	-
DMA	327	398	661	736	-
Woda	332	-	675	755	-



Ryc. 35 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc4** wykreślone w 6 rozpuszczalnikach.

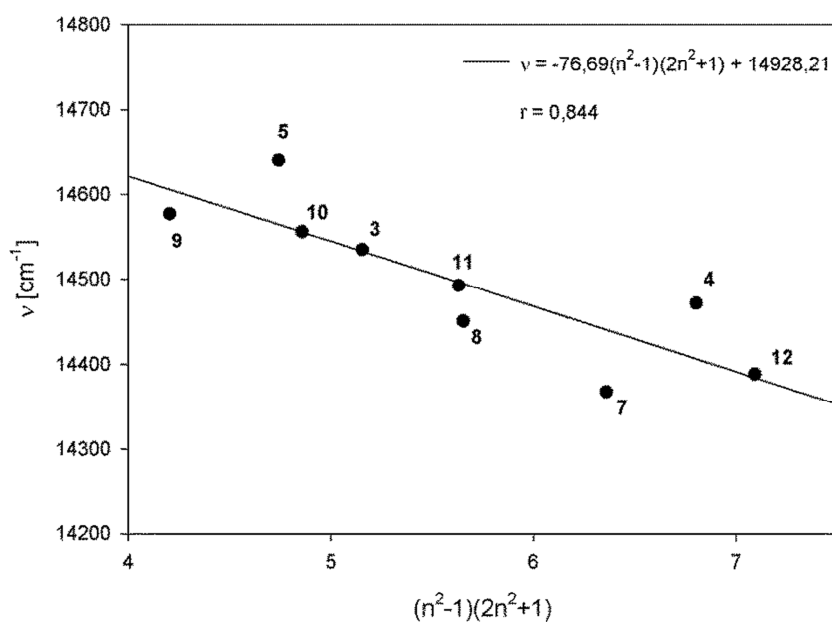
Tabela 29 Położenie maksimum absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny **Pc4** wykreślonych w 6 rozpuszczalnikach.

Rozpuszczalnik	Pasma Soret'a		Pasma Q	
	λ_1 [nm]	λ_2 [nm]	λ_3 [nm]	λ_4 [nm]
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny			
Cykloheksan	nierozpuszczalny			
1,4-Dioksan	nierozpuszczalny			
Toluen	nierozpuszczalny			
TEA	nierozpuszczalny			
Eter dietylowy	nierozpuszczalny			
DMSO	329	381	672	748
Chloroform	nierozpuszczalny			
Octan etylu	nierozpuszczalny			
THF	nierozpuszczalny			
Dichlorometan	nierozpuszczalny			
Pirydyna	nierozpuszczalny			
Izopropanol	nierozpuszczalny			
Aceton	nierozpuszczalny			
Metanol	324	393	656	729
DMF	322	398	659	730
Acetonitryl	325	381	660	732
DMA	323	392	657	735
Woda	323	398	664	735

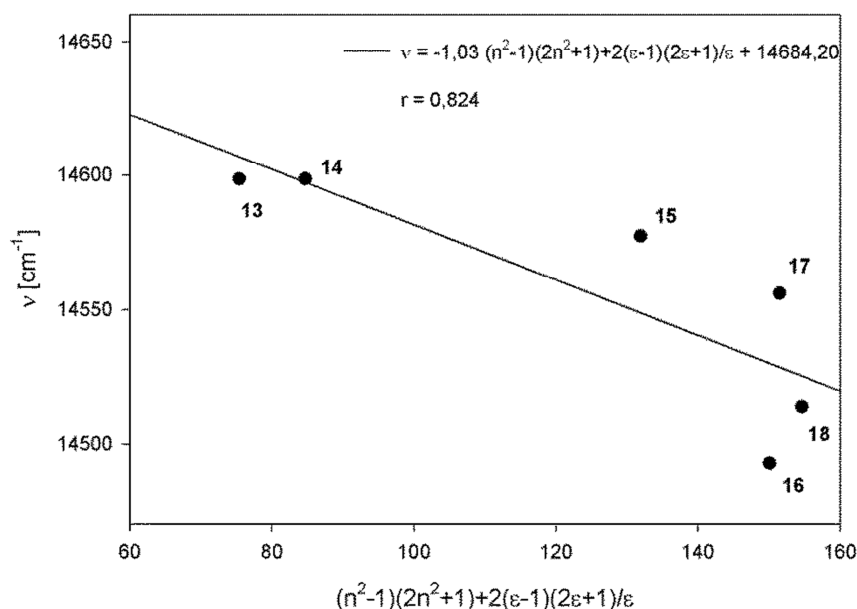
3.2. Analiza oddziaływań ftalocyjanin Pc1-4 z rozpuszczalnikami

W celu zbadania natury oddziaływań rozpuszczalnik-ftalocyjanina korzystano z metody zaproponowanej przez Bayliss'a-McRae [198]. Wykorzystując widma wykreślone wg pkt. 3.1., odczytano wartość absorbancji w maksimum pasma Q, a następnie wyznaczono graficzną zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}], odpowiadającej maksimum pasma Q ftalocyjanin **Pc1-4**, od wyrażenia $(n^2-1)/(2n^2+1)$ dla rozpuszczalników niepolarnych oraz $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)$ dla rozpuszczalników polarnych, gdzie n oznacza wartość współczynnika załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalnika [199,200].

3.2.1. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc1 z rozpuszczalnikami

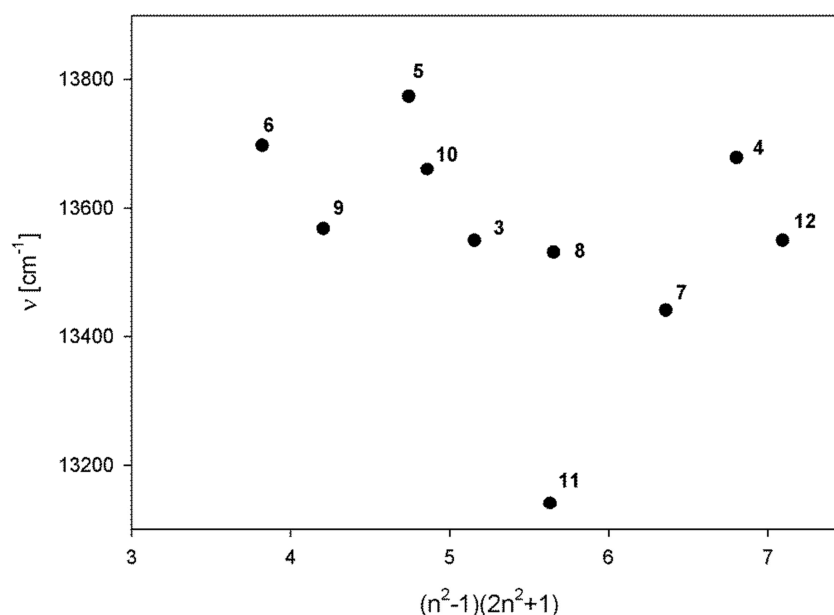


Ryc. 36 Zależność liczby falowej v_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc1** od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- n -heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trietyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.

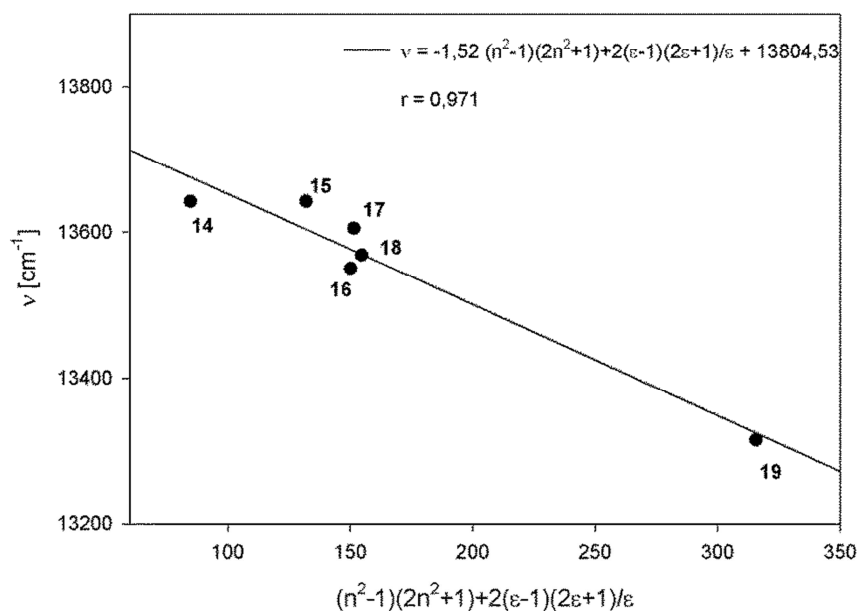


Ryc. 37 Zależność liczby falowej v_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc1** od parametru $(n^2-1)(2n^2+1) + 2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.

3.2.2. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc2 z rozpuszczalnikami

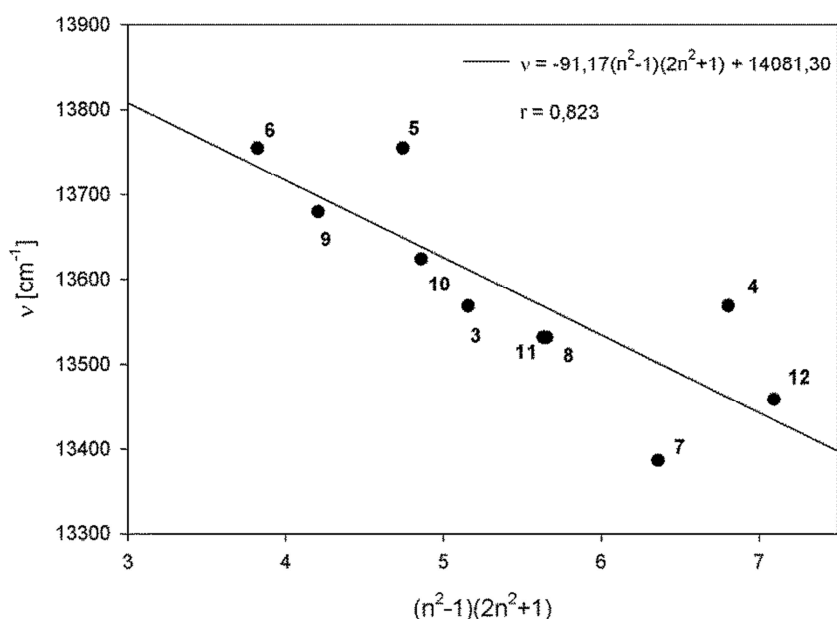


Ryc. 38 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm⁻¹] maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc2** od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- *n*-heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trytyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.

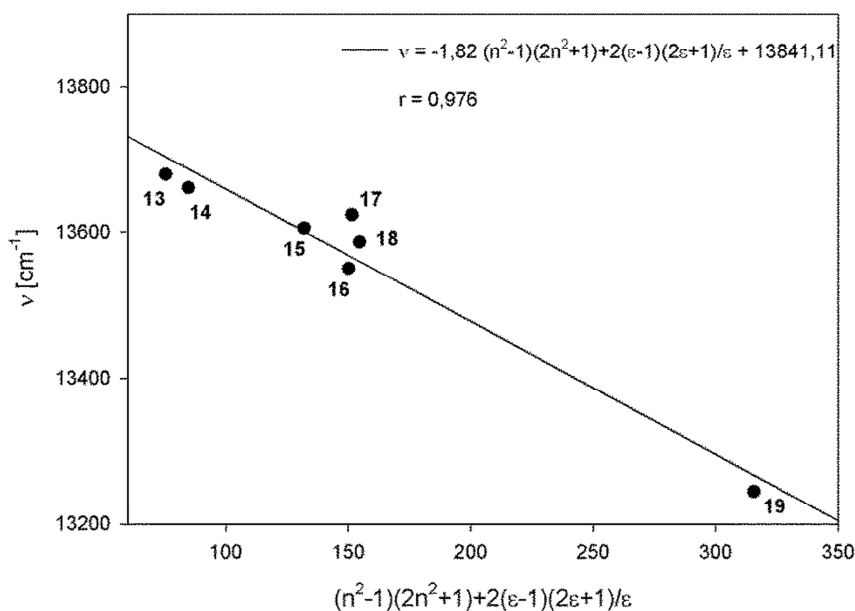


Ryc. 39 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm⁻¹] maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc2** od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.

3.2.3. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc3 z rozpuszczalnikami

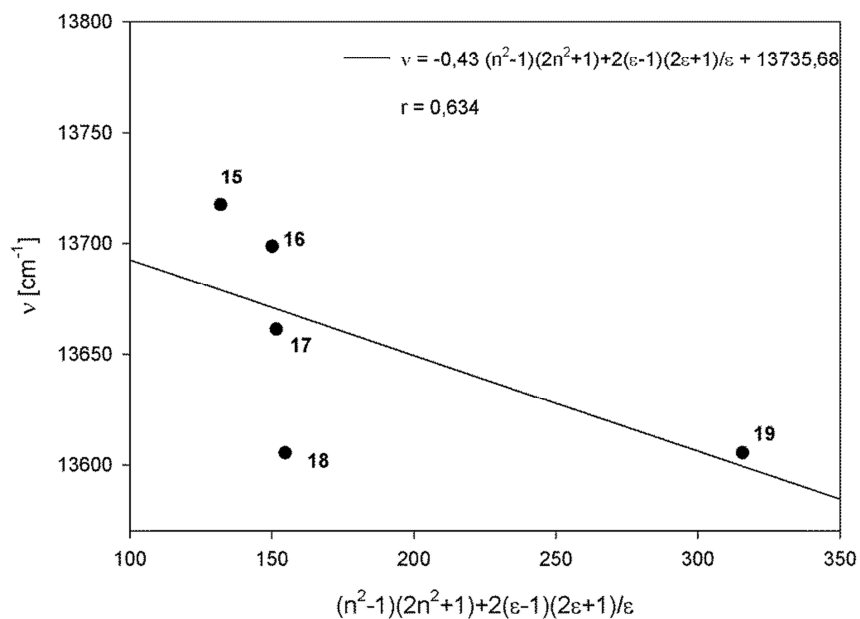


Ryc. 40 Zależność liczby falowej v_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc3 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- n -heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trietyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.



Ryc. 41 Zależność liczby falowej v_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc3 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.

3.2.4. Analiza oddziaływań ftalocyjaniny Pc4 z rozpuszczalnikami



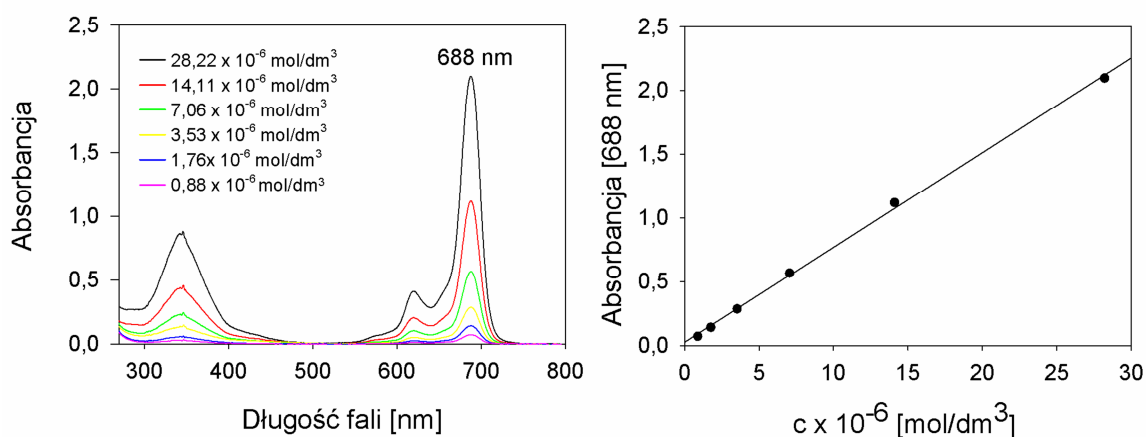
Ryc. 42 Zależność liczby falowej ν_{max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc4 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.

4. Ocena agregacji

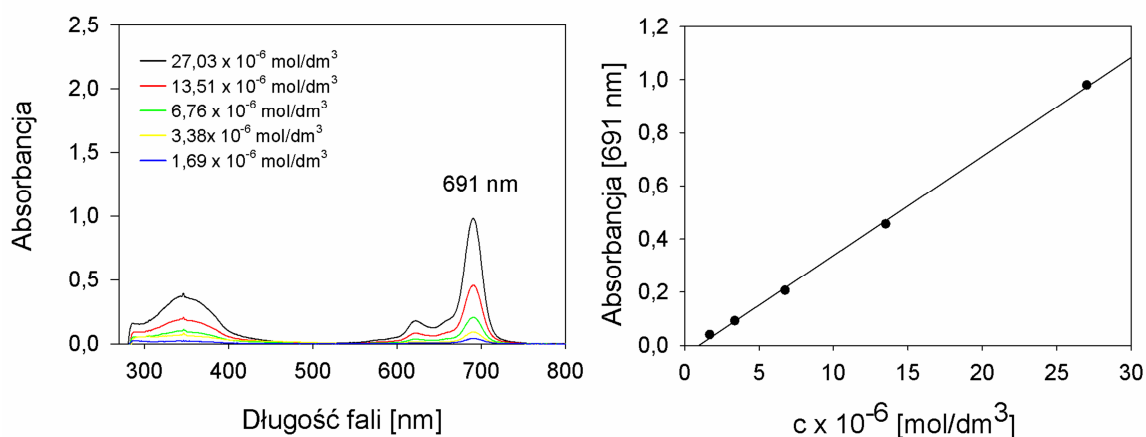
Badanie tendencji do agregacji badanych ftalocyjanin **Pc1-4** analizowano metodą spektrofotometryczną. W tym celu wykreślono wykresy zależności $A=f(c)$ badanych związków w 19 rozpuszczalnikach (1,4-dioksan, acetonitryl, aceton, chloroform, cykloheksan, dichlorometan, eter dietylowy, dimetyloacetamid, dimetyloformamid, dimetylosulfotlenek, izopropanol, *n*-heksan, metanol, octan etylu, pirydyna, trietyloamina, tetrahydrofuran, toluen, woda). Odważki substancji o masie dokładnie około 0,100 mg odważono w łódeczkach aluminiowych i umieszczono w kolbkach miarowych o objętości 5 cm³. Odważki rozpuszczano w rozpuszczalniku, otrzymując roztwór wzorcowy, z którego następnie uzyskano serię roztworów roboczych.

4.1. Ocena agregacji ftalocyjaniny Pc1

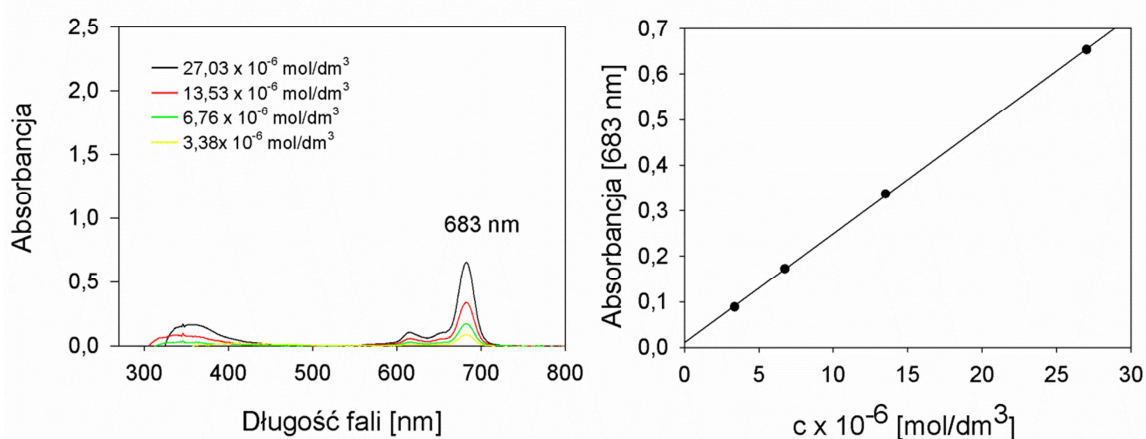
Elektronowe widma absorpcji wykreślono dla serii roztworów ftalocyjaniny **Pc1** w 16 rozpuszczalnikach w zakresie stężeń $0,78-37,39 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³. Następnie analizowano zależność absorbancji, przy długości fali maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc1**, od stężenia. Elektronowe widma absorpcji oraz wykresy zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** przedstawiono na Ryc. 43-58, a parametry krzywych wzorcowych oraz ocenę statystyczną umieszczono w Tabeli 30.



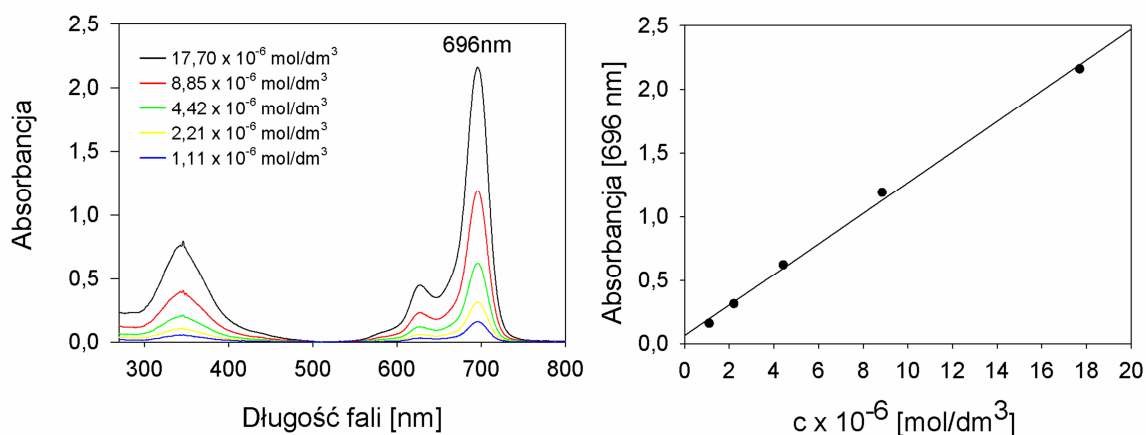
Ryc. 43 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w 1,4-dioksanie ($\lambda=688$ nm).



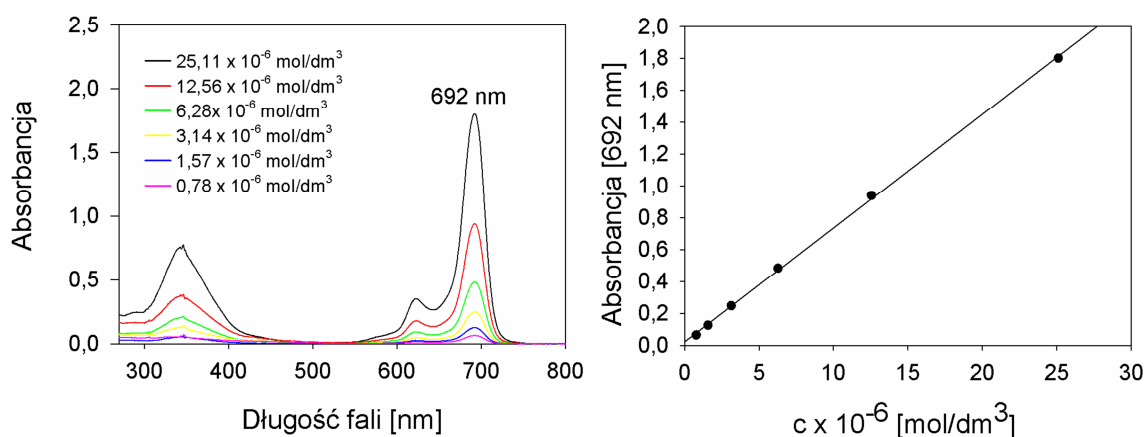
Ryc. 44 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w toluenie ($\lambda=691$ nm).



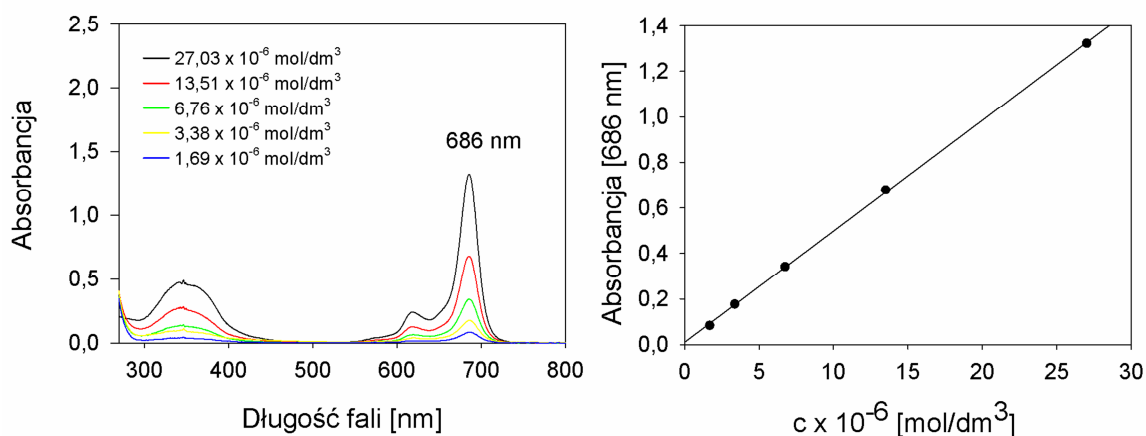
Ryc. 45 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w trietyloaminie ($\lambda=683$ nm).



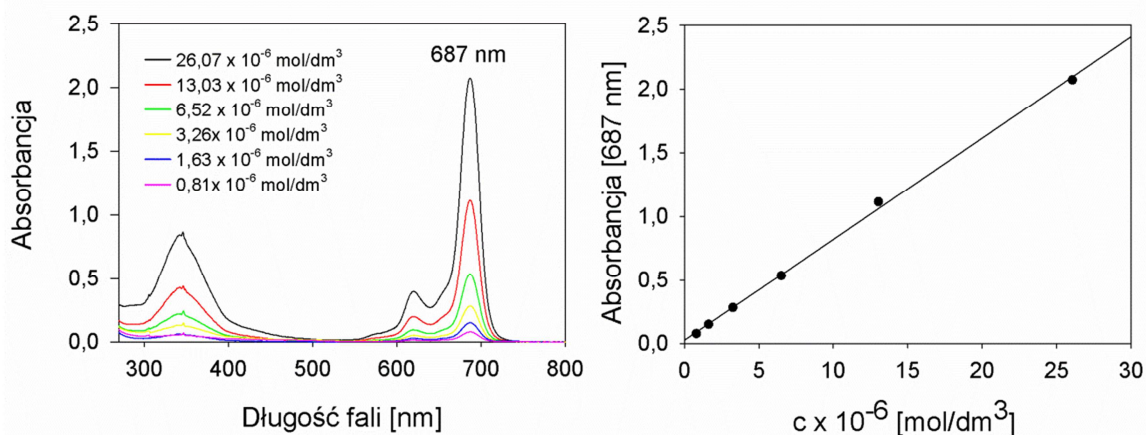
Ryc. 46 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w dimetylosulfotlenku ($\lambda=696$ nm).



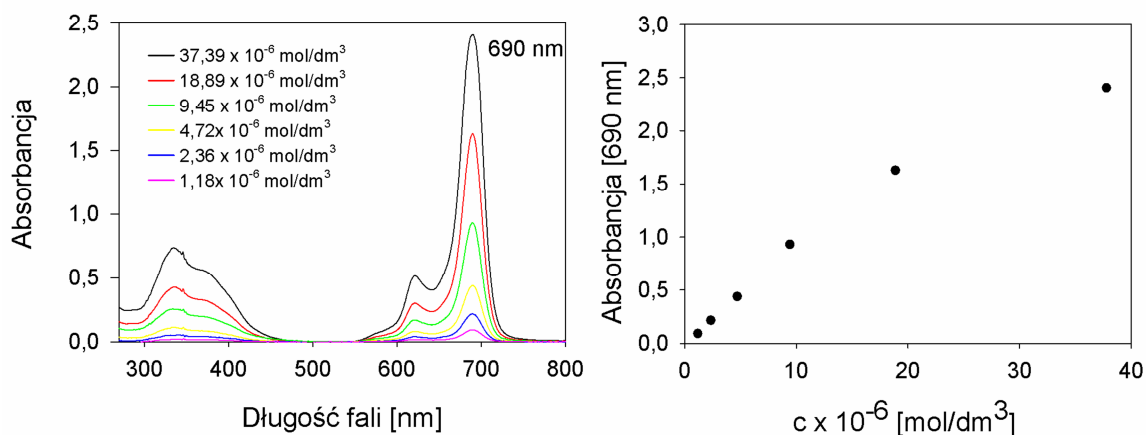
Ryc. 47 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w chloroformie ($\lambda=692 \text{ nm}$).



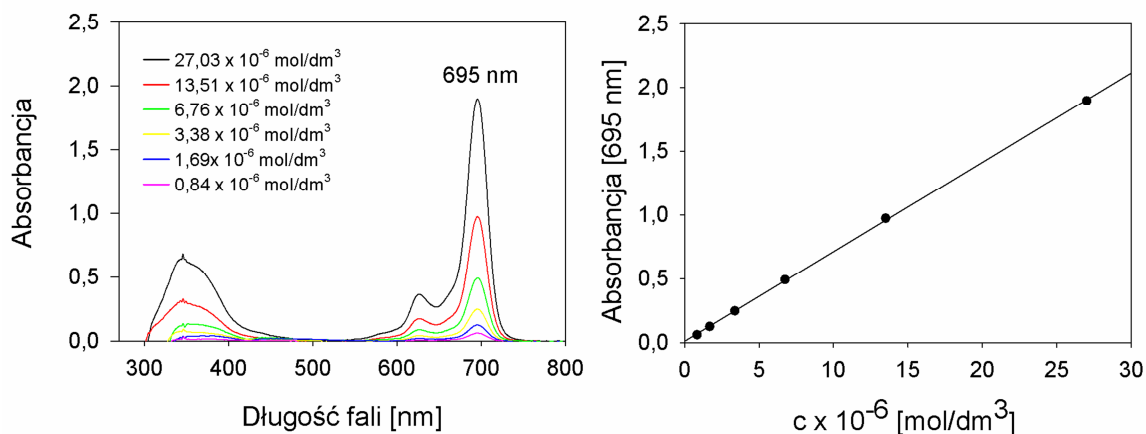
Ryc. 48 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w octanie etylu ($\lambda=686 \text{ nm}$).



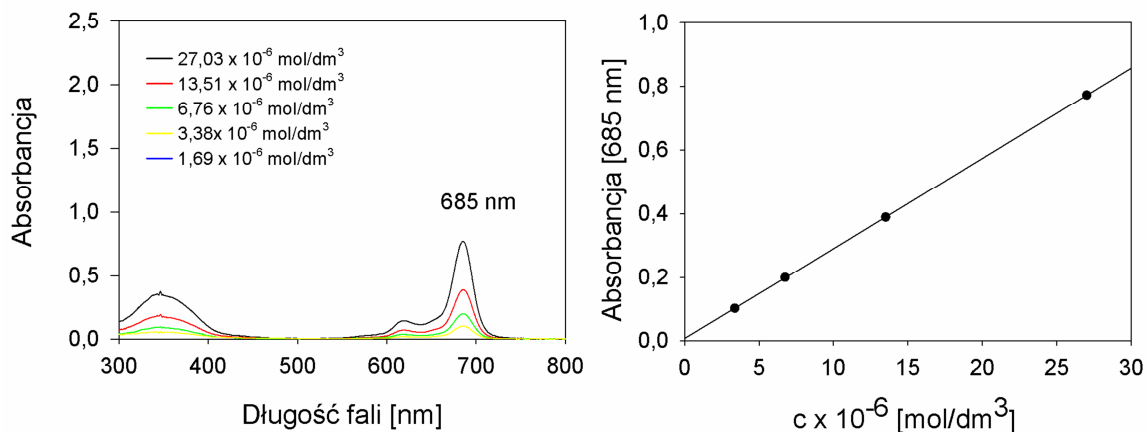
Ryc. 49 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w tetrahydrofuranie ($\lambda=687 \text{ nm}$).



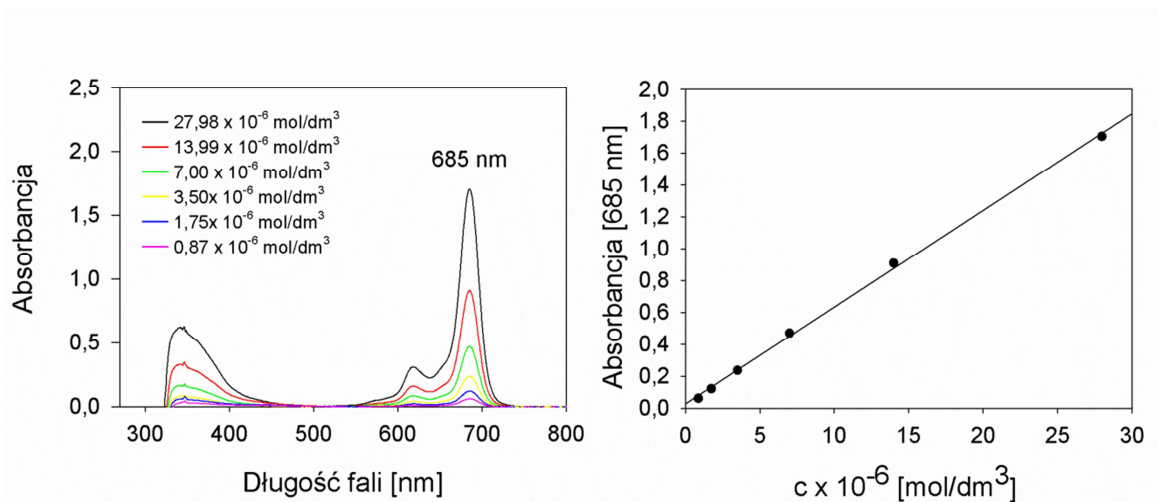
Ryc. 50 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w dichlorometanie ($\lambda=690$ nm).



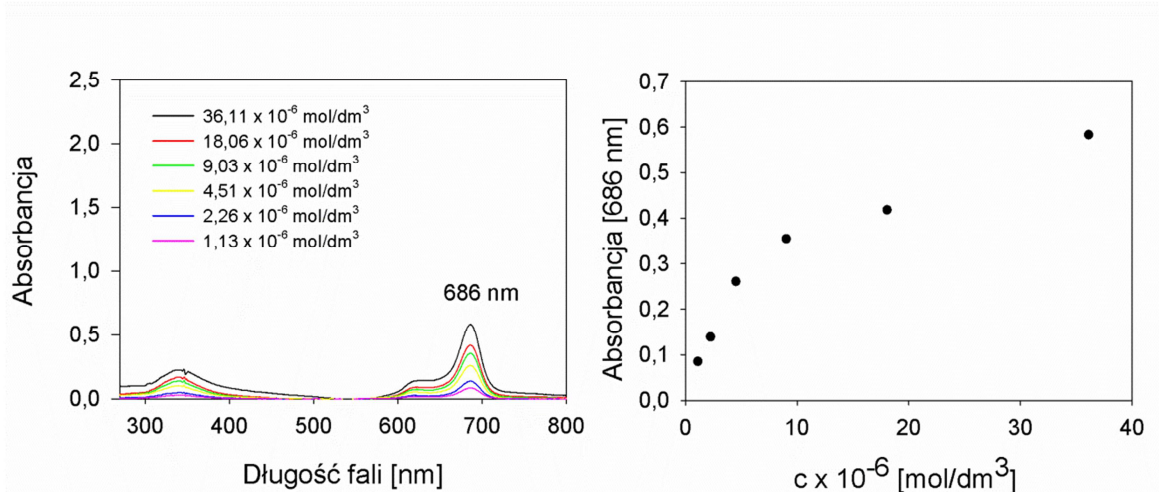
Ryc. 51 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w pirydynie ($\lambda=695$ nm).



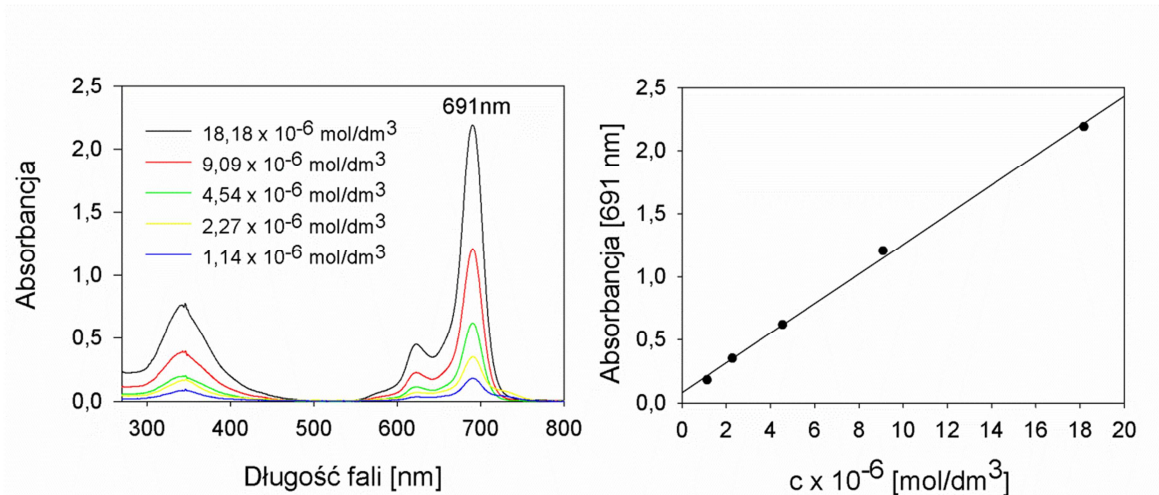
Ryc. 52 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w izopropanolu ($\lambda=685$ nm).



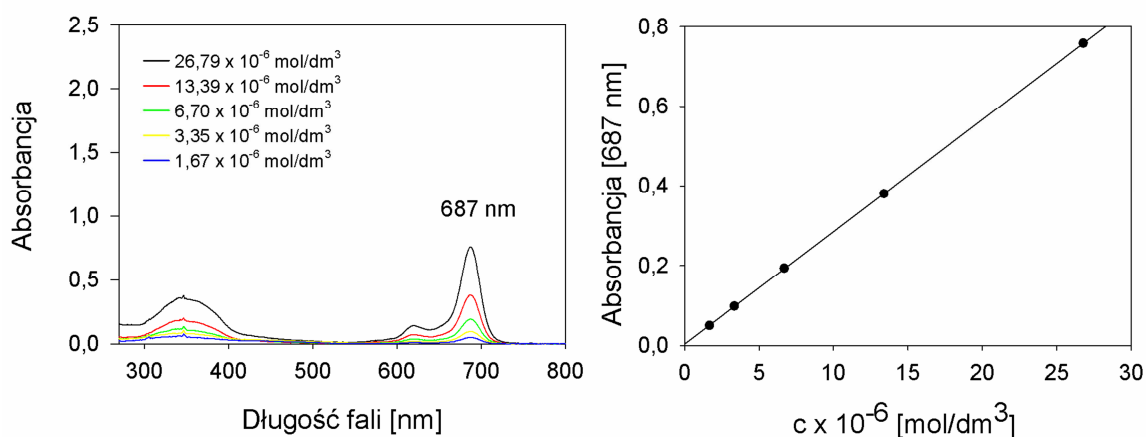
Ryc. 53 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w acetonie ($\lambda=685$ nm).



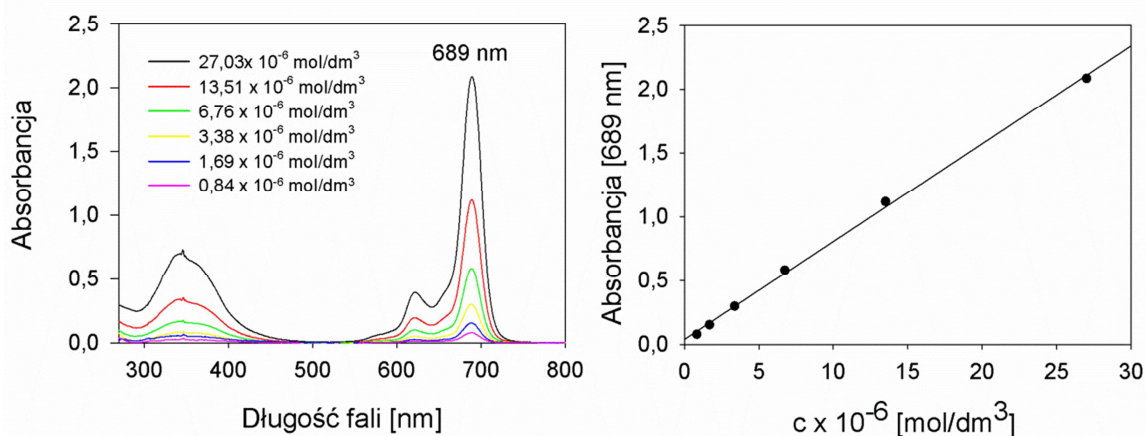
Ryc. 54 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w metanolu ($\lambda=686$ nm).



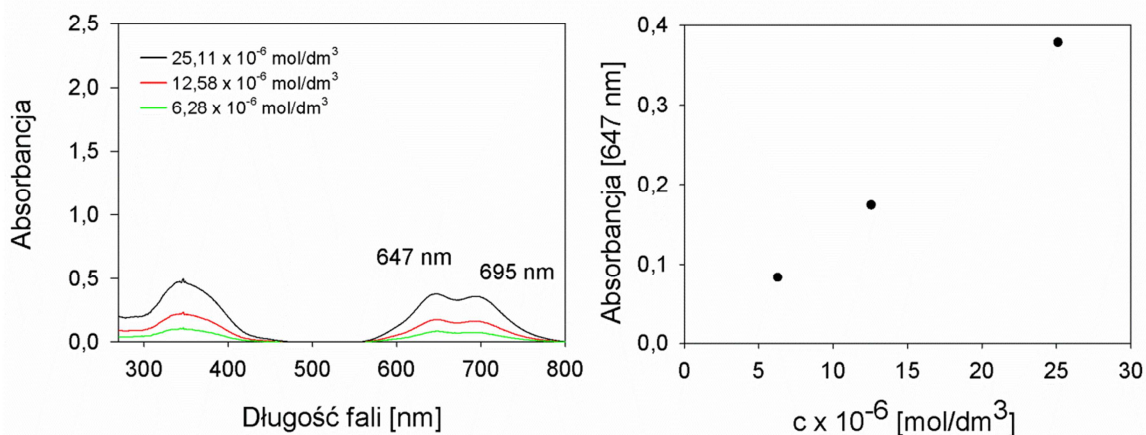
Ryc. 55 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w dimetyloformamidzie ($\lambda=691$ nm).



Ryc. 56 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w acetonitrylu ($\lambda=687$ nm).



Ryc. 57 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w dimetyloacetamidzie ($\lambda=689$ nm).



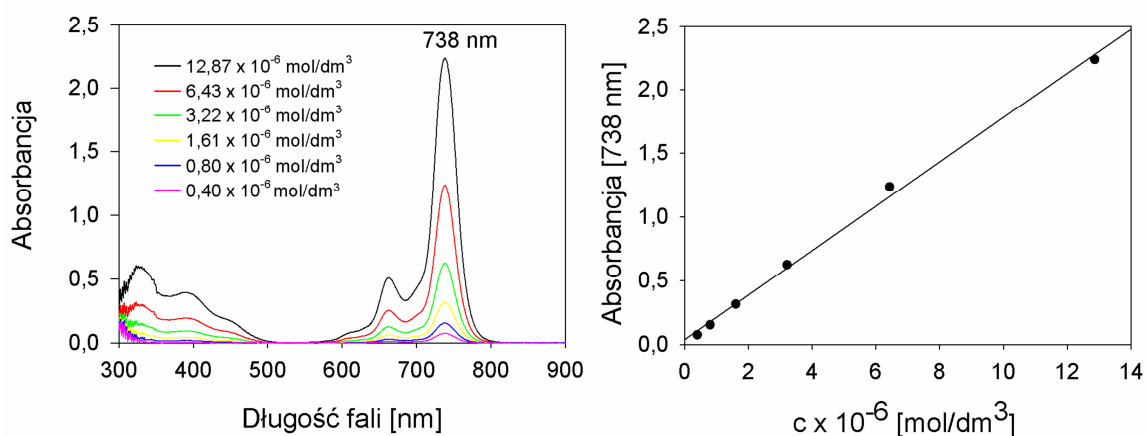
Ryc. 58 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A_{\lambda_1}=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc1** w 0,5% wodnym roztworze DMSO ($\lambda_1=647$ nm, $\lambda_2=695$ nm).

Tabela 30 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyaniny **Pc1** wraz z analizą statystyczną.

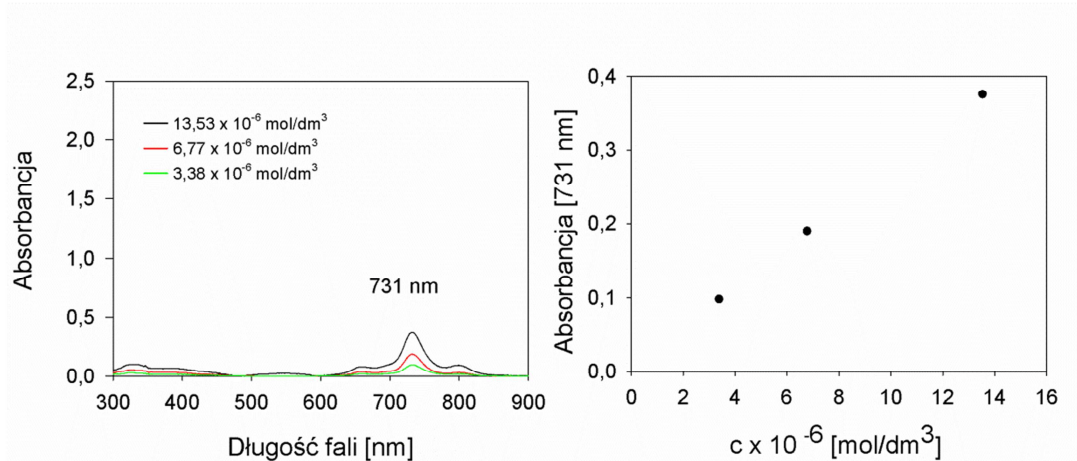
Rozpuszczalnik	$10^2 \cdot a$	$10^2 \cdot \Delta a$	$10^2 \cdot b$	$10^2 \cdot \Delta b$	$10^4 \cdot S_a$	$10^4 \cdot S_b$	t_a	t_b	$t_{a,f}$	r	n
Rozpuszczalniki niepolarne											
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny										
Cykloheksan	nierozpuszczalny										
1,4-Dioksan	7,4200	0,1000	2,6800	1,3283	12,5000	166,0000	925,6242	2,0177	2,4469	0,999	6
Toluen	3,7300	0,0536	-3,4900	0,7477	6,1100	85,3000	1797,5736	4,6678	2,5706	1,000	5
Trietyloamina	2,3900	0,0195	1,0700	0,3048	1,9900	31,1000	5005,2197	3,5108	2,7764	1,000	4
Eter dietylowy	nierozpuszczalny										
Dimetylosulfotlenek	12,0000	0,3234	6,5700	2,9539	36,9000	337,0000	272,0779	2,2242	2,5706	0,999	5
Chloroform	7,1300	0,0629	2,3300	0,7449	7,8600	93,1000	1476,6597	3,1278	2,4469	1,000	6
Octan etylu	4,8700	0,0347	1,0700	0,4847	3,9600	55,3000	2740,6856	2,2075	2,5706	1,000	5
Tetrahydrofuran	7,9400	0,1136	2,7400	1,3923	14,2000	174,0000	810,2334	1,9680	2,4469	0,999	6
Dichlorometan	6,3500	0,5025	16,5000	8,9617	62,8000	1120,0000	186,3699	1,8412	2,4469	0,981	6
Pirydyna	7,0000	0,0370	1,1700	0,4713	4,6300	58,9000	2510,3223	2,4826	2,4469	1,000	6
Rozpuszczalniki polarne											
Izopropanol	2,8300	0,0045	0,7330	0,0702	0,4600	7,1600	21555,4094	10,4465	2,7764	1,000	4
Aceton	6,0600	0,0840	2,7700	1,1042	10,5000	138,0000	1118,1210	2,5086	2,4469	0,999	6
Metanol	1,2900	0,1928	15,4000	3,2806	24,1000	410,0000	511,8841	4,6942	2,4469	0,937	6
Dimetyloformamid	11,8000	0,2673	8,2400	2,5069	30,5000	286,0000	329,9177	3,2870	2,5706	0,999	5
Acetonitryl	2,8100	0,0043	0,4000	0,0595	0,4910	6,7900	23235,6817	6,7209	2,5706	1,000	5
Dimetyloactamid	7,6600	0,1120	4,0200	1,4323	14,0000	179,0000	824,3077	2,8067	2,4469	0,999	6
Woda	nierozpuszczalny										

4.2. Ocena agregacji ftalocyjaniny Pc2

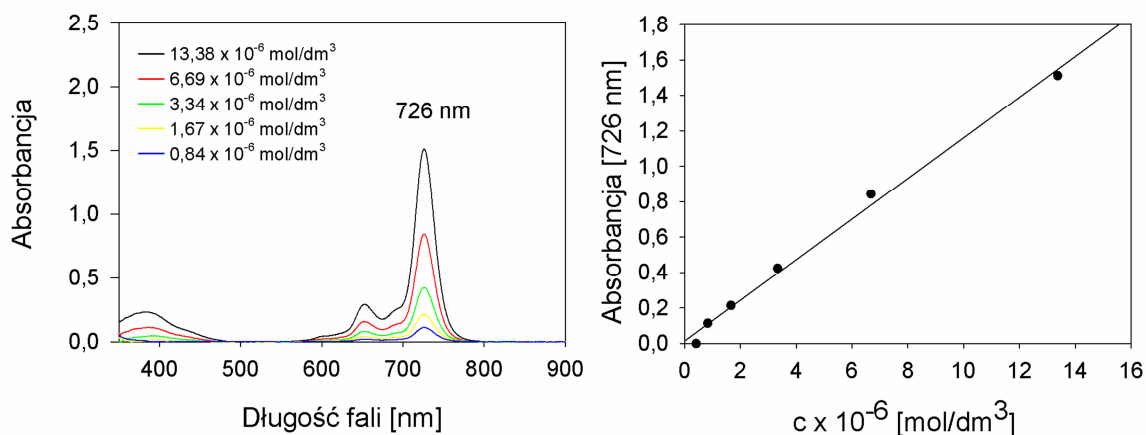
Elektronowe widma absorpcji wykreślono dla serii roztworów ftalocyjaniny **Pc2** w 16 rozpuszczalnikach w zakresie stężeń $0,40-13,88 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Następnie analizowano zależność absorbancji, przy długości fali maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc2**, od stężenia. Elektronowe widma absorpcji oraz wykresy zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** przedstawiono na Ryc. 59-74, a parametry krzywych wzorcowych oraz ocenę statystyczną umieszczono w Tabeli 31.



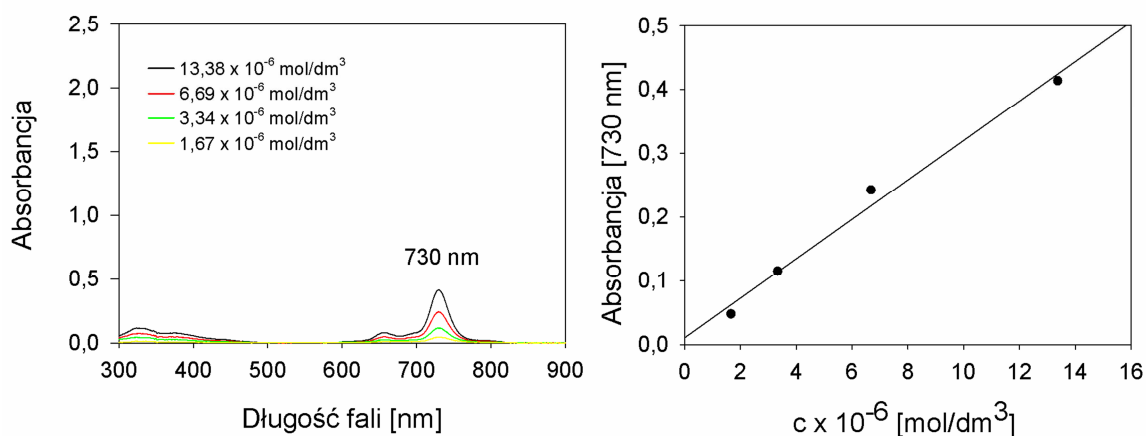
Ryc. 59 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w 1,4-dioksanie ($\lambda=738 \text{ nm}$).



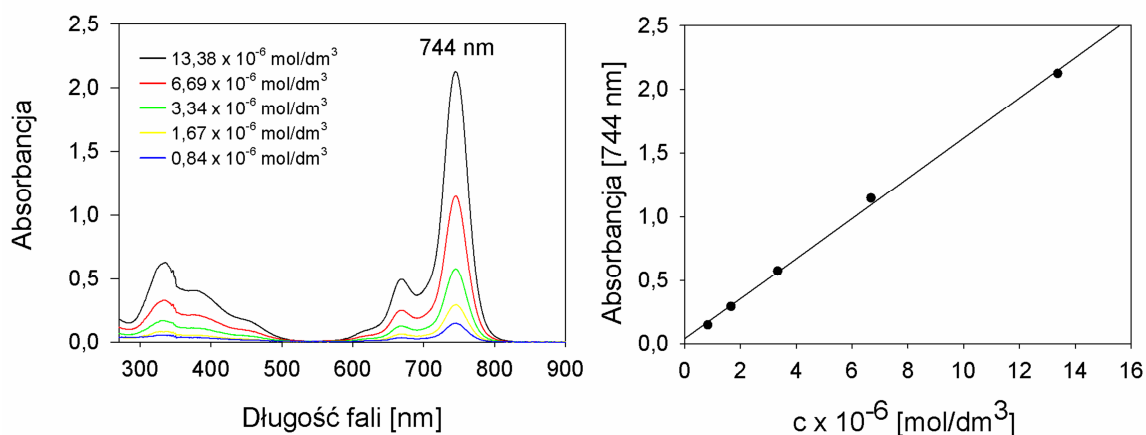
Ryc. 60 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w toluenie ($\lambda=731 \text{ nm}$).



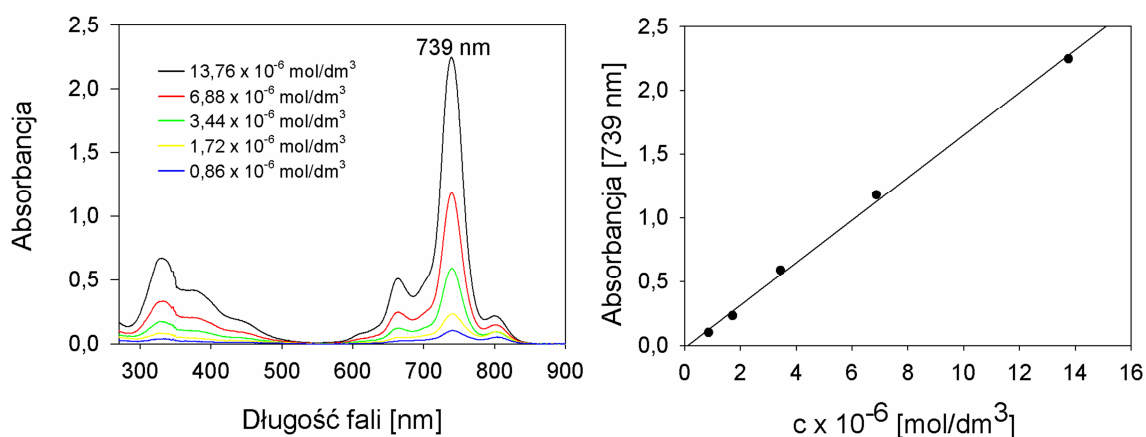
Ryc. 61 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w trietyloaminie ($\lambda=726$ nm).



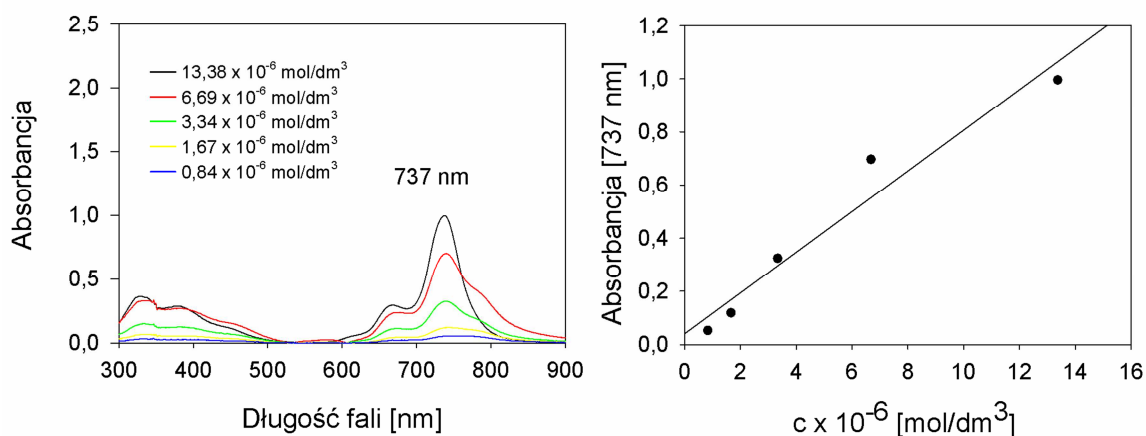
Ryc. 62 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w eterze dietylowym ($\lambda=730$ nm).



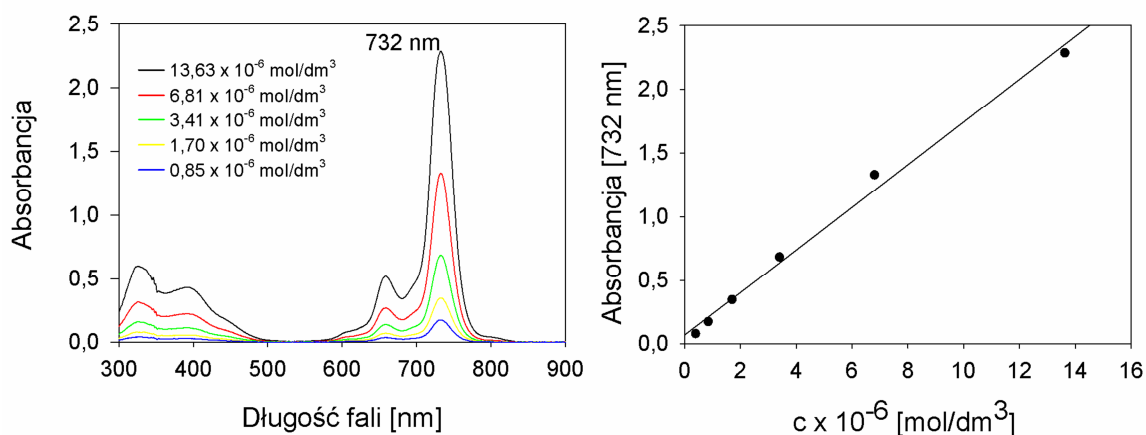
Ryc. 63 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w dimetylosulfotlenku ($\lambda=744$ nm).



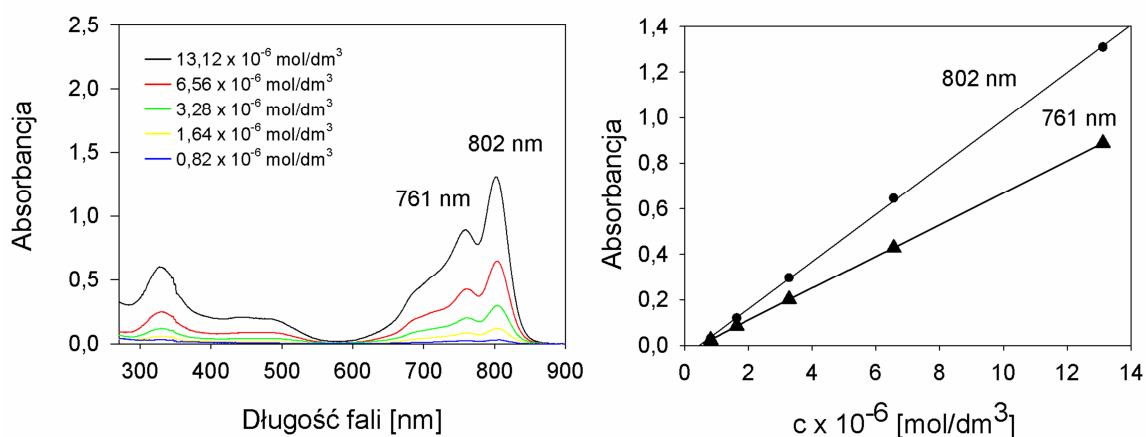
Ryc. 64 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w chloroformie ($\lambda=739$ nm).



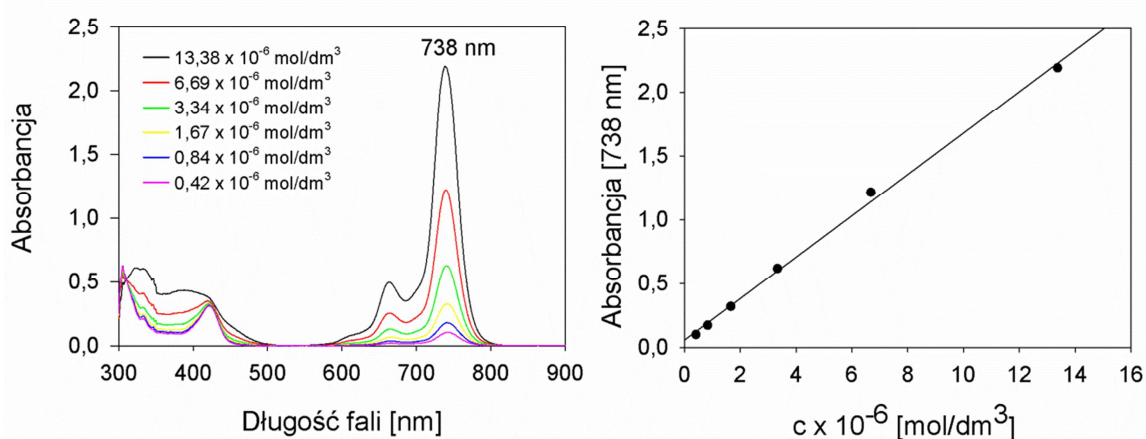
Ryc. 65 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w octanie etylu ($\lambda=737$ nm).



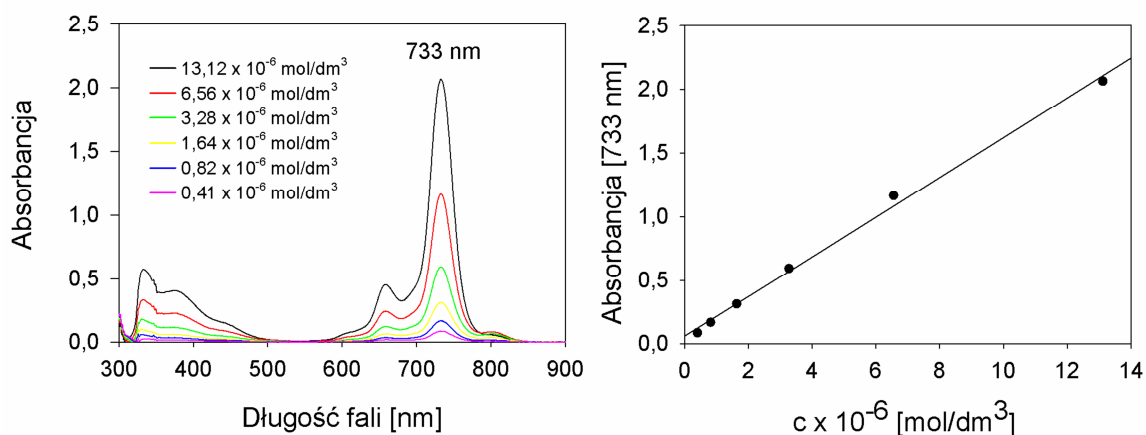
Ryc. 66 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w tetrahydrofuranie ($\lambda=732$ nm).



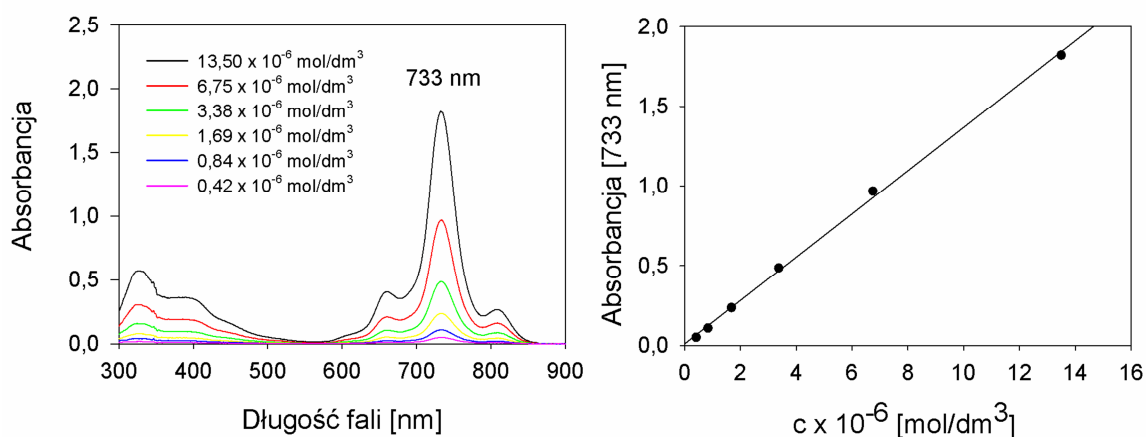
Ryc. 67 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w dichlorometanie ($\lambda_1=761$ nm, $\lambda_2=802$ nm).



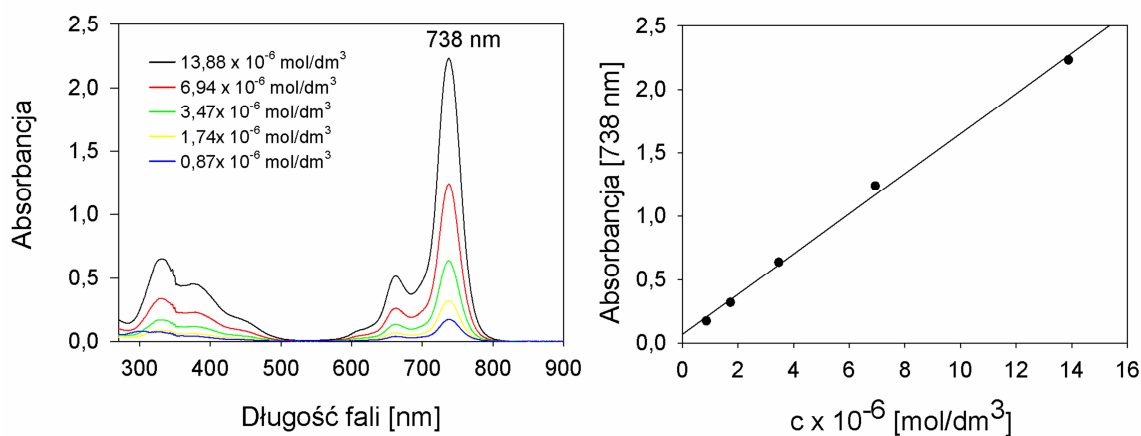
Ryc. 68 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w pirydynie ($\lambda=738$ nm).



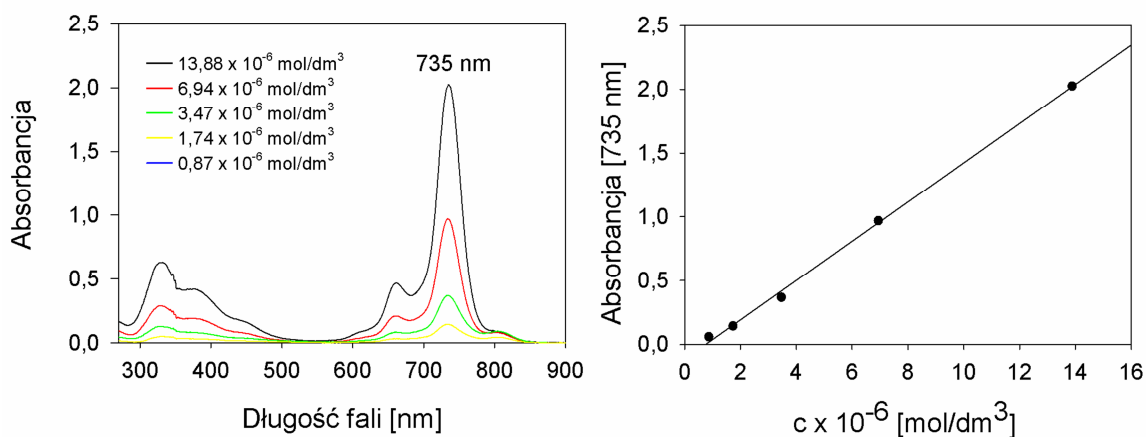
Ryc. 69 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w acetonie ($\lambda=733$ nm).



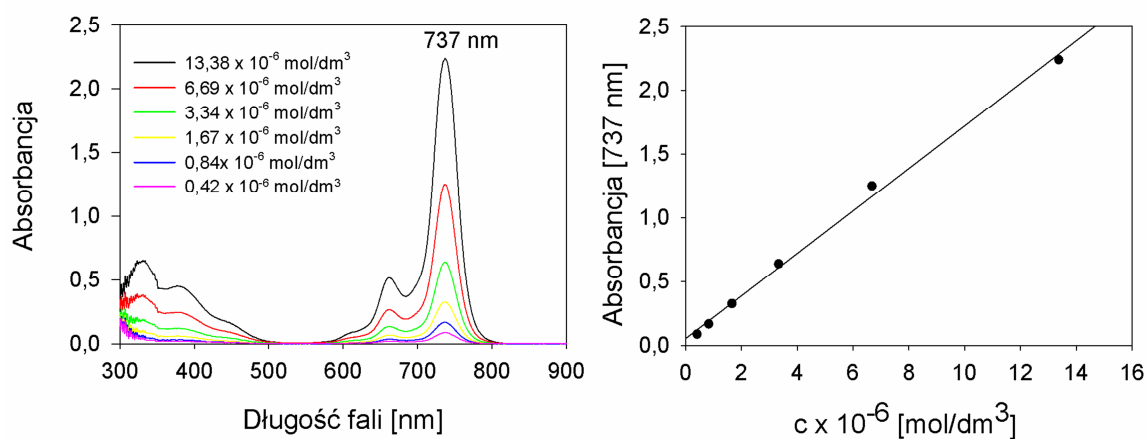
Ryc. 70 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w metanolu ($\lambda=733$ nm).



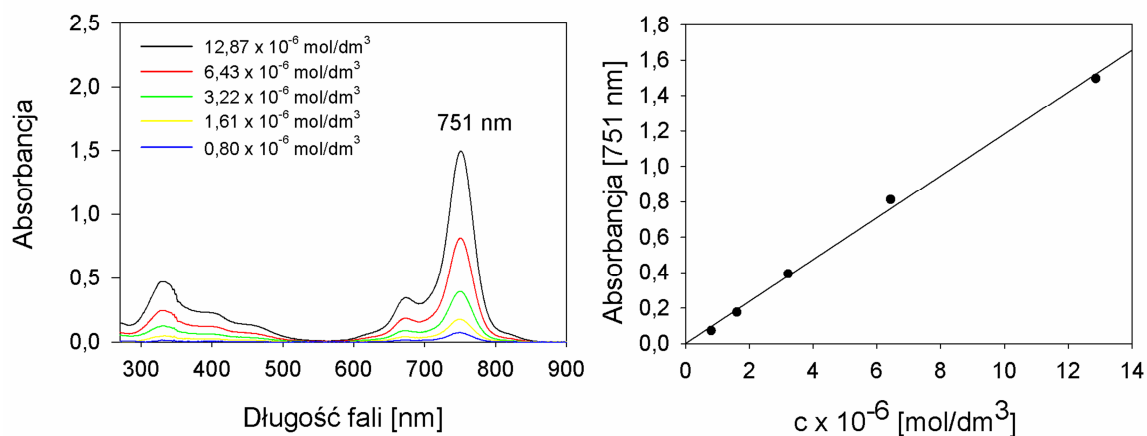
Ryc. 71 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w dimetyloformamidzie ($\lambda=738$ nm).



Ryc. 72 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w acetonitrylu ($\lambda=735$ nm).



Ryc. 73 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w dimetyloacetamidzie ($\lambda=737 \text{ nm}$).



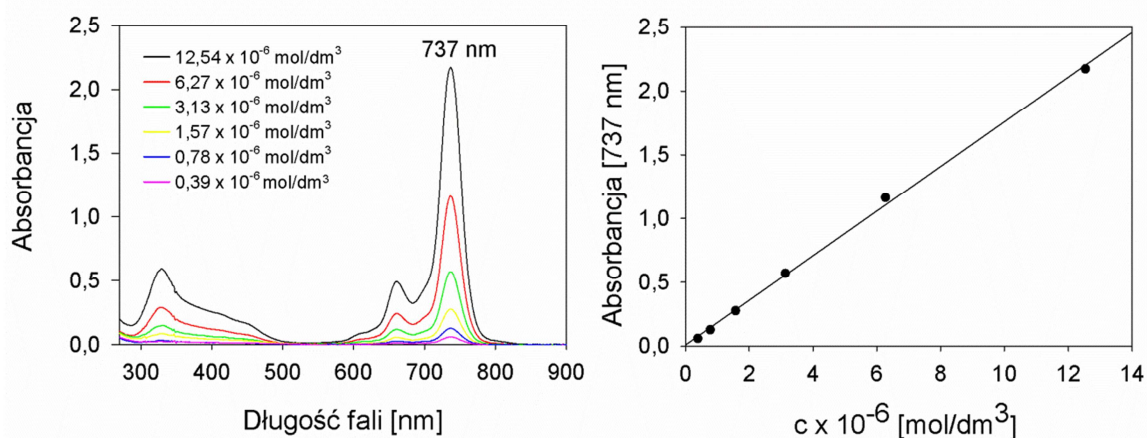
Ryc. 74 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc2** w wodzie ($\lambda=751 \text{ nm}$).

Tabela 31 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyaniny **Pc2** wraz z analizą statystyczną.

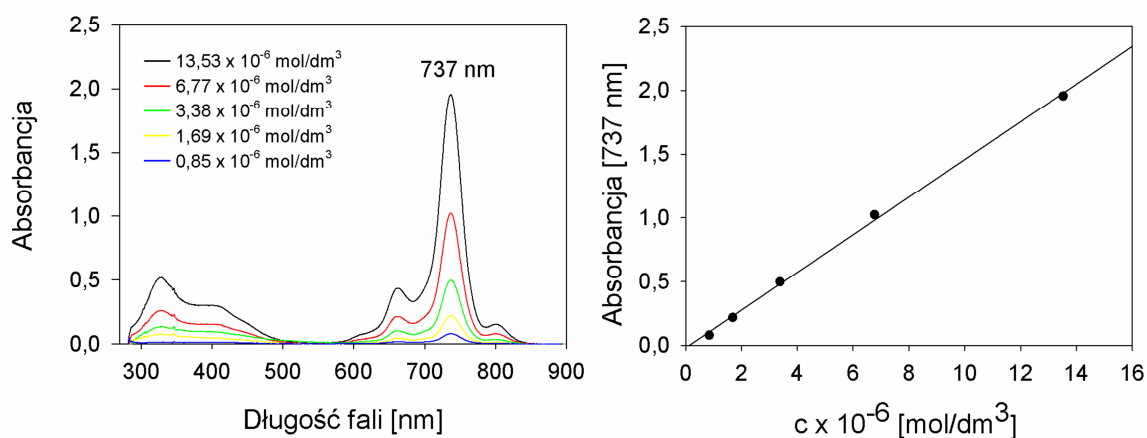
Rozpuszczalnik	$10^2 \cdot a$	$10^2 \cdot \Delta a$	$10^2 \cdot b$	$10^2 \cdot \Delta b$	$10^4 \cdot S_a$	$10^4 \cdot S_b$	t_a	t_b	$t_{\alpha,f}$	r	n
Rozpuszczalniki niepolarne											
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny										
Cykloheksan	nierozpuszczalny										
1,4-Dioksan	17,4000	0,3761	3,8900	2,2804	47,0000	285,0000	219,6391	1,7058	2,4469	0,999	6
Toluen	2,7300	0,0076	0,5650	0,0683	0,6750	6,0400	12734,6695	8,2665	3,1824	1,000	3
Trietyloamina	11,5000	0,3553	1,4000	2,2404	44,4000	280,0000	249,1081	0,6249	2,4469	0,997	6
Eter dietylowy	3,0900	0,2362	1,0900	1,8228	24,1000	186,0000	410,3302	0,5980	2,7764	0,994	4
Dimetylosulfotlenek	15,8000	0,3103	4,0400	2,1387	35,4000	244,0000	271,3599	1,8890	2,5706	0,999	5
Chloroform	16,7000	0,3874	-1,8600	2,7523	44,2000	314,0000	215,0105	0,6758	2,5706	0,999	5
Octan etylu	7,6600	0,8765	4,1200	6,0568	100,0000	691,0000	105,3481	0,6802	2,5706	0,975	5
Tetrahydrofuran	16,7000	0,5649	6,8900	3,6247	70,6000	453,0000	147,4578	1,9009	2,4469	0,996	6
Dichlorometan	10,4000	0,0779	-4,7700	0,5277	8,8900	60,2000	1149,8552	9,0398	2,5706	1,000	5
Pirydyna	16,2000	0,3241	5,7400	2,0404	40,5000	255,0000	258,5929	2,8132	2,4469	0,999	6
Rozpuszczalniki niepolarne											
Izopropanol	nierozpuszczalny										
Aceton	15,6000	0,3873	6,0200	2,3925	48,4000	299,0000	217,9338	2,5162	2,4469	0,998	6
Metanol	13,6000	0,1960	1,0600	1,2482	24,5000	156,0000	440,7326	0,8492	2,4469	0,999	6
Dimetyloformamid	15,8000	0,4339	6,9400	3,1117	49,5000	355,0000	194,0635	2,2303	2,5706	0,999	5
Acetonitryl	15,4000	0,3243	15,4000	2,3228	37,0000	265,0000	260,8588	6,6300	2,5706	0,999	5
Dimetyloactamid	16,7000	0,3849	5,3700	2,4245	48,1000	303,0000	216,4350	2,2149	2,4469	0,998	6
Woda	11,8000	0,3296	0,1400	2,1913	37,6000	250,0000	267,6194	0,0639	2,5706	0,998	5

4.3. Ocena agregacji ftalocyjaniny Pc3

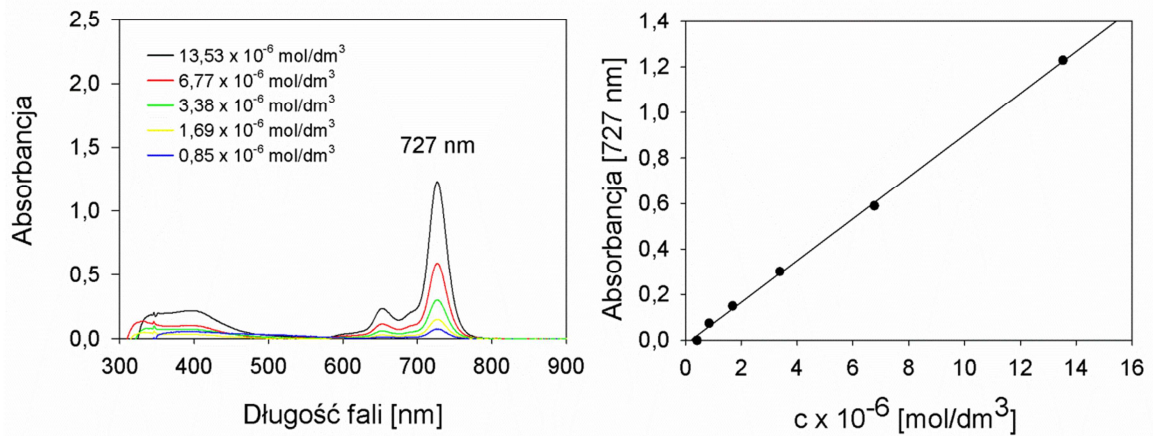
Elektronowe widma absorpcji wykreślono dla serii roztworów ftalocyjaniny **Pc3** w 17 rozpuszczalnikach w zakresie stężeń $0,39-13,53 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Następnie analizowano zależność absorbancji, przy długości fali maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc3**, od stężenia. Elektronowe widma absorpcji oraz wykresy zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** przedstawiono na Ryc. 75-91, a parametry krzywych wzorcowych oraz ocenę statystyczną umieszczono w Tabeli 32.



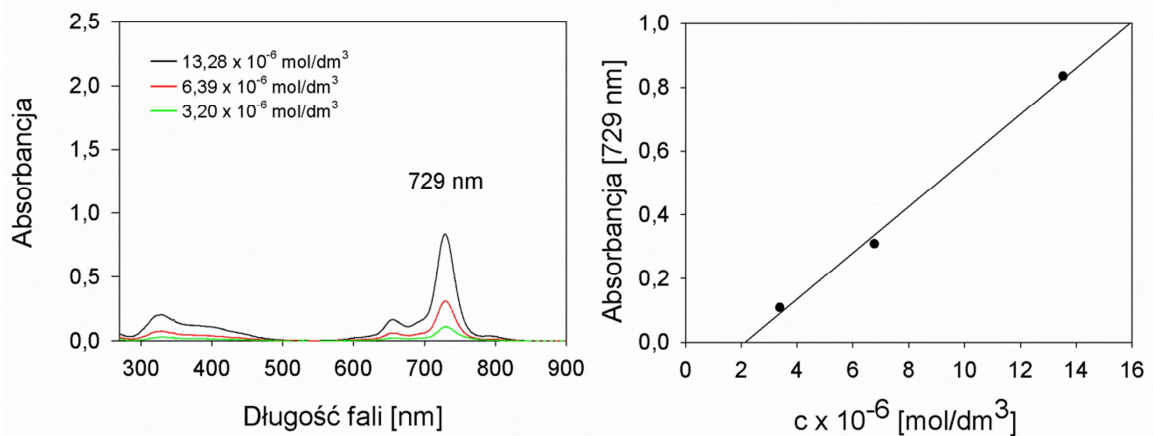
Ryc. 75 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w 1,4-dioksanie ($\lambda=737 \text{ nm}$).



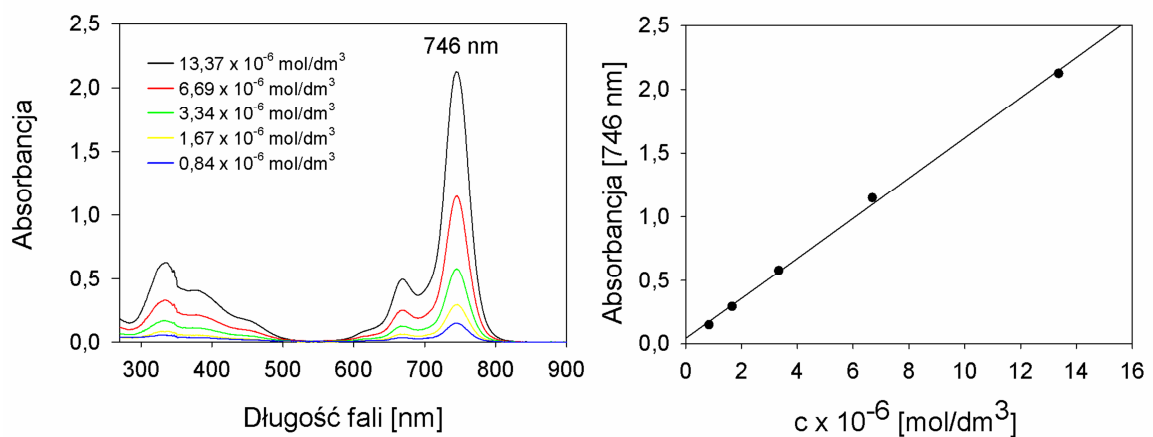
Ryc. 76 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w toluenie ($\lambda=737 \text{ nm}$).



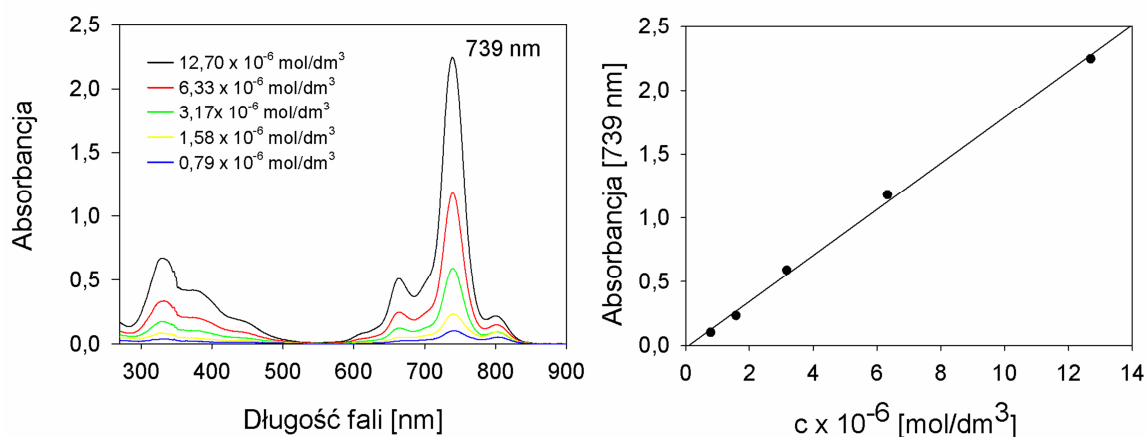
Ryc. 77 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w trietyloaminie ($\lambda=727$ nm).



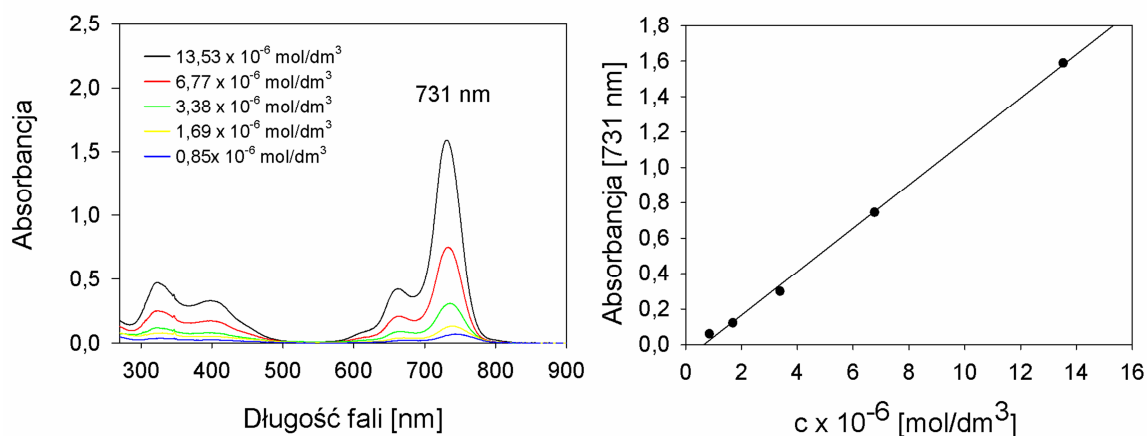
Ryc. 78 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w eterze dietylowym ($\lambda=729$ nm).



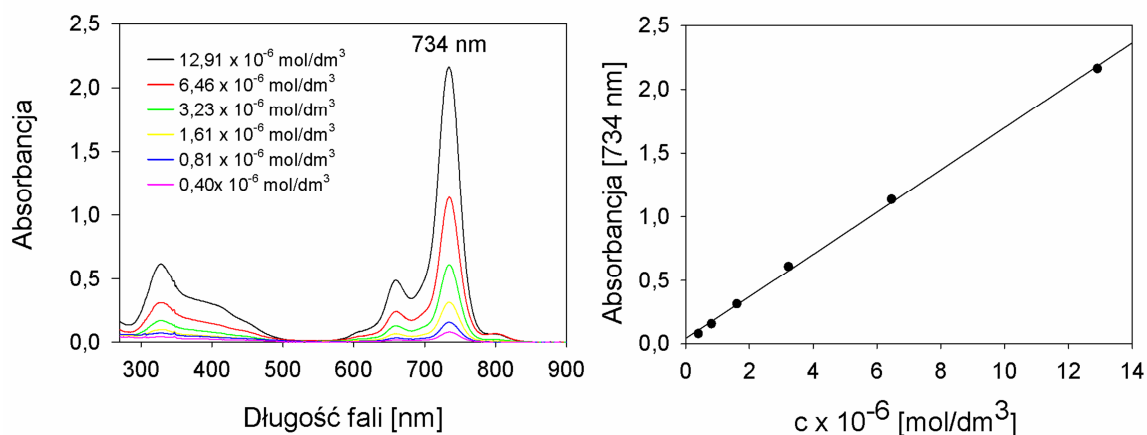
Ryc. 79 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w dimetylosulfotlenku ($\lambda=746$ nm).



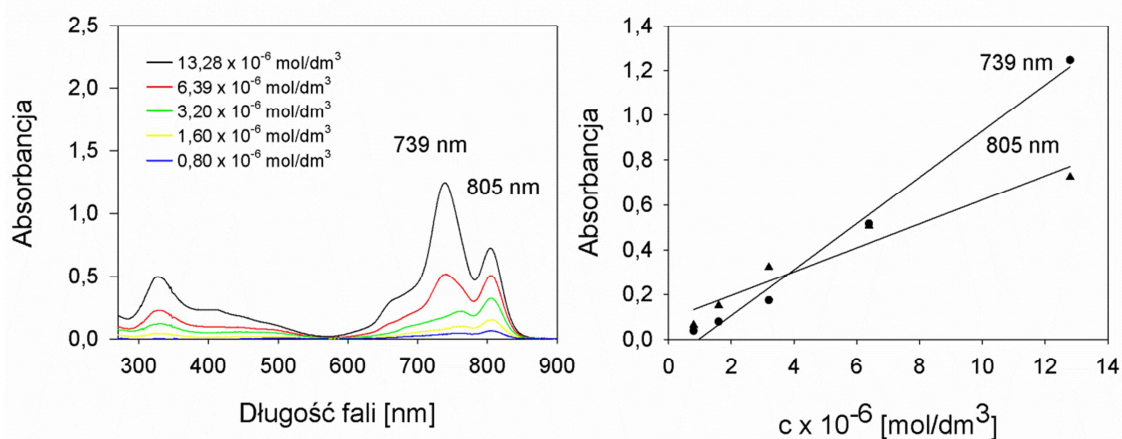
Ryc. 80 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w chloroformie ($\lambda=739 \text{ nm}$).



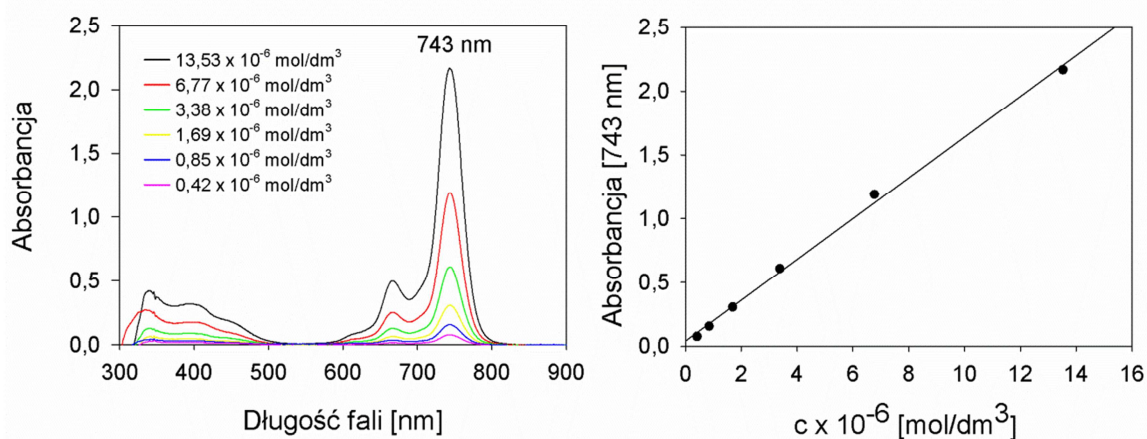
Ryc. 81 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w octanie etylu ($\lambda=731 \text{ nm}$).



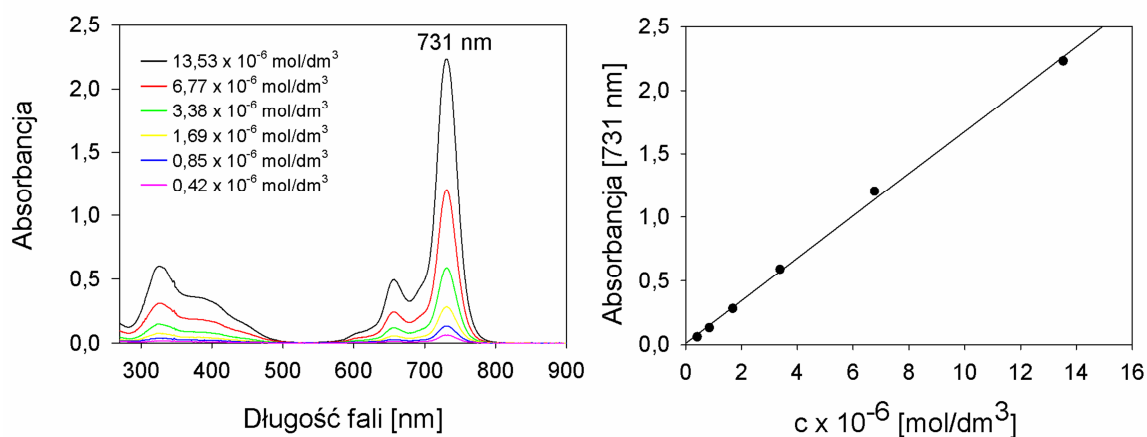
Ryc. 82 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w tetrahydrofuranie ($\lambda=734 \text{ nm}$).



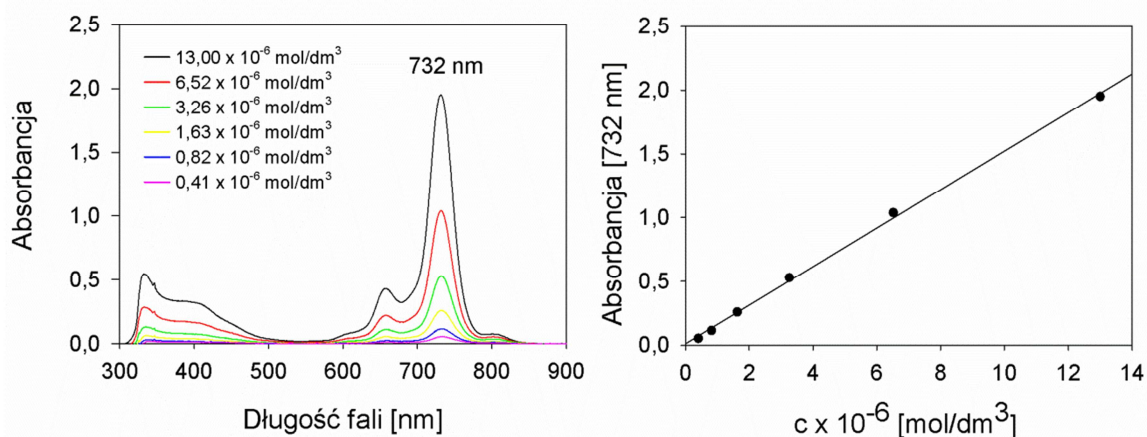
Ryc. 83 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w dichlorometanie ($\lambda_1=739 \text{ nm}$, $\lambda_2=805 \text{ nm}$).



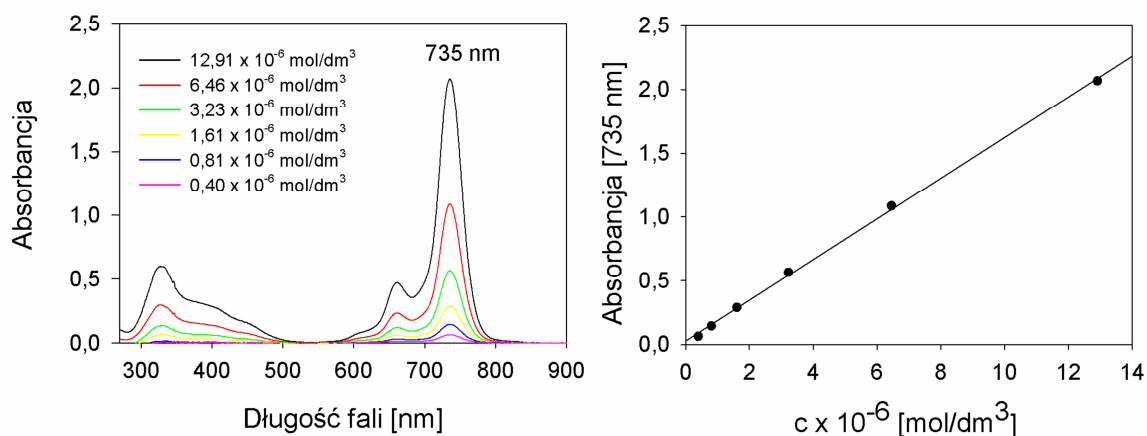
Ryc. 84 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w pirydynie ($\lambda=743 \text{ nm}$).



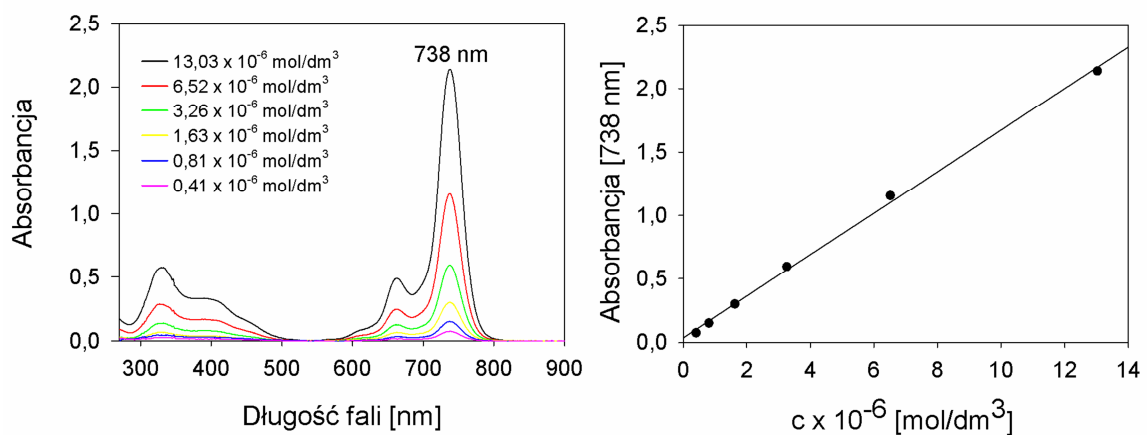
Ryc. 85 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w izopropanolu ($\lambda=731 \text{ nm}$).



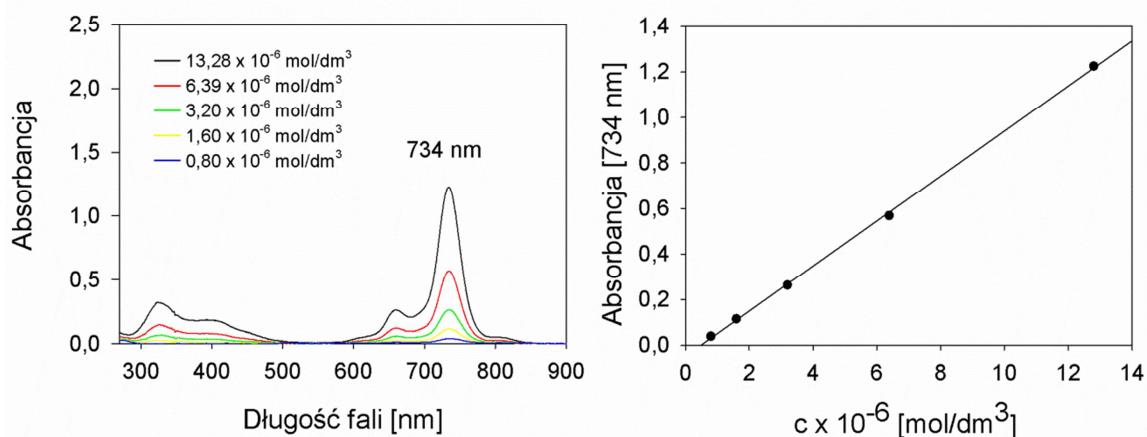
Ryc. 86 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w acetonie ($\lambda=732$ nm).



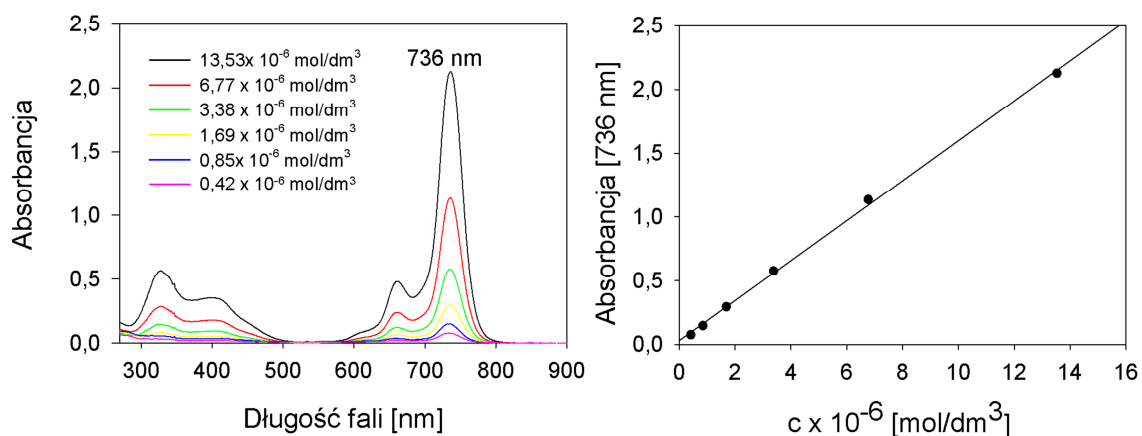
Ryc. 87 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w metanolu ($\lambda=735$ nm).



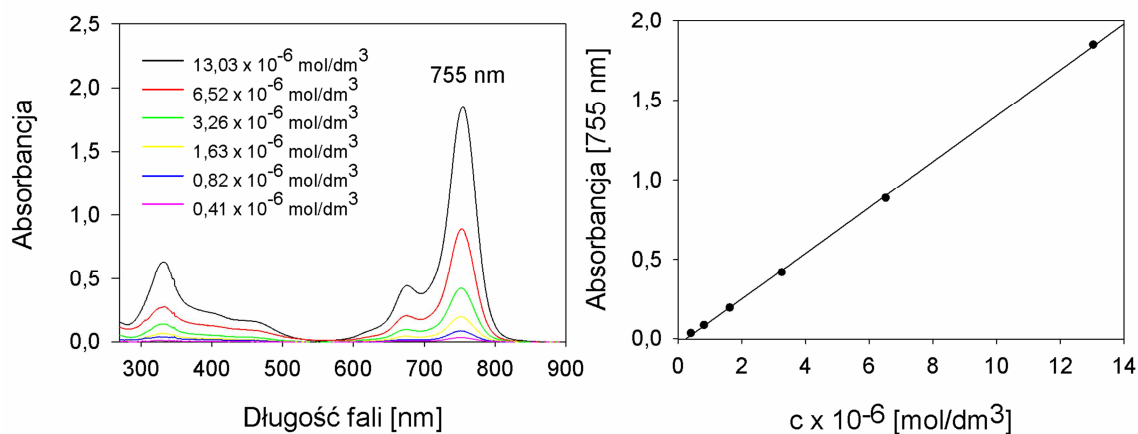
Ryc. 88 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w dimetyloformamidzie ($\lambda=738$ nm).



Ryc. 89 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w acetonitrylu ($\lambda=734$ nm).



Ryc. 90 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w dimetyloacetamidzie ($\lambda=736$ nm).



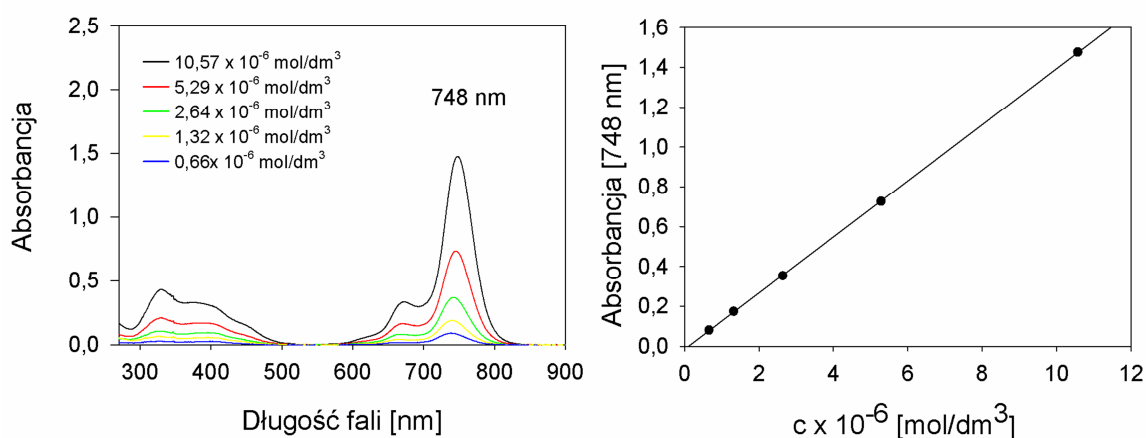
Ryc. 91 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc3** w wodzie ($\lambda=755$ nm).

Tabela 32 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyaniny **Pc3** wraz z analizą statystyczną.

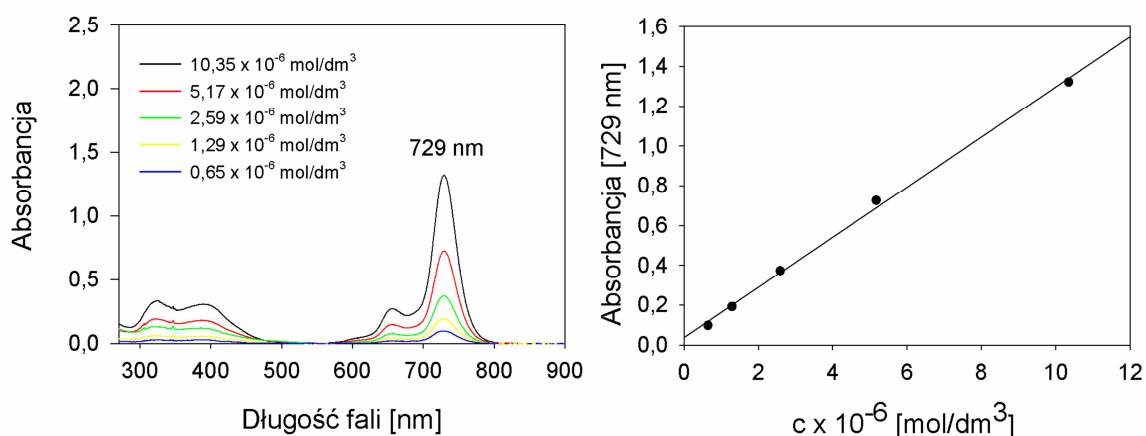
Rozpuszczalnik	$10^2 \cdot a$	$10^2 \cdot \Delta a$	$10^2 \cdot b$	$10^2 \cdot \Delta b$	$10^4 \cdot S_a$	$10^4 \cdot S_b$	t_a	t_b	$t_{\alpha,f}$	r	n
Rozpuszczalniki niepolarne											
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny										
Cykloheksan	nierozpuszczalny										
1,4-Dioksan	17,5000	0,2745	0,9230	1,6243	34,3000	203,0000	300,5989	0,5682	2,4469	0,999	6
Toluen	14,8000	0,2884	-1,8600	2,0160	32,9000	230,0000	295,4477	0,9226	2,5706	0,999	5
Trietyloamina	9,1800	0,1168	-1,7200	0,7425	14,6000	92,8000	777,4208	2,3164	2,4469	0,999	6
Eter dietylowy	7,2500	0,5251	-15,4000	4,7074	46,4000	416,0000	176,6479	3,2714	3,1824	0,998	3
Dimetylosulfotlenek	15,8000	0,3199	4,2400	2,2088	36,5000	252,0000	263,1820	1,9196	2,5706	0,999	5
Chloroform	18,1000	0,4295	-1,7000	2,8136	49,0000	321,0000	190,6886	0,6042	2,5706	0,999	5
Octan etylu	12,3000	0,2551	-7,9700	1,7793	29,1000	203,0000	343,8298	4,4792	2,5706	0,999	5
Tetrahydrofuran	16,6000	0,2152	4,0700	1,3042	26,9000	163,0000	387,4729	3,1206	2,4469	0,999	6
Dichlorometan	10,3000	0,4856	-9,9100	3,2081	55,4000	366,0000	184,7224	3,0891	2,5706	0,996	5
Pirydyna	16,0000	0,3177	4,1100	2,0244	39,7000	253,0000	264,4334	2,0302	2,4469	0,999	6
Rozpuszczalniki polarne											
Izopropanol	16,7000	0,2777	1,0200	1,7763	34,7000	222,0000	300,0151	0,5742	2,4469	0,999	6
Aceton	15,1000	0,2280	1,2500	1,4003	28,5000	175,0000	372,2977	0,8927	2,4469	0,999	6
Metanol	15,9000	0,1872	2,8000	1,1362	23,4000	142,0000	449,1668	2,4643	2,4469	1,000	6
Dimetyloformamid	16,4000	0,2753	3,6200	1,6883	34,4000	211,0000	303,7214	2,1441	2,4469	0,999	6
Acetonitryl	9,8800	0,1069	-4,7500	0,7074	12,2000	80,7000	842,7490	6,7152	2,5706	1,000	5
Dimetyloactamid	15,7000	0,2080	3,0900	1,3283	26,0000	166,0000	405,2115	2,3264	2,4469	0,999	6
Woda	11,8000	0,3278	0,1460	2,1738	37,4000	248,0000	269,0506	0,0672	2,5706	0,999	5

4.4. Ocena agregacji ftalocyjaniny Pc4

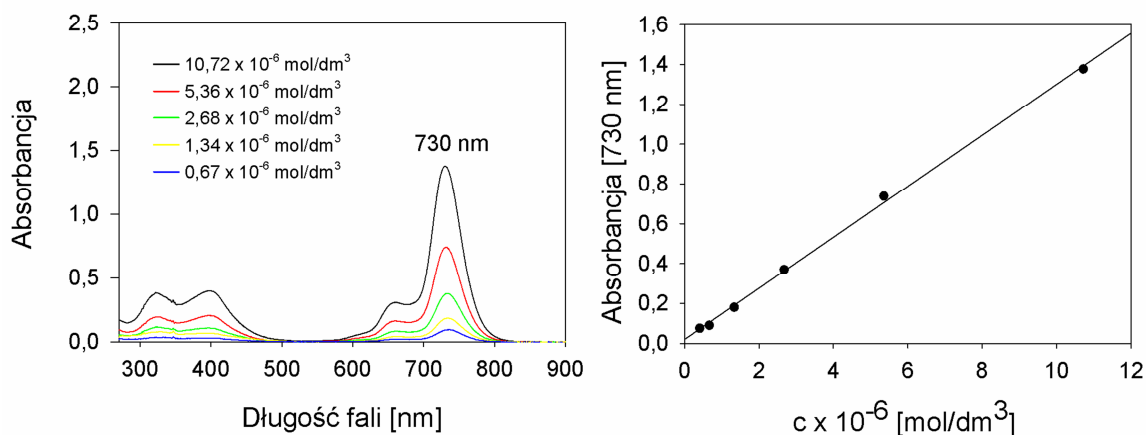
Elektronowe widma absorpcji wykreślono dla serii roztworów ftalocyjaniny **Pc4** w 6 rozpuszczalnikach w zakresie stężeń $0,65-10,79 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Następnie analizowano zależność absorbancji, przy długości fali maksimum pasma Q ftalocyjaniny **Pc4**, od stężenia. Elektronowe widma absorpcji oraz wykresy zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** przedstawiono na Ryc. 92-97, a parametry krzywych wzorcowych oraz ocenę statystyczną umieszczono w Tabeli 33.



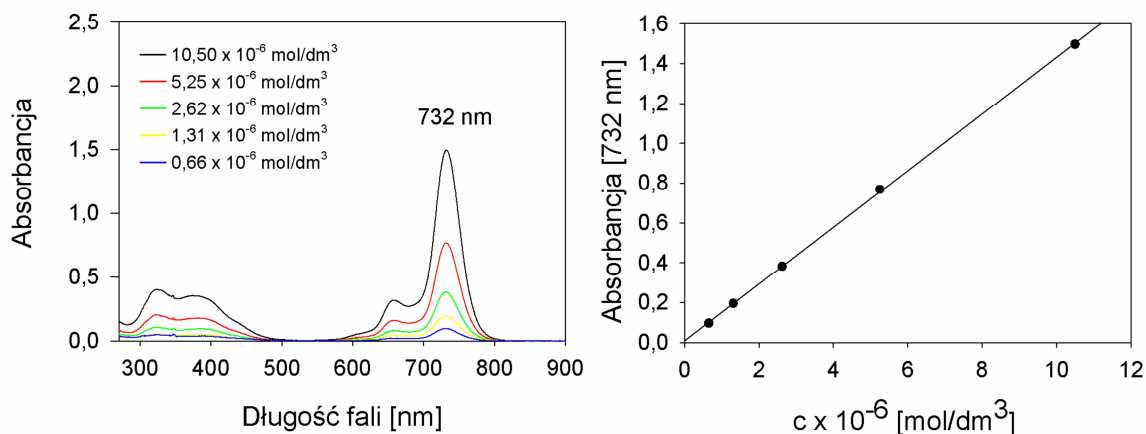
Ryc. 92 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w dimetylosulfotlenku ($\lambda=748 \text{ nm}$).



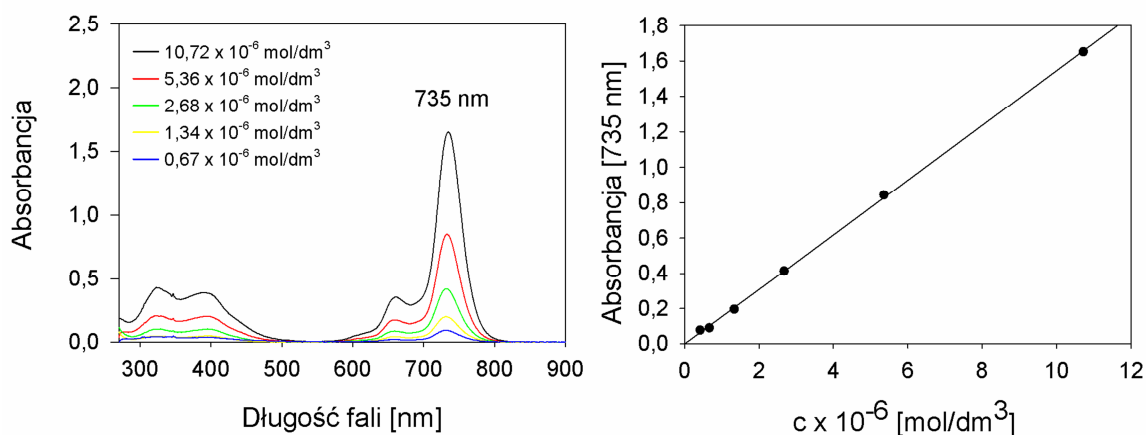
Ryc. 93 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w metanolu ($\lambda=729 \text{ nm}$).



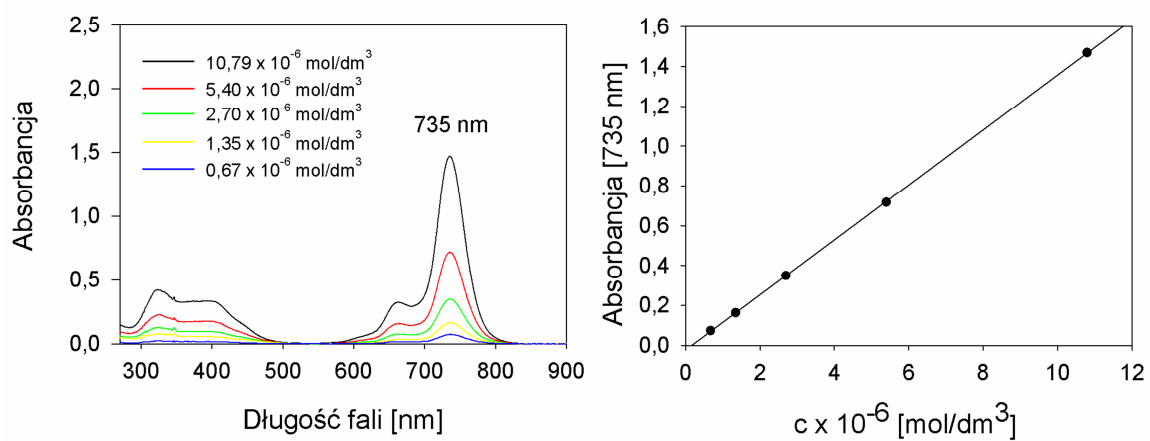
Ryc. 94 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w dimetyloformamidzie ($\lambda=730$ nm).



Ryc. 95 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w acetonitrylu ($\lambda=732$ nm).



Ryc. 96 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w dimetyloacetamidzie ($\lambda=735$ nm).



Ryc. 97 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny **Pc4** w wodzie ($\lambda=735 \text{ nm}$).

Tabela 33 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyaniny **Pc4** wraz z analizą statystyczną.

Rozpuszczalnik	$10^2 \cdot a$	$10^2 \cdot \Delta a$	$10^2 \cdot b$	$10^2 \cdot \Delta b$	$10^4 \cdot S_a$	$10^4 \cdot S_b$	t_a	t_b	$t_{a,r}$	r	n
Rozpuszczalniki niepolarne											
<i>n</i> -Heksan	nierozpuszczalny										
Cykloheksan	nierozpuszczalny										
1,4-Dioksan	nierozpuszczalny										
Toluen	nierozpuszczalny										
Trietyloamina	nierozpuszczalny										
Eter dietylowy	nierozpuszczalny										
Dimetylosulfotlenek	14,1000	0,0443	-1,3900	0,2410	5,0500	27,5000	1940,6119	5,7666	2,5706	1,000	5
Chloroform	nierozpuszczalny										
Octan etylu	nierozpuszczalny										
Tetrahydrofuran	nierozpuszczalny										
Dichlorometan	nierozpuszczalny										
Pirydyna	nierozpuszczalny										
Rozpuszczalniki polarne											
Izopropanol	nierozpuszczalny										
Aceton	nierozpuszczalny										
Metanol	12,6000	0,3068	3,7700	1,6391	35,0000	187,0000	284,8920	2,3000	2,5706	0,999	5
Dimetyloformamid	12,8000	0,1848	2,0400	0,9362	23,1000	117,0000	471,7719	2,1791	2,4469	0,999	6
Acetonitryl	14,2000	0,0920	0,9600	0,4979	10,5000	56,8000	932,2554	1,9282	2,5706	1,000	5
Dimetyloactamid	15,5000	0,1192	-0,0909	0,6041	14,9000	75,5000	708,7580	0,1505	2,4469	1,000	6
Woda	13,8000	0,0380	-2,1800	0,2121	4,3400	24,2000	2265,9715	10,2773	2,5706	1,000	5

5. Właściwości emisyjne ftalocyjanin Pc1-4

5.1. Widma fluorescencji ftalocyjanin Pc1-4

Właściwości emisyjne badanych ftalocyjanin **Pc1-4**, oceniono wykreślając widma fluorescencji w DMSO i DMF. Podczas przygotowania roztworów ftalocyjanin uwzględniono, aby wartość absorbancji przy długości fali odpowiadającej maksimum pasma Q, mieściła się w zakresie 0,1 – 0,2. Pomiarów wykonano w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej $l=1$ cm. Widma fluorescencji rejestrowane w wyniku wzbudzenia promieniowaniem z zakresu pasma Q i Soret'a oraz widma absorpcji badanych związków przedstawiono odpowiednio na Ryc. 98-105. Natomiast długość fali wzbudzenia, długość fali odpowiadającej maksimum widm fluorescencji oraz wartości przesunięcia Stokes'a umieszczono w Tabeli 34 i 35, odpowiednio dla roztworów ftalocyjanin w DMSO i DMF.

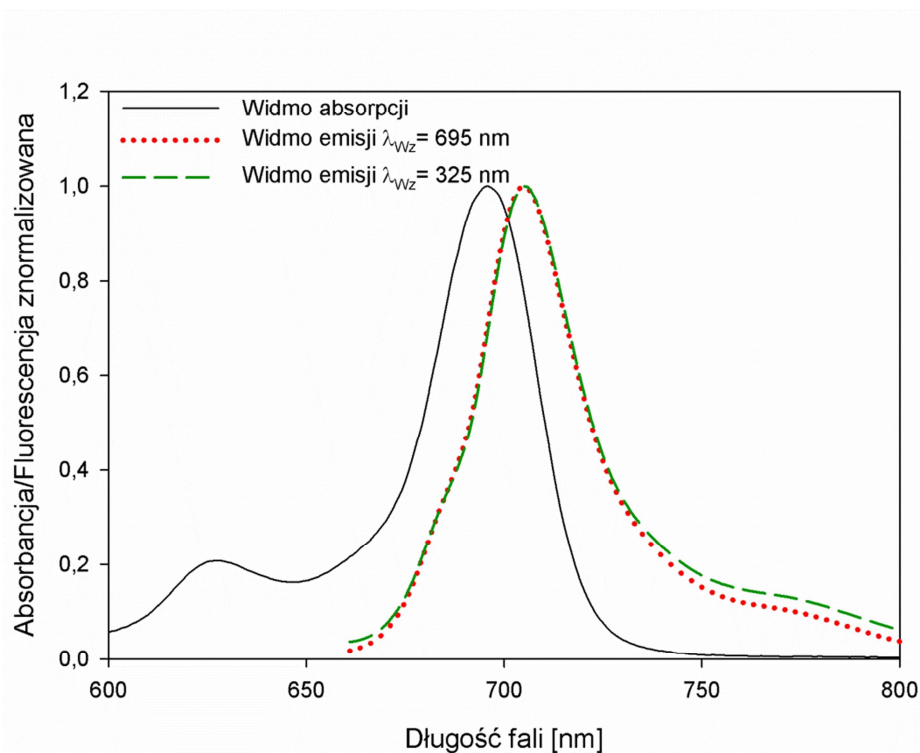
Tabela 34 Maksima absorpcji i emisji widm ftalocyjanin **Pc1-4** wykreślonych w roztworze DMSO, przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{wz} = 325$ nm oraz wartości przesunięcia Stokes'a.

Związek	λ_{Qmax} [nm]	ν_{Qmax} [cm ⁻¹]	$\lambda_{Em\ max}$ [nm]	$\nu_{Em\ max}$ [cm ⁻¹]	Przesunięcie Stokes'a $\Delta\nu$ [cm ⁻¹]
Pc1	696	14388	705	14184	204
Pc2	745	13441	754	13263	178
Pc3	746	13405	755	13245	160
Pc4	738	13550	746	13405	145
ZnPc	672	14881	679	14728	153

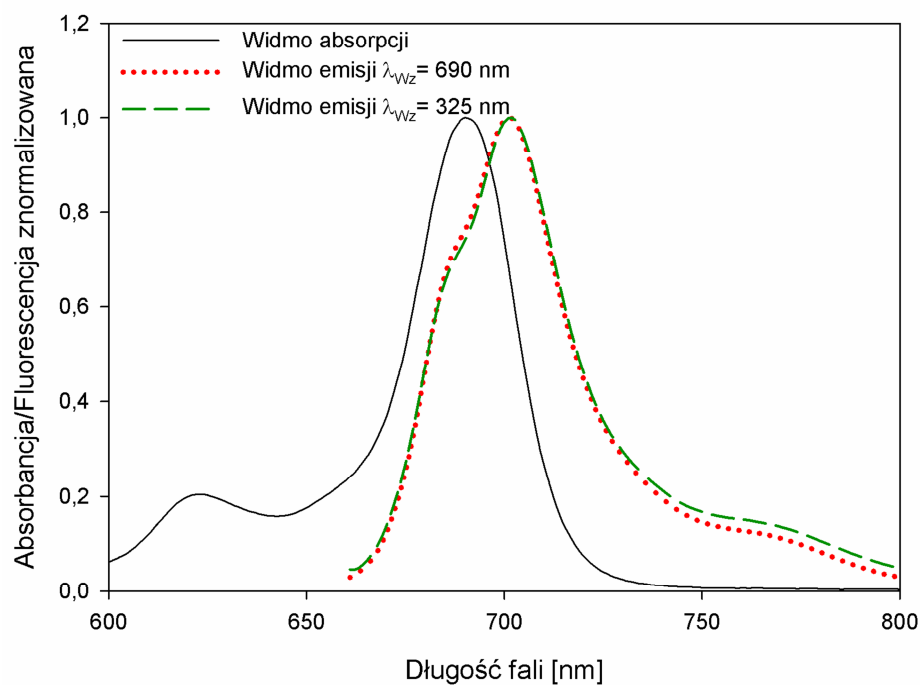
Tabela 35 Maksima absorpcji i emisji widm ftalocyjanin **Pc1-4** wykreślonych w roztworze DMF, przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{wz} = 325$ nm oraz wartości przesunięcia Stokes'a.

Związek	λ_{Qmax} [nm]	ν_{Qmax} [cm ⁻¹]	$\lambda_{Em\ max}$ [nm]	$\nu_{Em\ max}$ [cm ⁻¹]	Przesunięcie Stokes'a $\Delta\nu$ [cm ⁻¹]
Pc1	691	14493	701	14265	227
Pc2	738	13550	748	13369	181
Pc3	738	13550	749	13351	199
Pc4	730	13699	741	13495	203
ZnPc	669	14948	675	14815	133

5.1.1. Widma emisji ftalocyjaniny Pc1

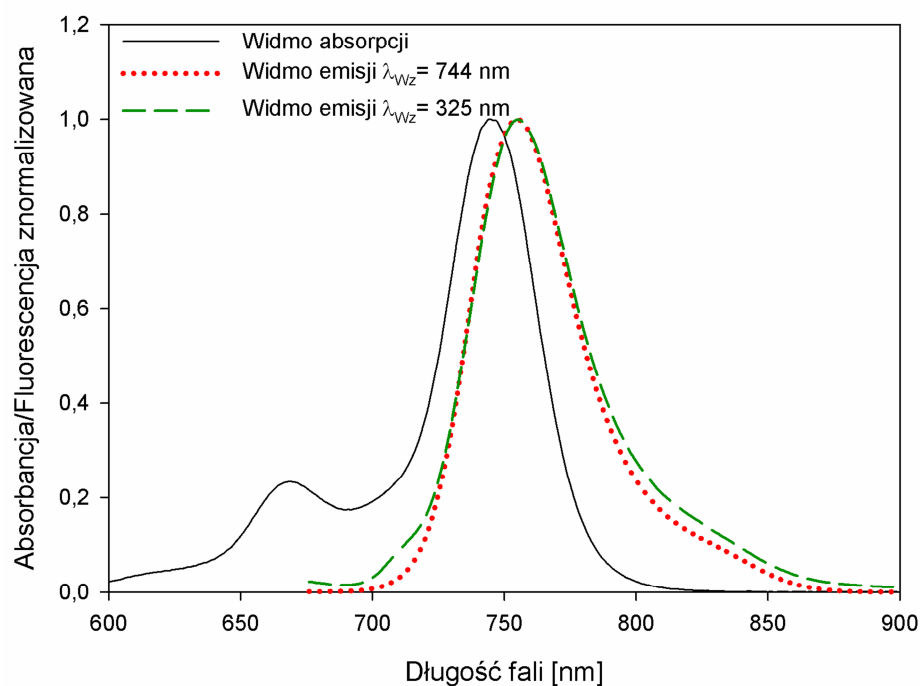


Ryc. 98 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMSO, uzyskane po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=695$ nm.

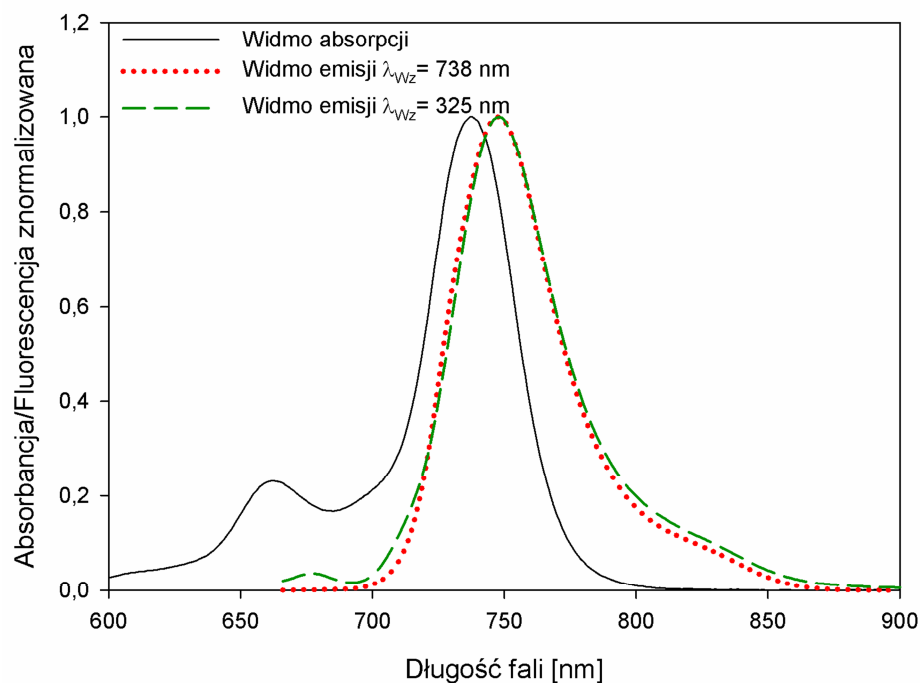


Ryc. 99 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc1** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=690$ nm w roztworze DMF.

5.1.2. Widma emisji ftalocyaniny Pc2

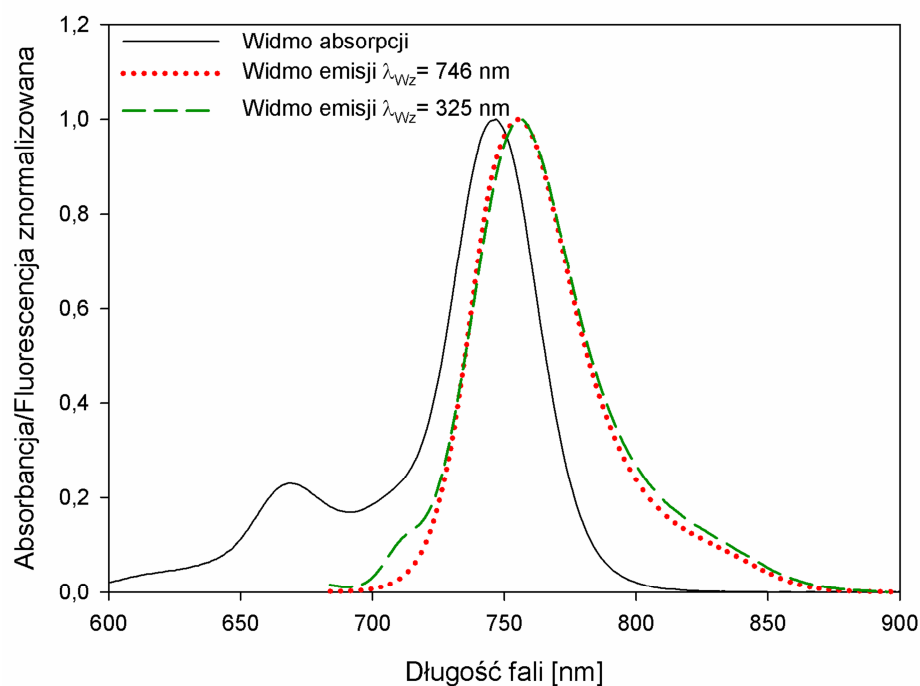


Ryc. 100 Widmo absorpcji i emisji ftalocyaniny **Pc2** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=744$ nm w roztworze DMSO.

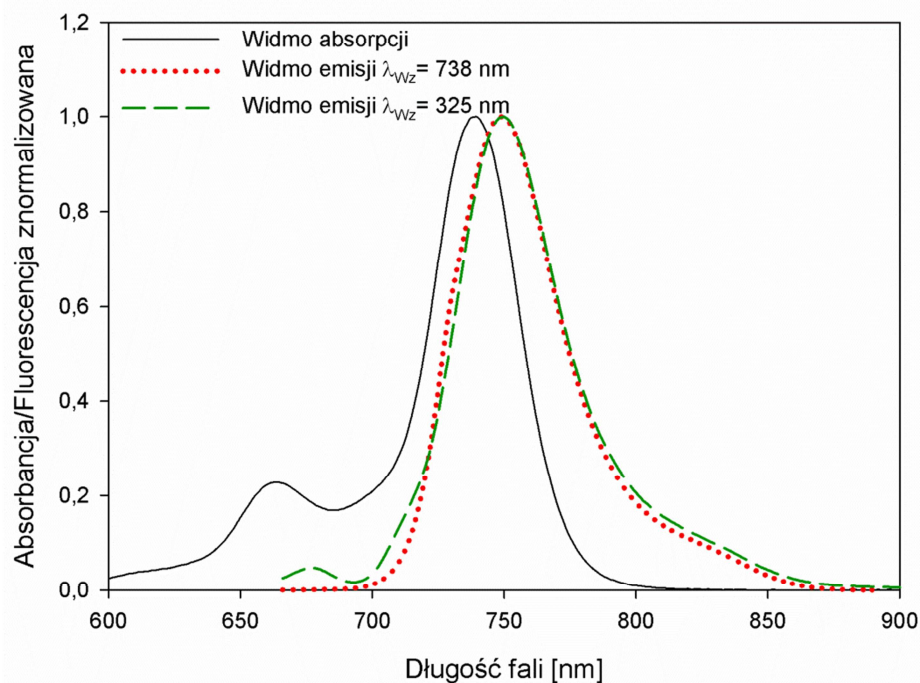


Ryc. 101 Widmo absorpcji i emisji ftalocyaniny **Pc2** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=738$ nm w roztworze DMSO.

5.1.3. Widma emisji ftalocyjaniny Pc3

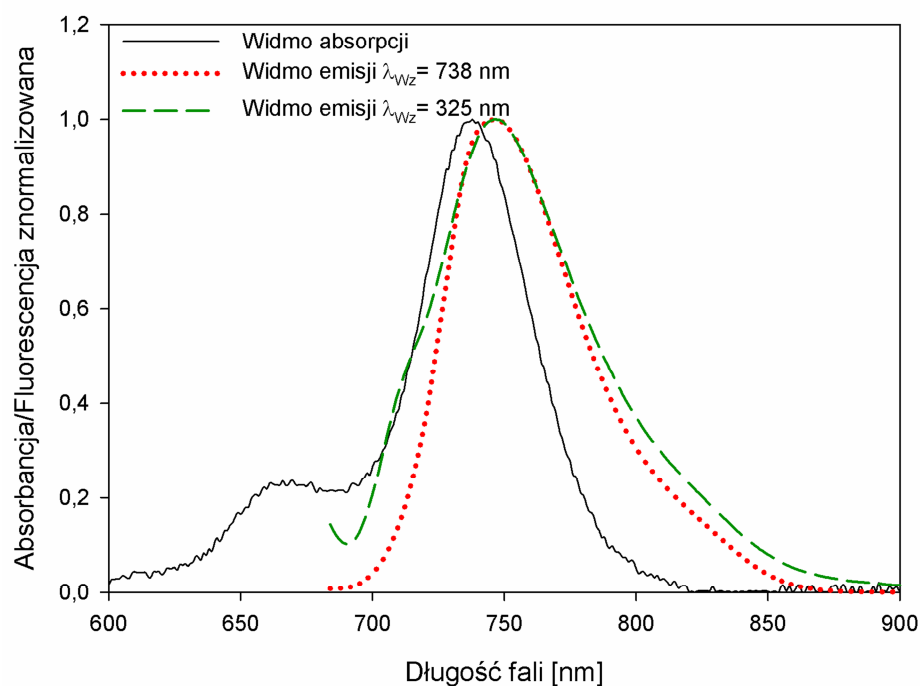


Ryc. 102 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc3** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=746$ nm w roztworze DMSO.

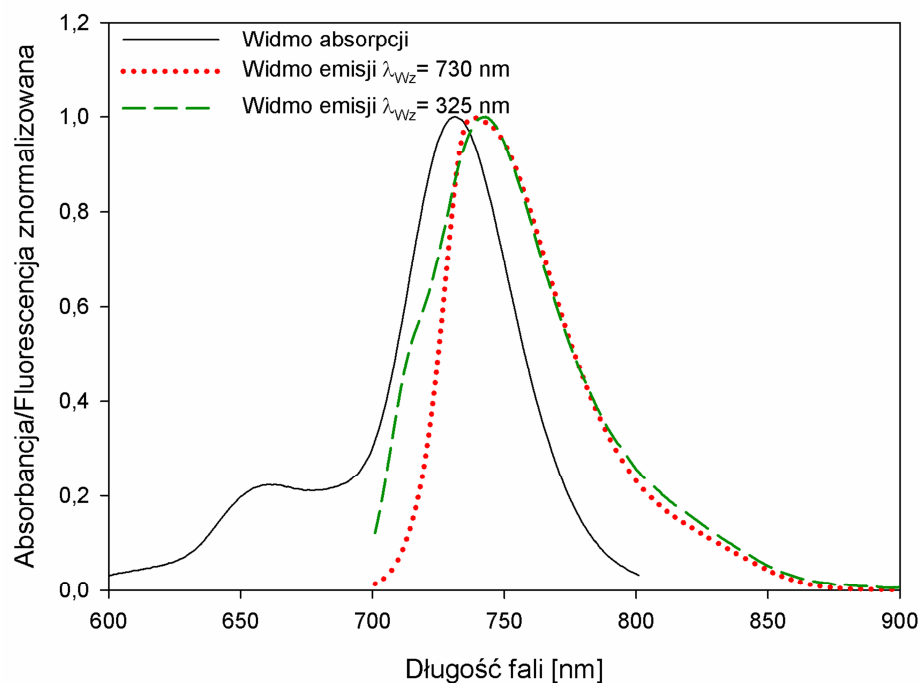


Ryc. 103 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc3** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=738$ nm w roztworze DMF.

5.1.4. Widma emisji ftalocyjaniny Pc4



Ryc. 104 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc4** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=738$ nm w roztworze DMSO.



Ryc. 105 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc4** uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}=325$ oraz $\lambda_{wz}=730$ nm w roztworze DMF.

5.2. Wyznaczenie wydajności kwantowej fluorescencji ftalocyjanin **Pc1-4**

Wydajność kwantową fluorescencji (Φ_f) badanych związków wyznaczono metodą porównawczą, korzystając z równania (2):

$$\Phi_{fp} = \frac{\int F_p(\lambda)}{\int F_{qc}(\lambda)} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{qc}}}{1 - 10^{-A_p}} \cdot \Phi_{fqc} \quad (2)$$

gdzie:

Φ_{fp} - kwantowa wydajność fluorescencji substancji badanej

Φ_{fqc} - kwantowa wydajność fluorescencji związku porównawczego

F_p - natężenie fluorescencji dla substancji badanej

F_{qc} - natężenie fluorescencji dla wzorca

A_p - wartość absorbancji substancji badanej przy długości fali wzbudzenia

A_{qc} - wartość absorbancji wzorca przy długości fali wzbudzenia [201].

Jako substancję porównawczą wykorzystano ftalocyjaninę cynkową, której kwantowa wydajność fluorescencji (Φ_{fqc}) wynosi 0,20 i 0,17, odpowiednio w roztworze DMSO i DMF [202]. Wydajności kwantowe fluorescencji ftalocyjanin **Pc1-4**, wyznaczono, wzbudzając ftalocyjaniny w paśmie Soreta przy długości fali $\lambda_{wz}=325$ nm. Wartości Φ_F ftalocyjanin **Pc1-4** przedstawiono w Tabeli 36.

Tabela 36 Wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_F) wyznaczona metodą porównawczą dla ftalocyjanin **Pc1-4** w roztworze DMSO i DMF, przy wzbudzeniu w paśmie Soreta, przy długości fali $\lambda_{wz}=325$ nm.

Związek	$\Phi_{F \text{ DMSO}}$	$\Phi_{F \text{ DMF}}$
Pc1	0,57	0,05
Pc2	0,07	0,03
Pc3	0,03	0,01
Pc4	0,09	0,004
ZnPc*	0,2	0,17

*standard

6. Ocena zdolności generowania tlenu singletowego

6.1. Metodyka i warunki badania zdolności generowania tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) przez ftalocyjaniny Pc1-4

Zdolność generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaniny **Pc1-4** oceniano metodą pośrednią z wykorzystaniem wygaszacza tlenu singletowego, tj. 1,3-difenyilizobenzofuranu (DPBF). Eksperymenty przeprowadzono w roztworach DMSO i DMF, w temperaturze pokojowej [202,203].

W celu oceny zdolności generowania tlenu singletowego przygotowano, przy ograniczonym dostępie światła, roztwory robocze DPBF o absorbancji $\sim 1,3$ oraz roztwory robocze ftalocyjanin o absorbancji $\sim 1,0$. Roztwory robocze DPBF oraz ftalocyjanin zmieszano w stosunku objętościowym (v/v) 1:1. Otrzymany roztwór naświetlano monochromatyczną wiązką promieniowania o długości fali, odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q badanego związku. Natężenie promieniowania wynosiło $\sim 0,7 \text{ mW/cm}^2$ i było monitorowane przy użyciu radiometru firmy Optel RD 0,2/2 z sondą TD. Jako źródło światła wykorzystano zestaw złożony z łukowej lampy ksenonowej o mocy 150 W (Optel) oraz monochromatora (Optel). Naświetlany roztwór umieszczono w kuwecie o długości drogi optycznej $l = 1 \text{ cm}$. Podczas naświetlania mieszaninę DPBF i badanego związku mieszano na mieszadle magnetycznym, a w określonych odstępach czasu wykreślano elektronowe widma absorpcji. Maksymalny czas naświetlania wynosił 10 min. Badanie wykonano dla każdej z badanych ftalocyjanin w trzech powtórzeniach.

Proces generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaniny **Pc1-4** obserwowano poprzez monitorowanie zmian absorpcji maksimum pasma DPBF przy długości fali $\lambda_{\text{max}}=417 \text{ nm}$, zachodzących w czasie naświetlania próbki, co przedstawiono na Ryc. 106, 107, 110, 111, 114, 115, 118, 119.

Szybkość rozkładu fotochemicznego DPBF pod wpływem tlenu sigletowego wytwarzanego przez ftalocyjaniny **Pc1-4** można opisać równaniem (3):

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k \times [A] \quad (3)$$

gdzie:

$d[A]$ – zmiany absorbancji DPBF przy $\lambda_{\text{max}}=417 \text{ nm}$ w czasie naświetlania t ,

k – stała szybkości rozkładu DPBF,

t – czas naświetlania [s].

Po przekształceniu, powyższe równanie przyjmuje postać (4) [204]:

$$\ln \frac{[A_0]}{[A]} = k \times t \quad (4)$$

Na Ryc. 108, 109, 112, 113, 116, 117, 120, 121 przedstawiono wykresy zależności $\ln(A_0/A) = f(t)$ obrazujące graficznie kinetykę rozkładu DPBF przy udziale ftalocyjanin **Pc1-4**. Parametry prostych wykreślonych na wykresach zależności $\ln(A_0/A) = f(t)$ wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów.

Stałe szybkości procesu rozkładu DPBF obliczono korzystając z zależności (5):

$$k = \operatorname{tg} \alpha = a \quad (5)$$

gdzie,

k – stała szybkości reakcji [s^{-1}],

$\operatorname{tg} \alpha$ – kąt nachylenia prostej $\ln(A_0/A) = f(t)$,

a – współczynnik kierunkowy prostej $\ln(A_0/A) = f(t)$.

Okres półtrwania DPBF w procesie rozkładu obliczono wg wzoru 6-7:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

$$t_{0,5} = \frac{0,693}{k} \quad (7)$$

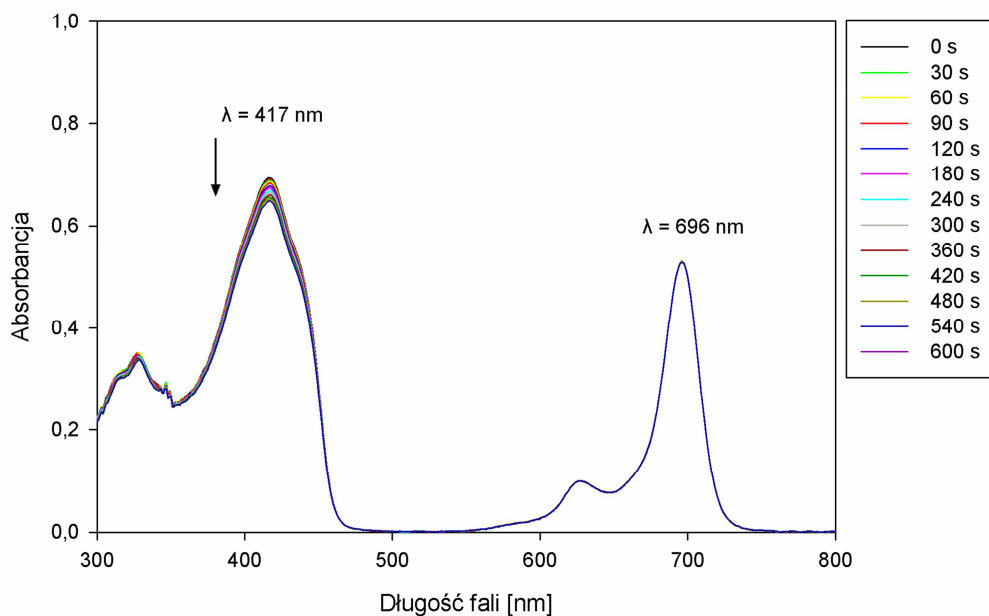
gdzie:

$t_{0,5}$ – okres półtrwania DPBF.

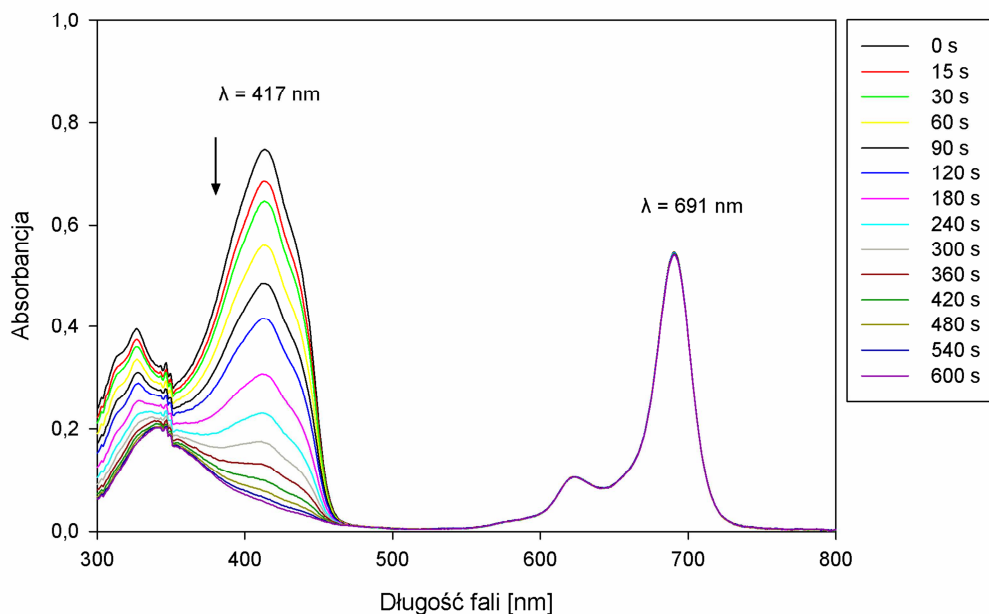
Wyznaczone parametry krzywych kinetycznych procesu rozkładu DPBF przedstawiono w Tabelach 37-40.

6.2. Generowanie tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc1

6.2.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem $^1\text{O}_2$ generowanego przez Pc1

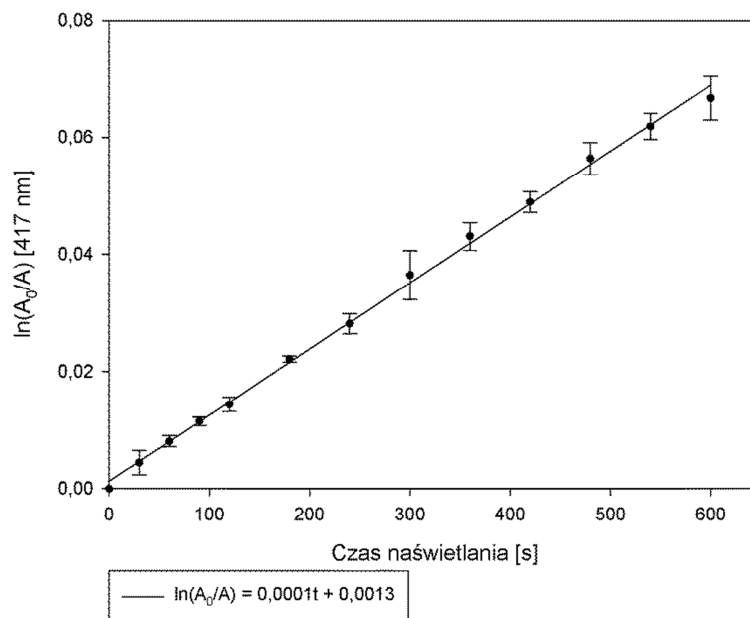


Ryc. 106 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc1** i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=696 \text{ nm}$.

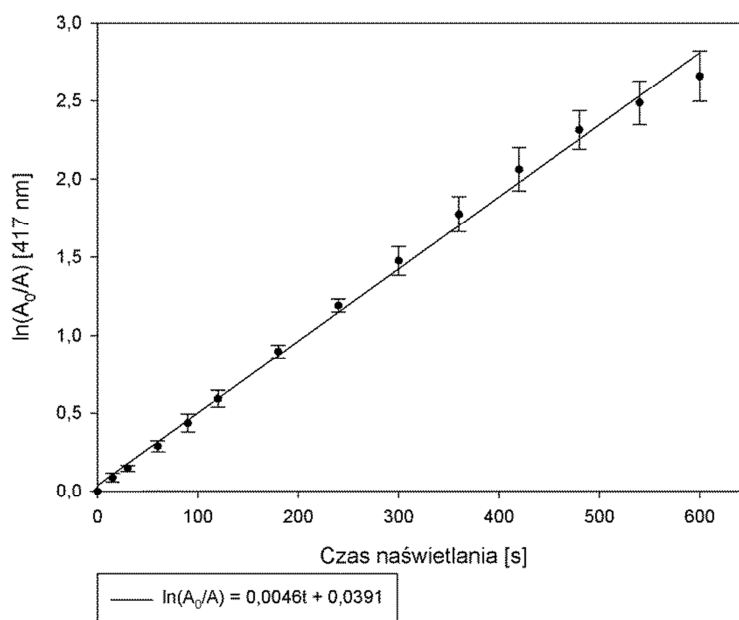


Ryc. 107 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc1** i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=691 \text{ nm}$.

6.2.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc1



Ryc. 108 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=696$ nm mieszaniny ftalocyjaniny **Pc1** i DPBF.



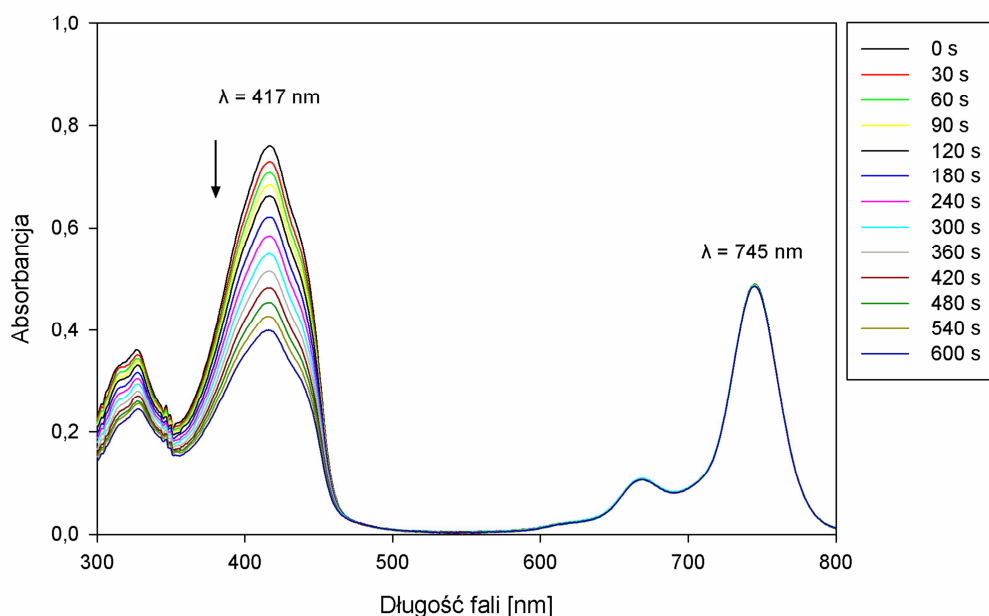
Ryc. 109 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=691$ nm mieszaniny ftalocyjaniny **Pc1** i DPBF.

Tabela 37 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę **Pc1** podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.

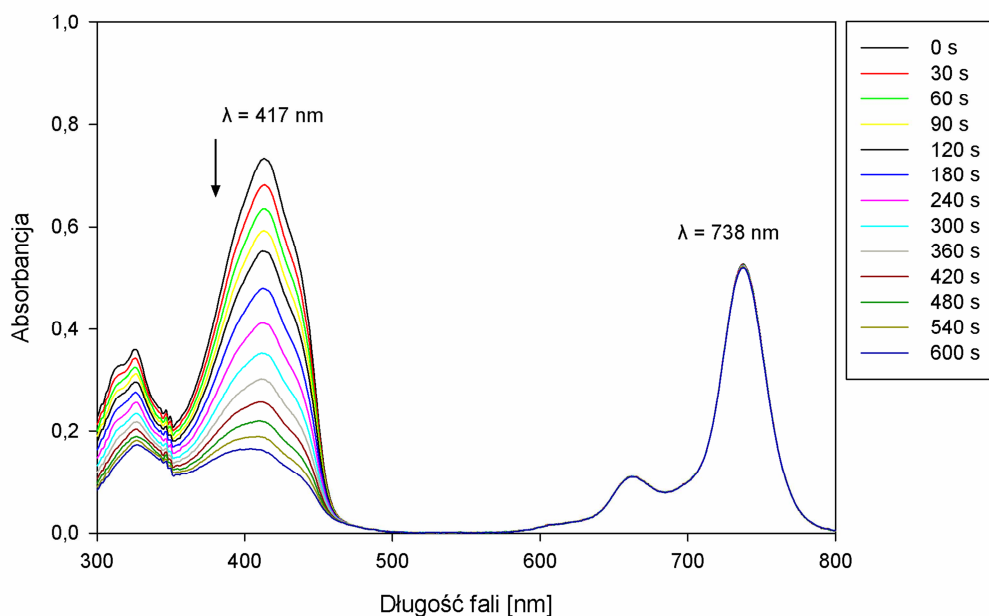
	DMSO	DMF
a	0,0001	0,0046
b	0,0013	0,0391
Sa	0,0000	0,0001
Sb	0,0005	0,0272
Δa	0,0000	0,0000
Δb	0,0003	0,0157
r	0,9991	0,9980
n	13	14
k	0,0001	0,0046
Sk	0,0000	0,0001
Δk	0,0000	0,0000
t_{0,5}	6300,0000	150,0000
Badanie istotności współczynnika korelacji r		
t	84,9263	59,0720
t_(0,05, n)	1,7709	1,7613

6.3. Generowanie tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc2

6.3.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem $^1\text{O}_2$ generowanego przez Pc2

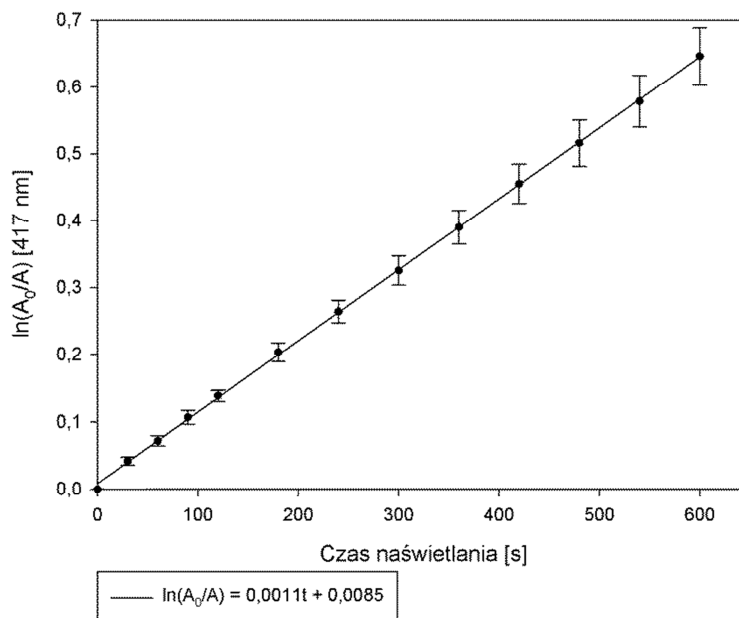


Ryc. 110 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc2** i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=745 \text{ nm}$.

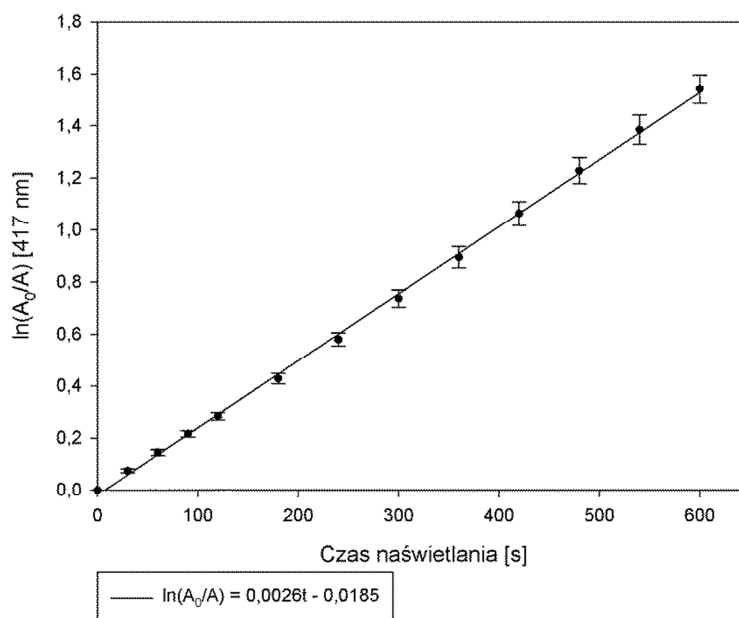


Ryc. 111 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc2** i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=738 \text{ nm}$.

6.3.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc2



Ryc. 112 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=745$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF.



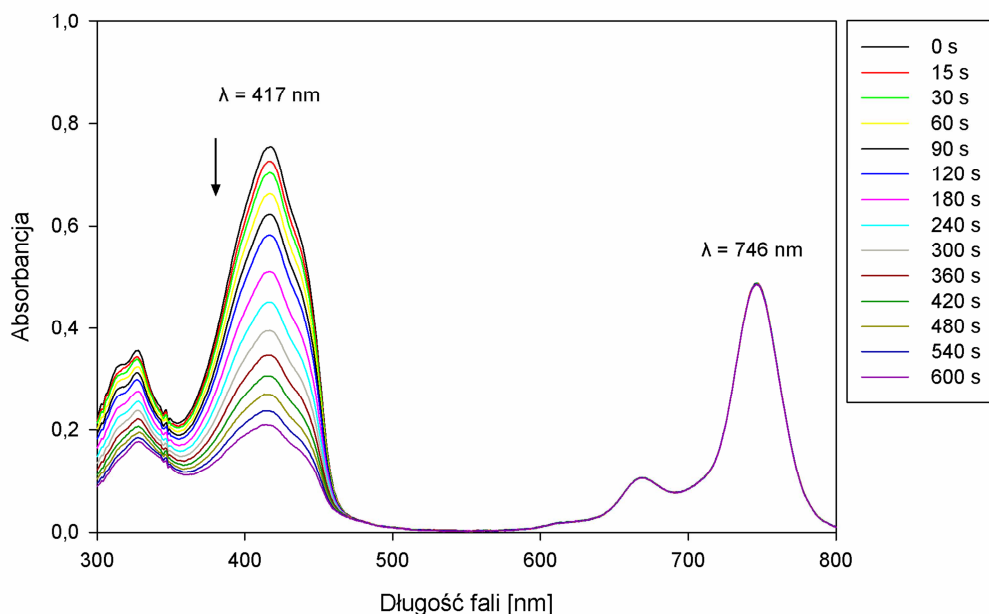
Ryc. 113 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=738$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF.

Tabela 38 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę **Pc2** podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.

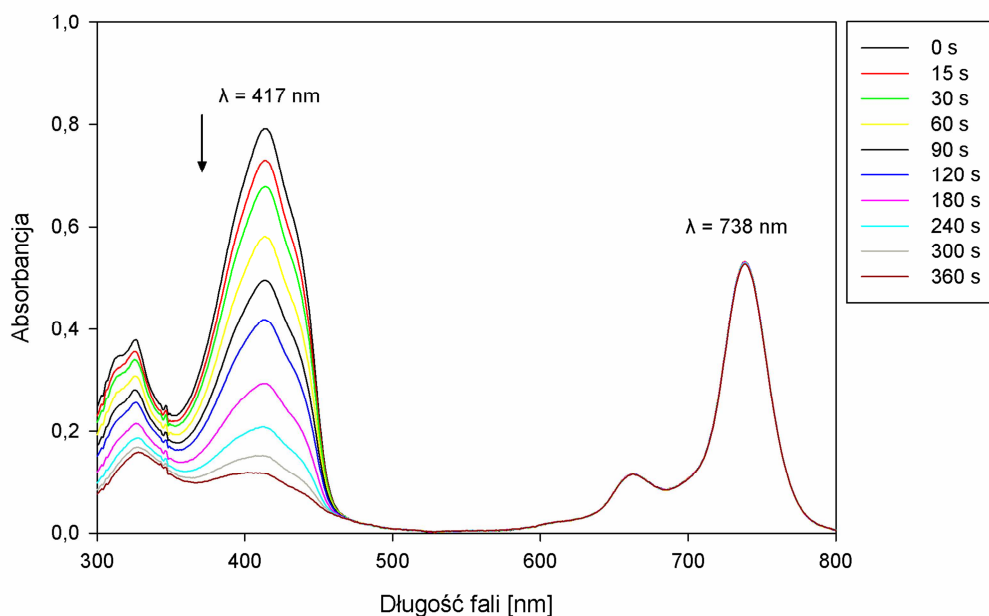
	DMSO	DMF
a	0,0011	0,0026
b	0,0085	-0,0185
Sa	0,0000	0,0000
Sb	0,0016	0,0070
Δa	0,0000	0,0000
Δb	0,0009	0,0042
r	0,9999	0,9996
n	13	13
k	0,0011	0,0026
Sk	0,0000	0,0000
Δk	0,0000	0,0000
t_{0,5}	653,7736	268,6047
Badanie istotności współczynnika korelacji r		
t	254,9319	127,4372
t_(0,05, n)	1,7709	1,7709

6.4. Generowanie tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc3

6.4.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem $^1\text{O}_2$ generowanego przez Pc3

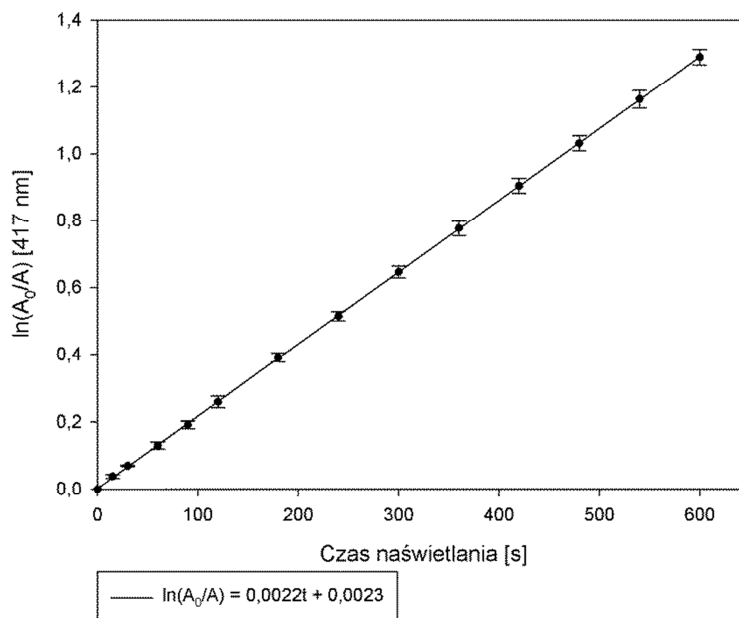


Ryc. 114 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc3** i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 746 \text{ nm}$.

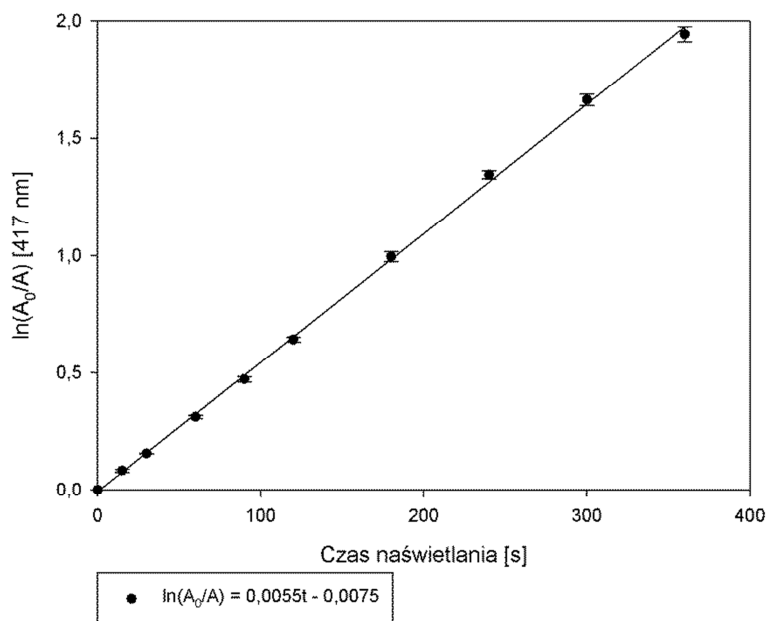


Ryc. 115 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc3** i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 738 \text{ nm}$.

6.4.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc3



Ryc. 116 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=746$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF.



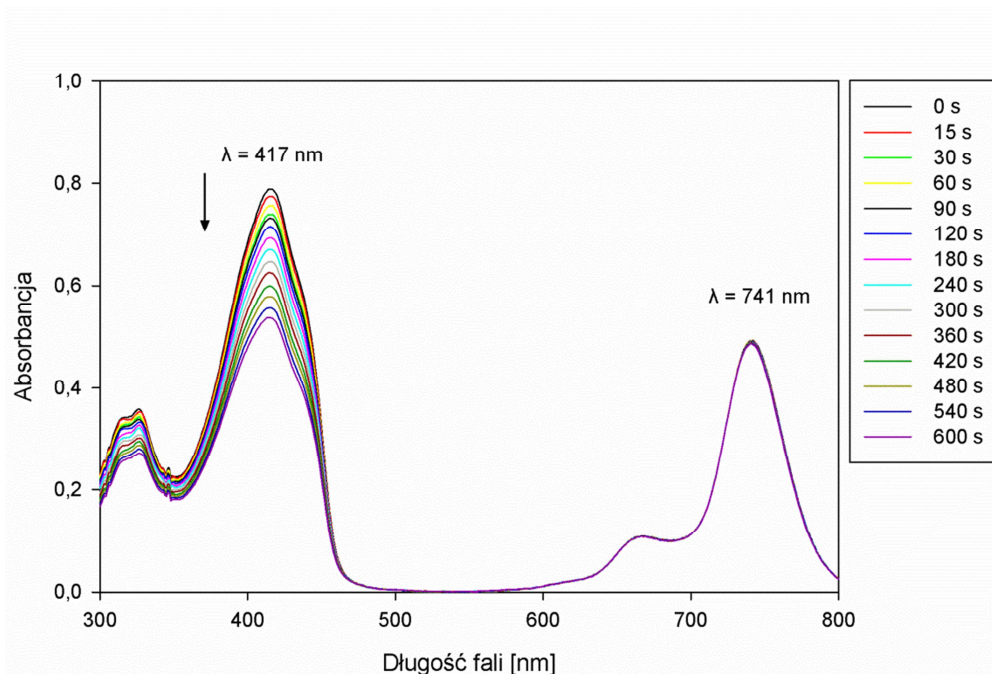
Ryc. 117 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=738$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF.

Tabela 39 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę **Pc3** podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF

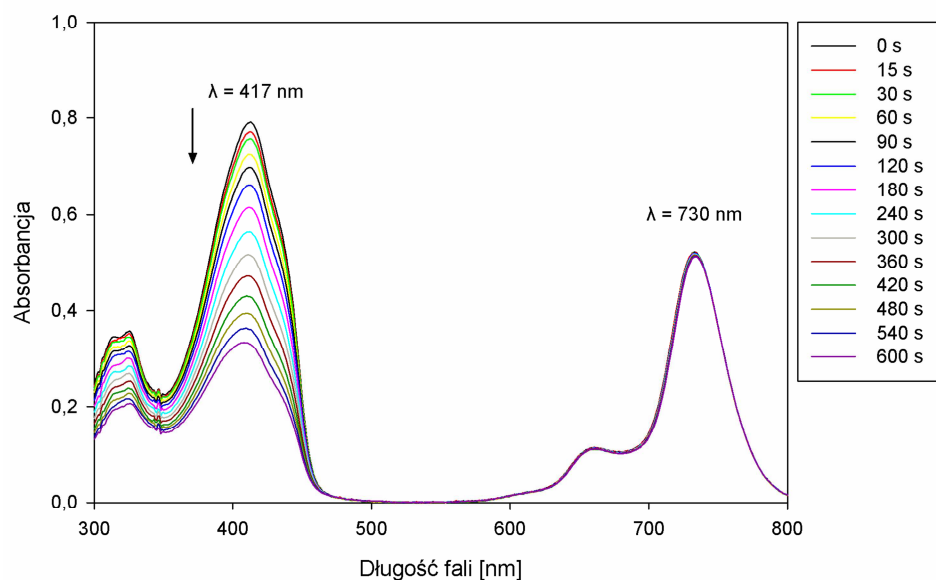
	DMSO	DMF
a	0,0022	0,0055
b	0,0023	-0,0075
Sa	0,0000	0,0001
Sb	0,0010	0,0096
Δa	0,0000	0,0000
Δb	0,0006	0,0069
r	0,9999	0,9999
n	14	10
k	0,0022	0,0055
Sk	0,0000	0,0001
Δk	0,0000	0,0000
t_{0,5}	322,3256	125,7713
Badanie istotności współczynnika korelacji r		
t	264,5553	223,5900
t_(0,05, n)	1,7613	1,8125

6.5. Generowanie tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc4

6.5.1. Spektrofotometryczna analiza rozkładu DPBF pod wpływem $^1\text{O}_2$ generowanego przez Pc4

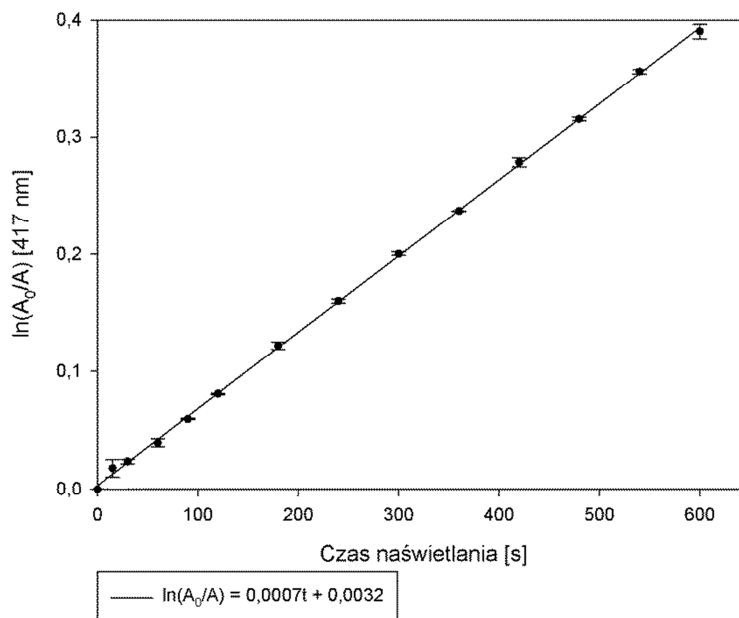


Ryc. 118 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc4** i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=741 \text{ nm}$.

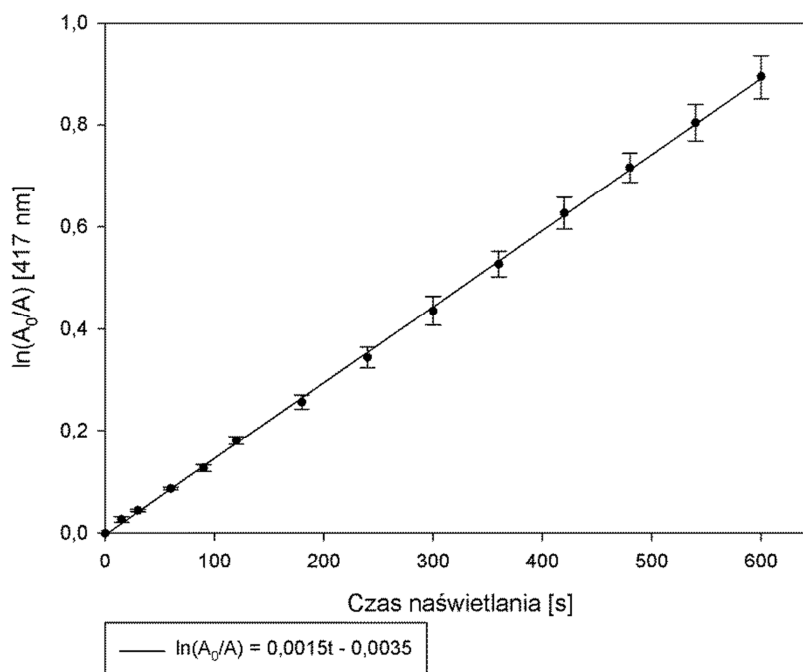


Ryc. 119 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny **Pc4** i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\text{max}}=730 \text{ nm}$.

6.5.2. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc4



Ryc. 120 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=746$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF.



Ryc. 121 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=730$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF.

Tabela 40 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę **Pc4** podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.

	DMSO	DMF
a	0,0007	0,0015
b	0,0032	-0,0035
Sa	0,0000	0,0000
Sb	0,0010	0,0026
Δa	0,0000	0,0000
Δb	0,0006	0,0015
r	0,9998	0,9998
n	14	14
k	0,0007	0,0015
Sk	0,0000	0,0000
Δk	0,0000	0,0000
t_{0,5}	1066,1538	465,1007
Badanie istotności współczynnika korelacji r		
t	187,0548	187,0548
t (0,05, n)	1,7613	1,7613

6.6. Wyznaczenie wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaniny Pc1-4

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego dla badanych ftalocyjanin wyznaczono metodą porównawczą wykorzystując ftalocyjaninę cynkową ZnPc jako związek porównawczy (standard) [202,203]. Na podstawie danych z piśmiennictwa, jako wartość wydajności kwantowej ftalocyjaniny cynkowej przyjęto, odpowiednio 0,67 w DMF i 0,56 w DMSO [202].

Tabela 41 Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} ftalocyjanin **Pc1-4** w roztworach DMSO i DMF.

Związek	Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego			
	DMSO		DMF	
	Φ_{Δ}	$\Delta\Phi_{\Delta}$	Φ_{Δ}	$\Delta\Phi_{\Delta}$
Pc1	0,0224	0,0004	0,4454	0,0090
Pc2	0,2143	0,0036	0,2487	0,0054
Pc3	0,4347	0,0070	0,5312	0,0119
Pc4	0,1247	0,0030	0,1436	0,0030
ZnPc	0,56		0,67	

7. Analiza fototrwałości ftalocyjanin Pc1-4

7.1. Metodyka i warunki fotodegradacji ftalocyjanin Pc1-4 w fazie ciekłej

Proces fotodegradacji z wyznaczeniem parametrów kinetycznych oceniano metodą spektrofotometryczną. Roztwory fotouczulaczy w DMSO i DMF naświetlano promieniowaniem obejmującym zakres 450-900 nm. Fotodegradację **Pc4** analizowano również w roztworze wodnym. Jako źródło światła zastosowano wysokociśnieniową lampę ksenonową (150 W) firmy Optel. W celu eliminacji promieniowania o długości fali poniżej 450 nm wykorzystano szklany filtr barwy żółtej – HCC16. Zmiany zachodzące w czasie naświetlania analizowano w fazie ciekłej, w kwarcowej kuwecie cylindrycznej o pojemności 2,8 cm³ i długości drogi optycznej $l = 1$ cm. Próbki eksponowano na promieniowanie w temperaturze pokojowej. Intensywność promieniowania wynosiła ~ 130 klux. Podczas naświetlania, w odpowiednich odstępach czasu, wykreślano widma UV-Vis oraz mierzono wartość absorbancji w maksimum pasma Q. Uzyskane zmiany przebiegu widm w czasie naświetlania przedstawiono na Ryc. 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136. Badanie wykonano dla każdej z badanych ftalocyjanin w trzech powtórzeniach.

Szybkość rozkładu fotochemicznego ftalocyjanin **Pc1-4** można opisać równaniem (8):

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k \times [A] \quad (8)$$

gdzie:

v - szybkość reakcji,

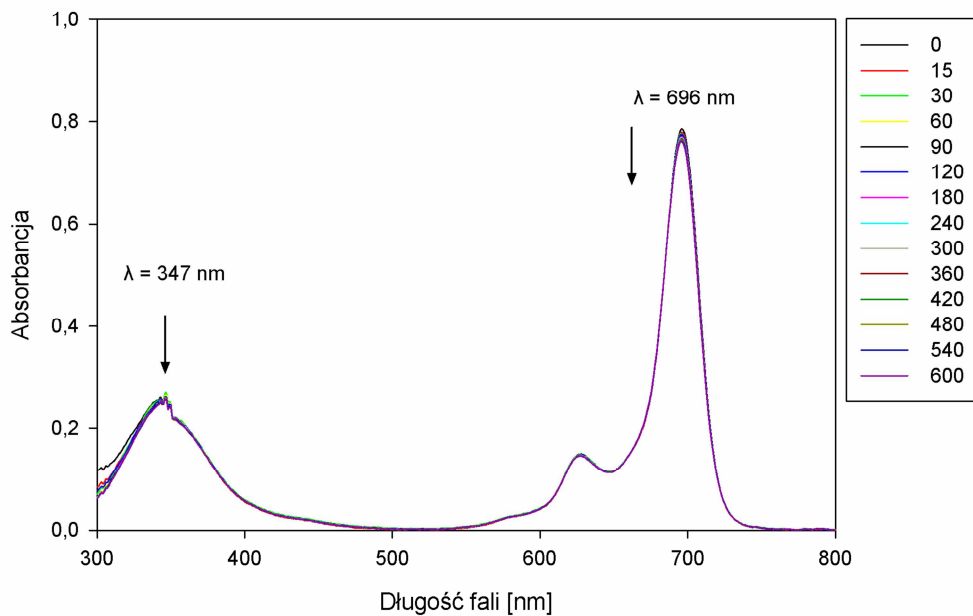
$d[A]$ - zmiany absorbancji maksimum pasma Q w czasie naświetlania t ,

t - czas reakcji,

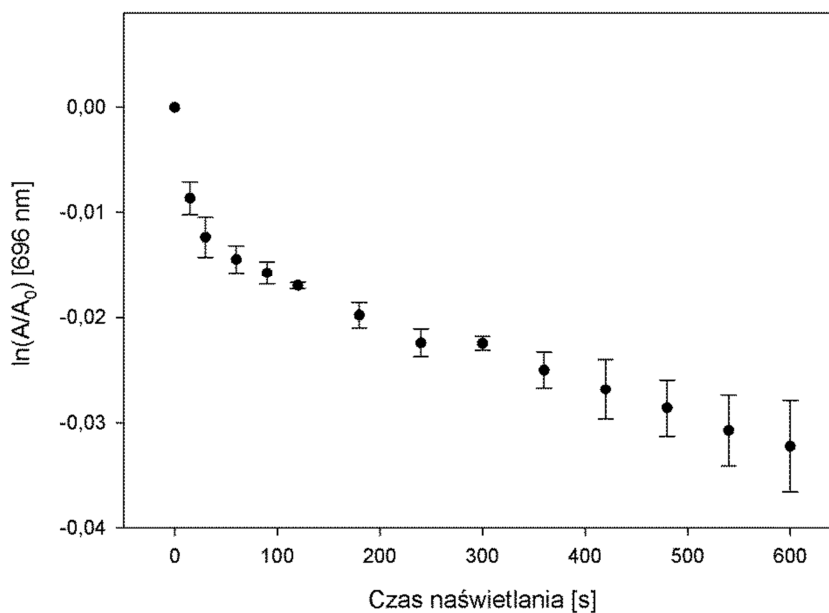
k - stała szybkości reakcji.

W przypadkach, dla których proces fotodegradacji charakteryzował się dwuetapowym przebiegiem, krzywe kinetyczne wyznaczono techniką odejmowania i ekstrapolacji prostych. Parametry równań opisujących krzywe kinetyczne wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów [200].

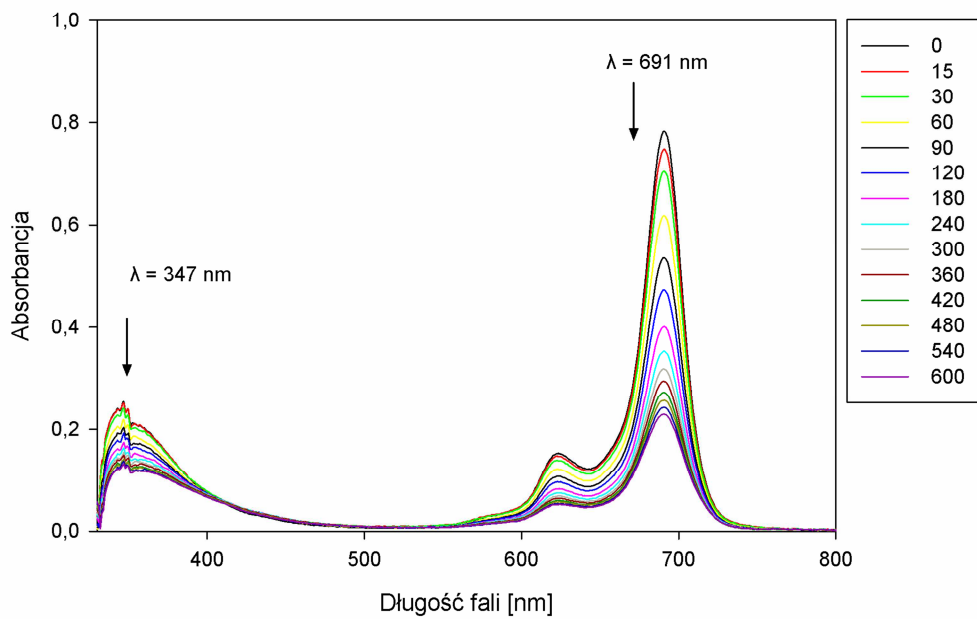
7.2. Rozkład fotochemiczny i wyznaczenie parametrów kinetycznych fotodegradacji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMSO i DMF



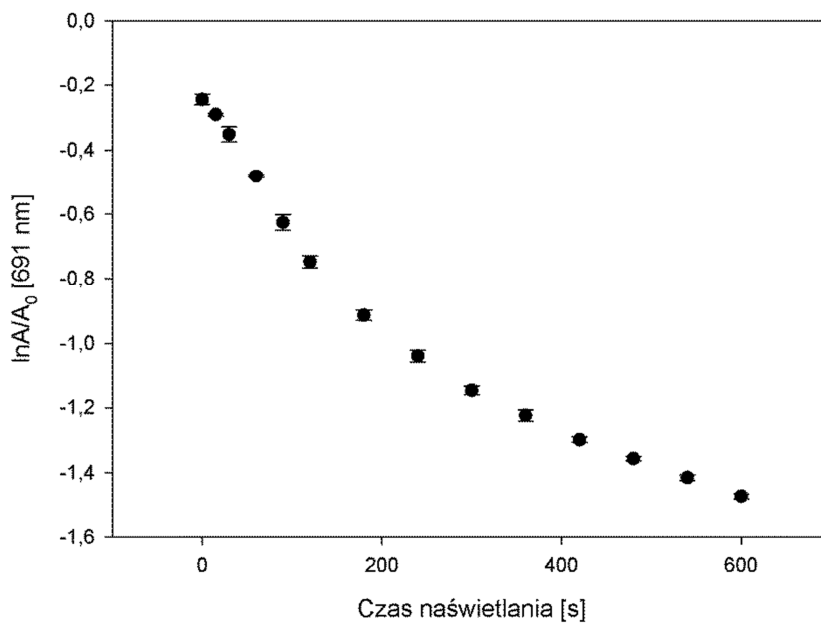
Ryc. 122 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 123 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 124 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMF; czas naświetlania 600 s.

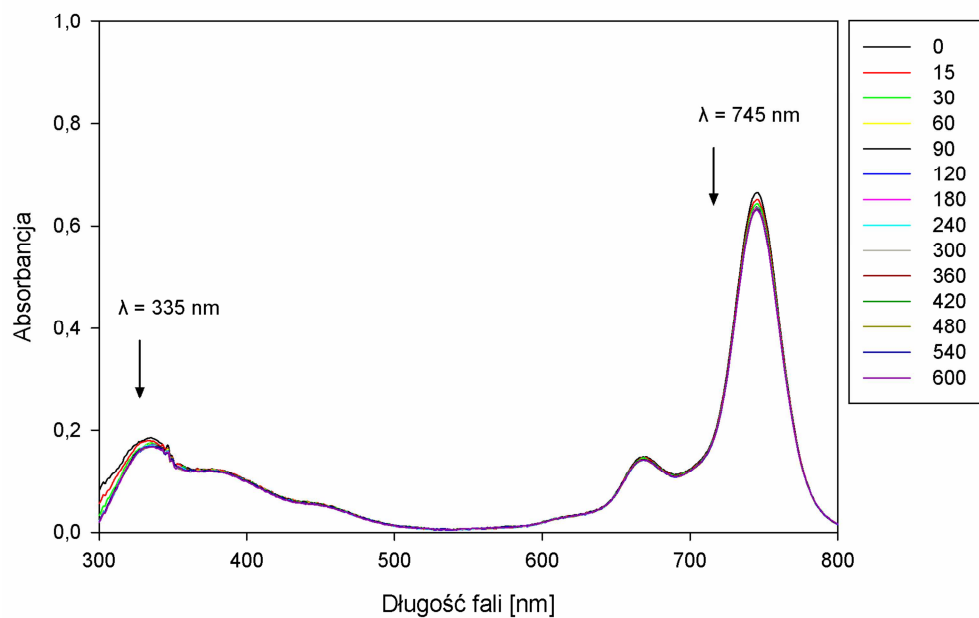


Ryc. 125 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMF; czas naświetlania 600 s.

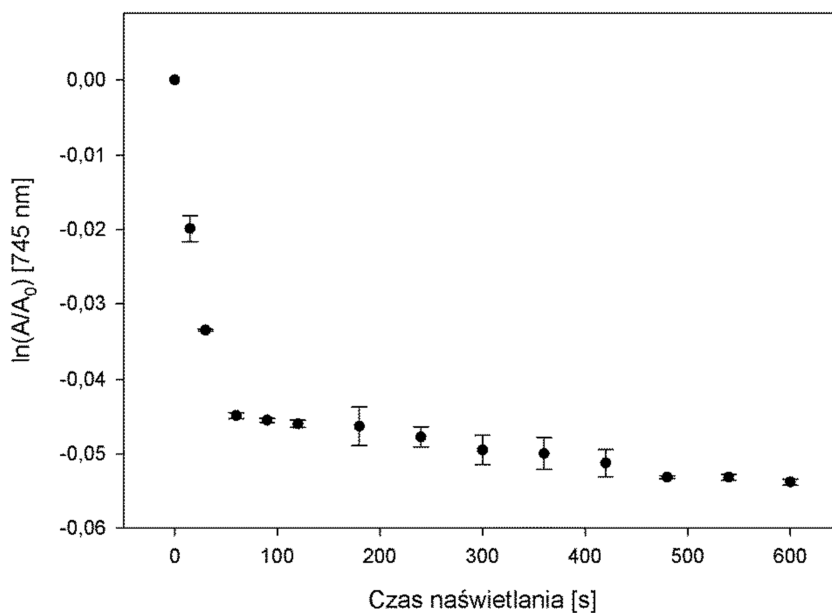
Tabela 42 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc1** w roztworze DMSO i DMF.

	DMSO		DMF	
	Etap I	Etap II	Etap I	Etap II
a	-0,04698	-0,00003	-0,01460	-0,00117
b	-4,52063	-0,01338	-0,66220	-0,54103
Sa	0,00949	0,00000	0,00177	0,00014
Sb	0,65263	0,00485	0,60639	0,15729
Δa	0,01511	0,00000	0,00148	0,00013
Δb	1,03849	0,00280	0,50695	0,14547
r	-0,98019	-0,99720	-0,99275	-0,99335
n	4	14	8	7
k	0,04698	0,00003	0,01460	0,00117
Sk	0,00949	0,00000	0,00177	0,00014
Δk	0,01511	0,00000	0,00148	0,00013
t_{0,5}	14,74979	22114,80543	47,46575	590,27901
Badanie istotności współczynnika korelacji r				
	Etap I	Etap II	Etap I	Etap II
t	-9,89711	-49,89769	-23,36831	-22,82220
t_(0,05, n)	2,13185	1,76131	1,85955	1,894579

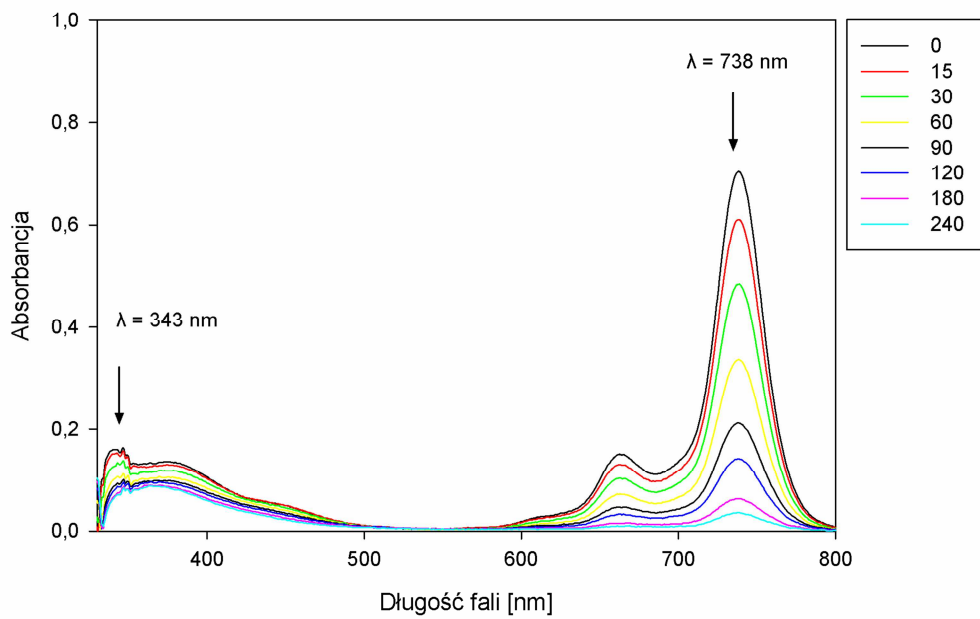
7.3. Rozkład fotochemiczny i wyznaczenie parametrów kinetycznych fotodegradacji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMSO i DMF



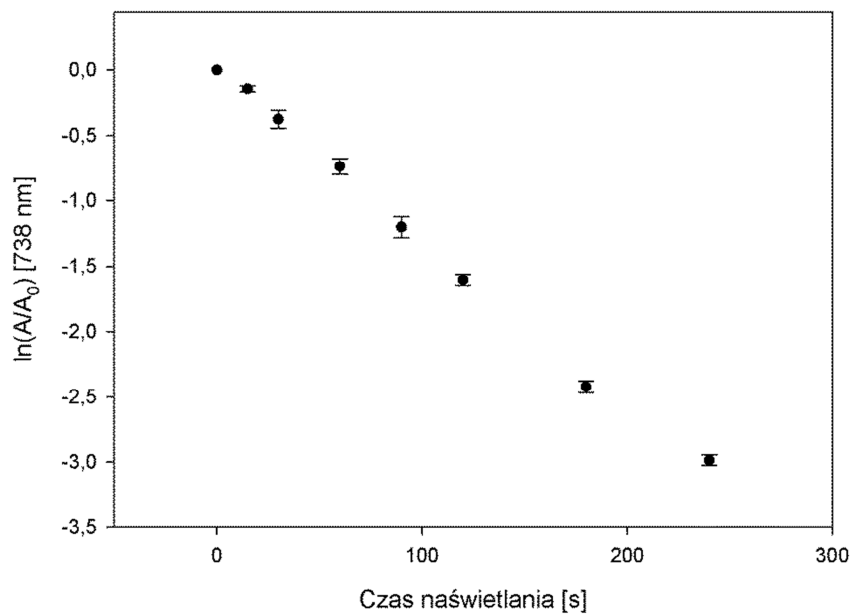
Ryc. 126 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc2** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 127 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc2** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 128 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc2** w roztworze DMF; czas naświetlania 240 s.

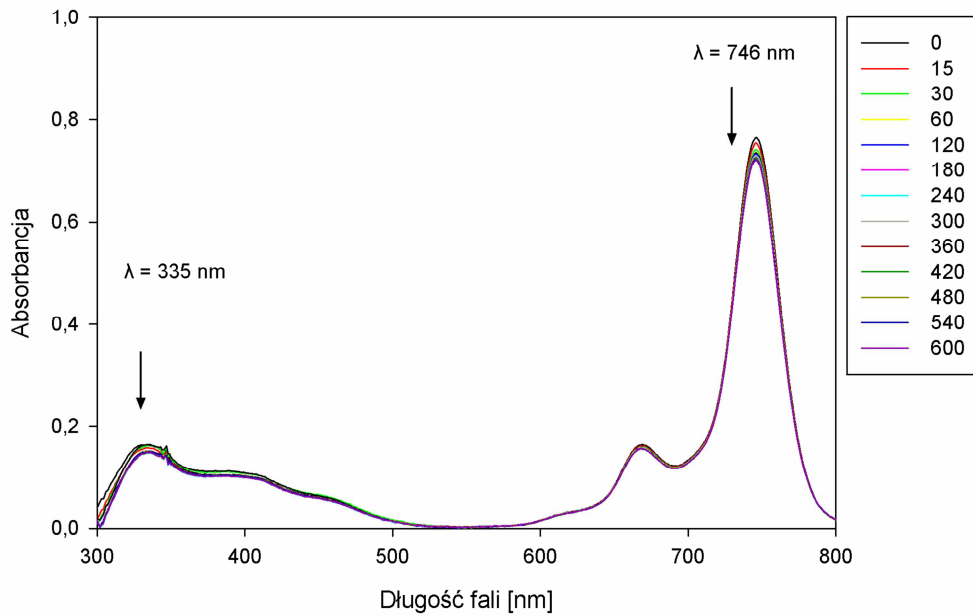


Ryc. 129 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc2** w roztworze DMF; czas naświetlania 240 s.

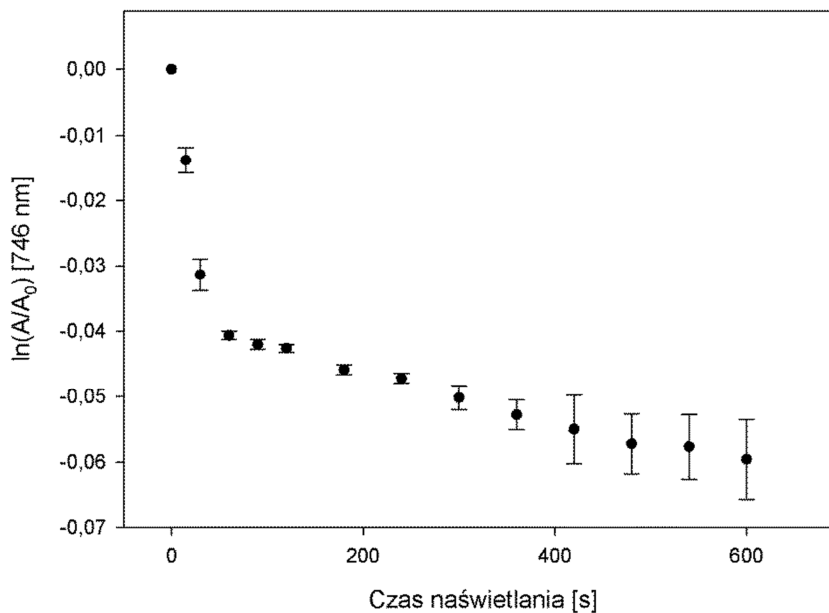
Tabela 43 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc2** w roztworze DMSO i DMF.

	DMSO		DMF
	Etap I	Etap II	
a	-0,07414	-0,00001	-0,01289
b	-2,76745	-0,04464	0,00049
Sa	0,01564	0,00000	0,00079
Sb	1,07507	0,00487	0,26994
Δa	0,02489	0,00000	0,00066
Δb	1,71067	0,00281	0,22567
r	-0,97846	-0,98644	-0,99813
n	4	14	8
k	0,07414	0,00001	0,01289
Sk	0,01564	0,00000	0,00079
Δk	0,02489	0,00000	0,00066
t_{0,5}	9,34759	48794,91270	53,77556
Badanie istotności współczynnika korelacji r			
	Etap I	Etap II	
t	-9,48044	-22,48628	-46,23147
t_(0,05, n)	2,13185	1,76131	1,85955

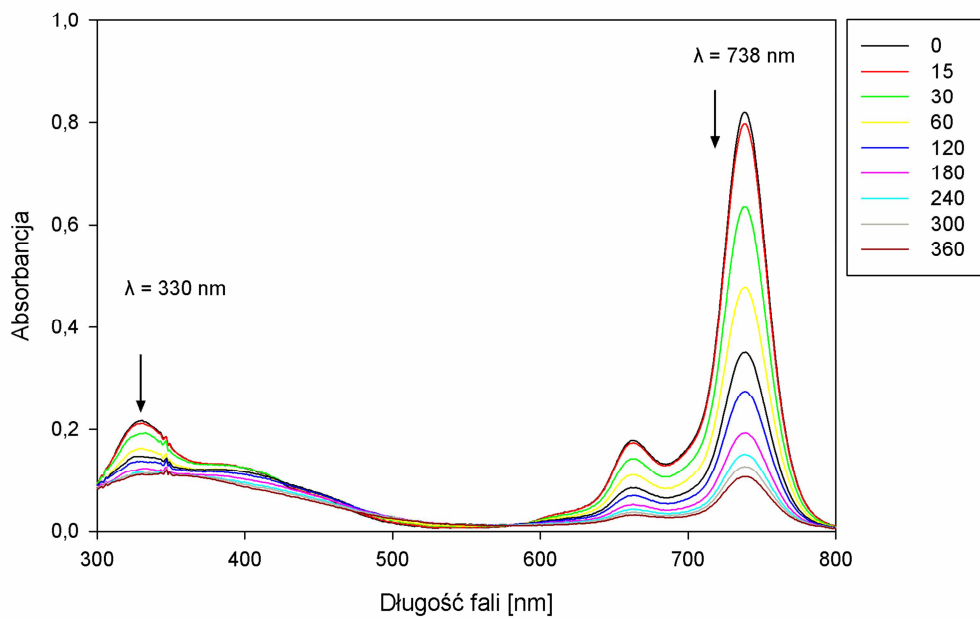
7.4. Rozkład fotochemiczny i wyznaczenie parametrów kinetycznych fotodegradacji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMSO i DMF



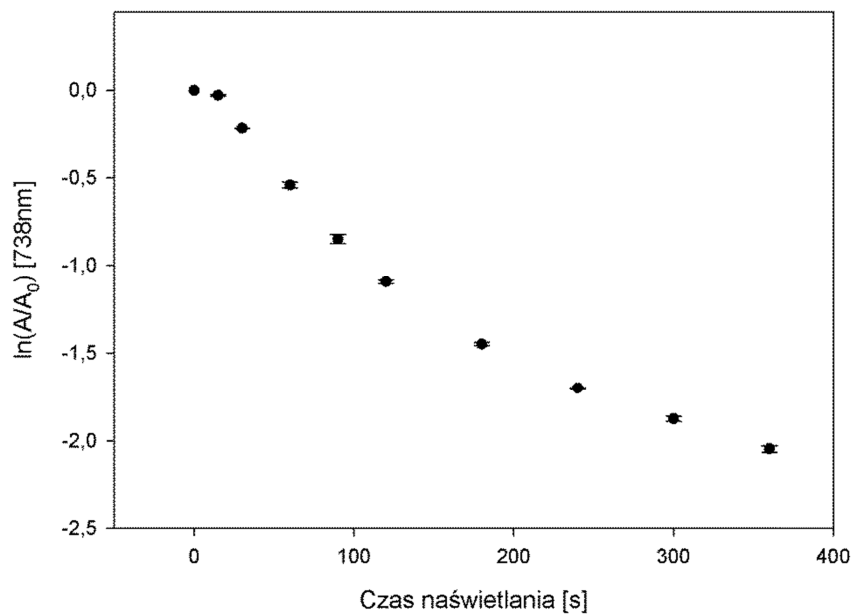
Ryc. 130 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc3** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 131 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc3** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 132 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc3** w roztworze DMF; czas naświetlania 360 s.

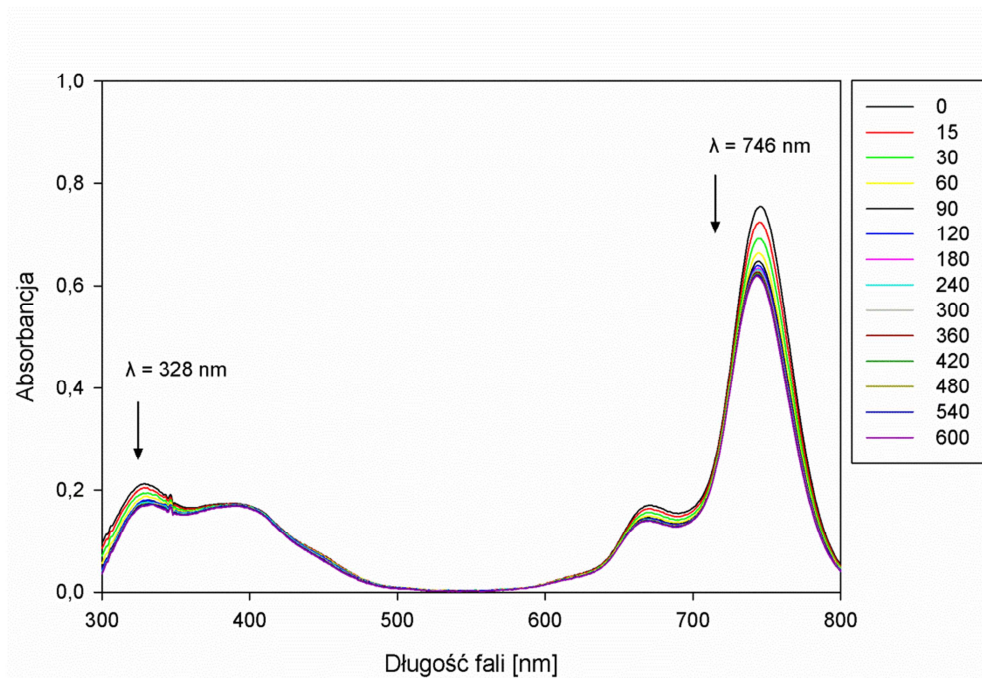


Ryc. 133 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc3** w roztworze DMF; czas naświetlania 360 s.

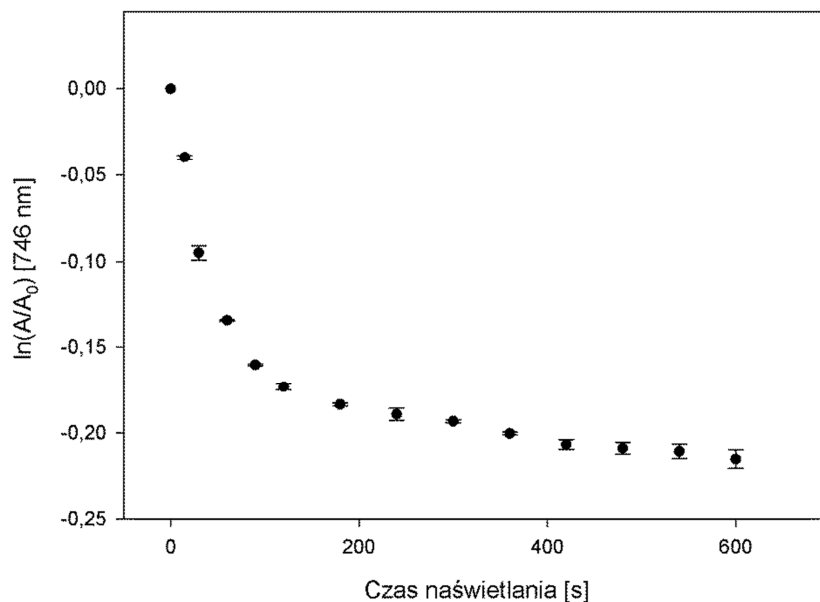
Tabela 44 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc3** w roztworze DMSO i DMF.

	DMSO		DMF	
	Etap I	Etap II	Etap I	Etap II
a	-0,07953	-0,00004	-0,02574	-0,00327
b	-2,82014	-0,03888	-0,11300	-0,88351
Sa	0,01675	0,00000	0,00509	0,00033
Sb	1,15144	0,00462	1,24286	0,18085
Δa	0,02665	0,00000	0,00534	0,00052
Δb	1,83220	0,00310	1,30430	0,28777
r	-0,97853	-0,99423	-0,98101	-0,99510
n	4	11	6	4
k	0,07953	0,00004	0,02574	0,00327
Sk	0,01675	0,00000	0,00509	0,00033
Δk	0,02665	0,00000	0,00534	0,00052
t_{0,5}	8,71407	19120,92795	26,91888	211,76140
Badanie istotności współczynnika korelacji r				
	Etap I	Etap II	Etap I	Etap II
t	-9,49513	-30,74575	-12,38925	-20,13759
t_(0,05, n)	2,13185	1,79588	1,94318	2,13185

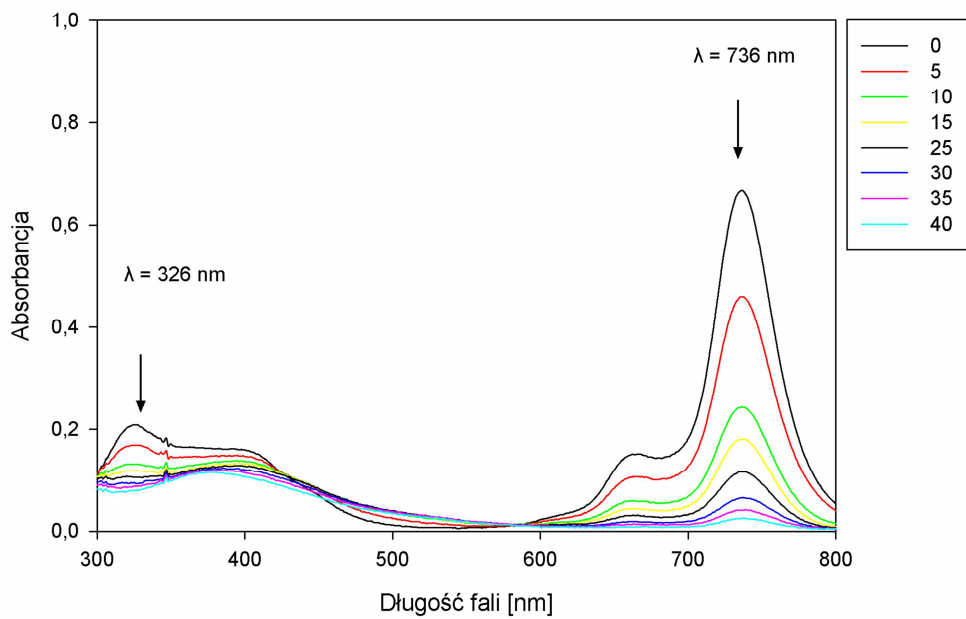
7.5. Rozkład fotochemiczny i wyznaczenie parametrów kinetycznych fotodegradacji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze DMSO i H₂O



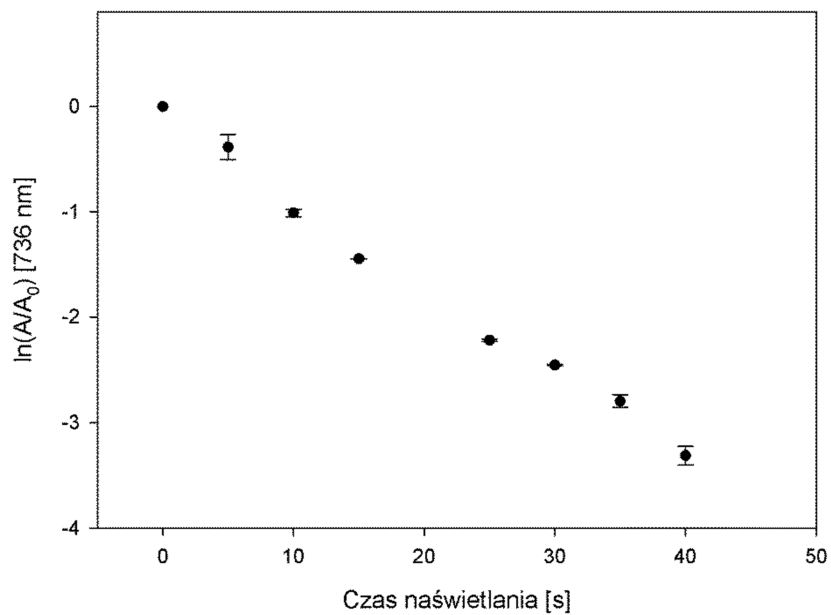
Ryc. 134 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc4** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 135 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc4** w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.



Ryc. 136 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny **Pc4** w roztworze wodnym; czas naświetlania 40 s.



Ryc. 137 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc4** w roztworze wodnym; czas naświetlania 40 s.

Tabela 45 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny **Pc4** w roztworze DMSO i roztworze wodnym

	DMSO		H ₂ O
	Etap I	Etap II	
a	-0,02710	-0,00010	-0,08050
b	-1,78910	-0,17150	-0,08888
Sa	0,00101	0,00001	0,00753
Sb	0,24638	0,01489	0,51642
Δa	0,00093	0,00001	0,00630
Δb	0,22786	0,01245	0,43174
r	-0,99931	-0,98608	-0,99565
n	7	8	8
k	0,02710	0,00010	0,08050
Sk	0,00101	0,00001	0,00753
Δk	0,00093	0,00001	0,00630
t_{0,5}	25,57196	6930,00000	8,60853
Badanie istotności współczynnika korelacji r			
	Etap I	Etap II	
t	-71,04126	-16,77227	-30,22690
t_(0,05, n)	1,89458	1,85955	1,85955

8. Otrzymywanie i charakterystyka liposomów z inkorporowanymi ftalocyjaninami **Pc1-4**

Podstawowym składnikiem fosfolipidowym wykorzystanym do otrzymania liposomów była 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (POPC); dodatkowo użyto L- α -fosfatydylo-DL-glicerol (PG) lub chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (DOTAP) i cholesterol (chol). Skład uzyskanych formułacji liposomalnych przedstawiono w Tabeli 46. Stosunek objętościowy roztworów ftalocyjanin oraz składników lipidowych pozwolił uzyskać 100% enkapsulację badanych związków. Stężenie ftalocyjanin **Pc1-4** w zawieszynie liposomów wynosiło 100 μ M.

Liposomy otrzymano metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego. W tym celu przygotowano roztwory ftalocyjanin **Pc1-4** w chloroformie o stężeniu 0,4 mg/cm³ i zmieszano w odpowiednim stosunku objętościowym (v/v) z roztworami roboczymi poszczególnych lipidów (Tabela 46), w łoży z nawiewem laminarnym. Następnie chloroform odparowano na wyparce próżniowej, a probówkę z filmem lipidowym umieszczono w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej i pozostawiono na 24 h w celu usunięcia wszelkich pozostałości chloroformu. Wysuszony film lipidowy poddano hydratacji roztworem buforowym (pH = 7,49), zawierającym HEPES w stężeniu 10 mM i chlorek sodu o stężeniu 140 mM. Film lipidowy intensywnie wytrząsano z buforem przez ok. 5-10 min., uzyskując zawiesinę dużych wielolamelarnych liposomów (MLV). Liposomy przetłaczano stopniowo, 21 razy przez filtry poliwęglanowe zawierające pory o średnicy 100 nm, w temperaturze pokojowej. Kalibracja wymiarowa metodą ekstruzji ręcznej umożliwiła otrzymanie liposomów jednolamelarnych, homogennych pod względem rozmiarów o średnicy ok. 100-200 nm (Tabela 46). Liposomy z inkorporowanymi ftalocyjaninami charakteryzowano metodą dynamicznego rozpraszania światła przy użyciu analizatora wielkości cząstek N4 Plus Coulter, Beckman, USA. Próbkę przechowywano w temperaturze 2–8 °C, chroniąc przed dostępem światła.

Tabela 46 Skład lipidowy i charakterystyka liposomów wykorzystywanych do inkorporowania ftalocyjanin **Pc1-4**

Skład formułacji	Stosunek molowy	po przygotowaniu		po kalibracji	
		$\bar{\varnothing} \pm \Delta\bar{\varnothing}$ [nm]	PDI	$\bar{\varnothing} \pm \Delta\bar{\varnothing}$ [nm]	PDI
Liposomy puste					
POPC : PG	8 : 2	962,1 ± 427,2	0,932	346,7 ± 146,4	0,620
POPC : PG : chol	5,34 : 1,33 : 3,33	981,8 ± 433,5	0,885	432,2 ± 184,7	0,678
POPC : DOTAP	8 : 2	1129,8±504,0	0,976	331,4 ± 141,4	0,669
POPC : DOTAP : chol	5,34 : 1,33 : 3,33	1301,5±566,6	0,908	806,8 ± 355,9	0,779
Liposomy z inkorporowaną ftalocyjaniną					
Pc1 : POPC : PG	0,1 : 8 : 2	922,3 ± 414,7	1,057	126,8 ± 34,8	0,108
Pc1 : POPC : PG : chol	0,1 : 5,34 : 1,33 : 3,33	887,2 ± 395,0	0,975	121,6 ± 39,2	0,177
Pc1 : POPC : DOTAP	0,1 : 8 : 2	925,0 ± 409,8	0,913	147,0 ± 45,7	0,158
Pc1 : POPC : DOTAP :chol	0,1 : 5,34 : 1,33 : 3,33	848,1 ± 373,9	0,874	120,6 ± 35,3	0,130
Pc2 : POPC : PG	0,1 : 8 : 2	764,3 ± 347,1	1,179	272,4 ± 113,6	0,570
Pc3 : POPC : PG	0,1 : 8 : 2	888,7 ± 408,0	1,341	271,6 ± 109,2	0,458
Pc4 : POPC : PG	0,1 : 8 : 2	1050,0±472,9	1,075	263,7 ± 98,1	0,311
Roztwory robocze składników lipidowych w chloroformie:					
1-palmitoilo-2-oleoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina (POPC) – 20 mg/cm ³					
L- α -fosfatydylo-DL-glicerol (PG) - 25 mg/cm ³					
chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy (DOTAP) - 10 mg/cm ³					
cholesterol (chol) - 10 mg/cm ³					

9. Badanie aktywności przeciwnowotworowej – ocena aktywności biologicznej

9.1. Przygotowanie hodowli komórkowej

W badaniach biologicznych wykorzystano ludzkie linie komórkowe raka koleczystokomórkowego (ang. human squamous cell carcinoma - HSCC). Linia komórek HSC3 została wyizolowana z nowotworu języka [205] i udostępniona przez Dr. R. Kramer'a (University of California San Francisco (UCSF), San Francisco USA), natomiast komórki H413 pozyskano z nowotworu ślinianek większych [206] dzięki uprzejmości Dr. R. Jordan'a (UCSF). Hodowle komórkowe prowadzono na pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME), odpowiednio suplementowanej, zgodnie z zaleceniami dla każdej linii - Tabela 47.

Tabela 47 Skład pożywek do hodowli komórkowych linii HSC3 i H413

Suplement	DME/10 – HSC3	DME/10 F12 – H413
Płodowa surowica bydlęca (FBS) – inaktywowana ciepłem	10%	10%
penicillinum	100 j./ml	100 j./ml
streptomycinum	100 µg/ml	100 µg/ml
L-glutamina	4 mM	4 mM
Ham's Nutrient Mixture F12	-	+

Komórki zostały pozyskane z banku komórek, przechowywanych w ciekłym azocie (-196 °C). Po wyjęciu komórek z ciekłego azotu, zawartość fiołki rozpuszczano w medium ogrzanym do temperatury 37 °C, a następnie zawiesinę komórek umieszczano w medium wzbogaconym w FBS. Komórki inkubowano w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze nasyconej ditlenkiem węgla o stężeniu 5%. Po upływie 24 h, komórki sprawdzano pod mikroskopem; inkubowano przez kolejne dni aż do uzyskania konfluentnej hodowli, monitorując rozwój hodowli mikroskopowo każdego dnia. Komórki pasażowano 2-3 razy w tygodniu w stosunku 1:4 (HSC3) i 1:6 (H413) w celu zapewnienia ciągłości linii komórkowej.

9.2. Przygotowanie roztworów ftalocyjanin Pc1-4

Ftalocyjaniny **Pc1-3** rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO) uzyskując roztwór o stężeniu 10 mM, a następnie rozcieńczano odpowiednim medium DME lub DME F12 bez dodatku FBS i czerwieni fenolowej uzyskując roztwór roboczy o stężeniu 50 μM . Ftalocyjanina **Pc4** była rozpuszczona bezpośrednio w medium. Roztwory ftalocyjanin o stężeniu 50 μM rozcieńczano, odpowiednią odżywką do hodowli komórkowych, uzyskując serie rozcieńczeń niezbędne do przeprowadzenia badań biologicznych.

9.3. Ocena przeżywalności komórek

W badaniach biologicznych obejmujących badanie toksyczności ciemnej i jasnej, morfologię komórek analizowano stosując mikroskop kontrastowo-fazowy (powiększenie 100x). Liczbę żywych komórek do przygotowania hodowli oznaczono testem wchłaniania błękitu trypanu (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Przeżywalność komórek w badaniach aktywności biologicznej wyznaczano przy użyciu zmodyfikowanego testu błękitu Alamar [51,52]. Po usunięciu medium, do każdej studzienki dodano 1,0 cm^3 10% (v/v) roztworu błękitu Alamar, w odpowiednim dla każdej linii komórkowej, pełnowartościowym medium. Płytkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 2-3 h, a następnie pobierano 0,2 cm^3 supernatantu i mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm i 600 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Przeżywalność komórek (CV, ang. cell viability) wyrażano jako procent kontroli i obliczano wg wzoru (9):

$$CV = \frac{A_{tc570} - A_{tc600}}{A_{cc570} - A_{cc600}} \times 100 \text{ [%]}, \quad (9)$$

gdzie:

- CV - przeżywalność komórek badanych, wyrażona w procentach,
- A_{tc570} - wartość absorbancji przy $\lambda=570$ nm zmierzona dla komórek badanych
- A_{tc600} - wartość absorbancji przy $\lambda=600$ nm zmierzona dla komórek badanych
- A_{cc570} - wartość absorbancji przy $\lambda=570$ nm zmierzona dla próby kontrolnej,
- A_{cc600} - wartość absorbancji przy $\lambda=600$ nm zmierzona dla próby kontrolnej [203,207,208].

W celu zobrazowania zmian morfologii komórek HSC3, komórki wybarwiano znacznikami fluorescencyjnymi. W tym celu, po upływie 24 h od zakończenia naświetlania

hodowli, inkubowanej z ftalocyjaninami **Pc1-4**, z wybranych studzienek usuwano medium, i przepłukiwano komórki dwukrotnie $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu PBS. Następnie, do studzienek dodawano markery fluorescencyjne, tj. SYTO Green barwiący kwasy nukleinowe w żywych i martwych komórkach (zielona fluorescencja) oraz Cell Trace Calcein red-orange AM (pomarańczowa fluorescencja) służący do barwienia żywych komórek. Po 15-20 min. inkubacji, wybrane studzienki poddawano wizualizacji w mikroskopie fluorescencyjnym (powiększenie obiektywu 20x) z zastosowaniem filtra Chroma 61000v2.

9.4. Badanie toksyczności ciemnej

Komórki HSC3 i H413 o konfluencji ok. 80% posiano do 48-dołkowych płytek do hodowli komórkowych (BD FalconTM, Franklin Lakes, NJ, USA), odpowiednio w gęstości $1,8 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium i $1,4 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium. Następnego dnia usunięto medium, komórki przemywano dwukrotnie roztworem buforu fosforanowego (PBS) o obj. $0,5 \text{ cm}^3$ i dodano 1 cm^3 medium, pozbawionego FBS i czerwieni fenolowej, zawierające określone stężenie fotouczulacza, z wyjątkiem kontroli. Komórki inkubowano 24 h w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ w wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO_2 . Po upływie 24 h usunięto medium, komórki ponownie przemyto dwukrotnie roztworem buforu fosforanowego (PBS) o obj. $0,5 \text{ cm}^3$ i dodano świeży roztwór medium z dodatkiem FBS i czerwieni fenolowej. Komórki inkubowano ponownie 24 h. Następnego dnia oceniano przeżywalność komórek stosując test Alamar Blue. Komórki inkubowane w medium lub medium z 0,5% dodatkiem DMSO, służyły jako kontrola. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki badania toksyczności ciemnej ftalocyjanin **Pc1-4** w formie wolnej i liposomalnej przedstawiono w Tabeli 48.

Tabela 48 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności ciemnej ftalocyjanin **Pc1-4** w formie wolnej (Pc) i liposomalnej (lipPc)

Związek	Stężenie ftalocyjaniny [μM]	HSC-3		H413	
		Pc	lip Pc	Pc	lip Pc
Pc1	0,01	bb	bb	$106,7 \pm 2,2$	$105,7 \pm 3,3$
	0,1	$101,9 \pm 9,2$	$102,1 \pm 3,9$	$106,7 \pm 4,5$	$110,8 \pm 3,5$
	0,5	bb	bb	$115,3 \pm 7,8$	$117,4 \pm 4,2$
	1,0	$101,0 \pm 0,1$	$109,1 \pm 3,4$	$79,4 \pm 3,4$	bb
	10,0	$97,0 \pm 0,1$	$103,6 \pm 5,6$	$36,1 \pm 9,2$	bb
Pc2	0,1	$96,8 \pm 4,5$	$96,2 \pm 1,1$	$102,8 \pm 2,5$	$89,8 \pm 5,7$
	1,0	$104,0 \pm 3,5$	$94,5 \pm 9,1$	$104,8 \pm 8,9$	$86,8 \pm 7,2$
	10,0	$101,2 \pm 5,2$	$101,7 \pm 3,4$	$93,9 \pm 2,7$	$78,2 \pm 0,6$
Pc3	0,1	$100,9 \pm 1,3$	$108,9 \pm 0,7$	$92,3 \pm 4,1$	$95,3 \pm 7,4$
	1,0	$102,2 \pm 3,2$	$105,6 \pm 8,6$	$96,0 \pm 2,5$	$97,6 \pm 4,6$
	10,0	$102,8 \pm 8,9$	$115,4 \pm 4,3$	$87,4 \pm 7,3$	$97,1 \pm 5,3$
Pc4	0,1	$103,3 \pm 3,5$	$100,2 \pm 8,0$	$94,7 \pm 4,8$	$94,7 \pm 4,8$
	1,0	$111,2 \pm 5,0$	$94,9 \pm 0,4$	$87,0 \pm 9,8$	$87,0 \pm 9,8$
	10,0	$105,4 \pm 0,1$	$101,7 \pm 6,6$	$104,8 \pm 1,1$	$104,8 \pm 1,1$

*bb – brak badań

9.5. Badanie toksyczności jasnej

Komórki HSC3 i H413 o konfluencji ok. 80% posiano do 48-dołkowych płytek do hodowli komórkowych (BD FalconTM, Franklin Lakes, NJ, USA), odpowiednio w gęstości $1,8 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium i $1,4 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium. Następnego dnia usunięto medium i komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS o obj. $0,5 \text{ cm}^3$, dodano 1 cm^3 medium, pozbawionego FBS i czerwieni fenolowej, zawierające określone stężenie fotouczulacza (z wyjątkiem kontroli). Komórki inkubowano 24 h w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ w wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO_2 . Po upływie 24 h usunięto medium, komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS o obj. $0,5 \text{ cm}^3$. Następnie, komórki poddano naświetlaniu w $0,5 \text{ cm}^3$ PBS promieniowaniem o długości fali z zakresu absorpcji pasma Q. Jako źródło światła zastosowano diody laserowe wysokiej mocy (LED MultiChip Emitter 60 high efficiency AlGaAs, Roithner LaserTechnik GmbH, Wiedeń, Austria). Komórki naświetlano przez 20 min. promieniowaniem o długości fali 690 nm lub 735 nm i natężeniu $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Natężenie światła padającego na komórki mierzono radiometrem

PM 100A (Thorlabs, Newtown, NJ, USA). Po zakończeniu naświetlania, PBS został usunięty ze studzienek, dodano 1 cm³ medium zawierającego 10% FBS i czerwień fenolową. Komórki inkubowano ponownie 24 h. Przeżywalność komórek oceniano testem Alamar Blue. Komórki inkubowane z medium lub medium z 0,5% zawartością DMSO, służyły jako kontrola. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki badania fotocytotoksyczności ftalocyjanin **Pc1-4** w formie wolnej i liposomalnej przedstawiono w Tabeli 49.

Tabela 49 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności jasnej ftalocyjanin **Pc1-4** w formie wolnej (Pc) i liposomalnej (lipPc)

Związek	Stężenie ftalocyjaniny [μM]	HSC-3		H413	
		Pc	lip Pc	Pc	lip Pc
Pc1	0,01	bb*	bb	98,0 ± 5,6	bb
	0,1	10,8 ± 2,3	12,4 ± 2,9	91,2 ± 7,2	bb
	0,5	bb	bb	11,6 ± 1,2	bb
	1,0	1,4 ± 1,1	4,3 ± 0,8	bb	bb
	10,0	2,4 ± 2,7	1,9 ± 0,9	bb	bb
Pc2	0,1	86,5 ± 3,7	91,0 ± 0,9	97,0 ± 9,8	81,3 ± 9,9
	1,0	90,3 ± 0,3	100,3 ± 5,6	97,4 ± 8,2	94,3 ± 1,9
	10,0	98,8 ± 3,3	95,2 ± 5,1	89,7 ± 9,3	75,3 ± 0,9
Pc3	0,1	95,3 ± 3,9	102,3 ± 8,8	102,1 ± 9,4	95,6 ± 2,3
	1,0	95,9 ± 1,1	103,5 ± 2,0	114,3 ± 3,4	96,1 ± 3,7
	10,0	94,2 ± 0,2	105,8 ± 2,9	80,8 ± 9,1	92,8 ± 6,6
Pc4	0,1	99,1 ± 6,8	98,4 ± 3,9	85,6 ± 2,1	104,4 ± 6,9
	1,0	94,4 ± 4,2	80,0 ± 9,1	82,1 ± 9,1	99,5 ± 8,9
	10,0	100,3 ± 7,4	87,5 ± 7,8	74,7 ± 6,1	92,2 ± 4,7

*bb – brak badań

Tabela 50 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności ciemnej i jasnej dla kontroli 0,5% DMSO i liposomów bez inkorporowanych ftalocyjanin.

Kontrola	HSC-3		H413	
	toksyczność ciemna	toksyczność jasna	toksyczność ciemna	toksyczność jasna
kontrola 0,5% DMSO	100,7 ± 2,3	93,8 ± 4,5	104,2 ± 4,6	100 ± 2,9
PG:POPC	99,7 ± 3,3	107,3 ± 9,5	105,5 ± 2,5	96,7 ± 9,5
PG:POPC:chol	99,1 ± 3,5	95,4 ± 0,6	bb	bb
DOTAP:POPC	109,5 ± 8,8	94,6 ± 2,6	bb	bb
DOTAP:POPC:chol	102,7 ± 0,5	93,4 ± 6,7	bb	bb

*bb – brak badań

9.6. Internalizacja komórkowa

W celu zbadania stopnia internalizacji fotouczulaczy **Pc1-4** z komórkami HSC3, zastosowano zmodyfikowaną metodę zaprezentowaną przez Lau i wsp. [209].

Komórki HSC3 o konfluencji ok. 80% posiano do 48-dołkowych płytek do hodowli komórkowych (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA), w gęstości $1,8 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium. Komórki inkubowano 24 h w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO₂. Następnego dnia usunięto medium i komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS o obj. 0,5 cm³, dodano 1 cm³ medium pozbawionego FBS i czerwieni fenolowej, zawierające fotouczulacz **Pc1-Pc4** o stężeniu 10 μM, za wyjątkiem kontroli. Komórki inkubowano w czasie od 30 min. do 5 h. Po upływie określonego czasu, medium usuwano, a komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS o obj. 0,5 cm³. Komórki HSC3 poddano następnie trypsynizacji przez ok. 5 min., a uzyskaną zawiesinę komórek przeniesiono do fiolki typu Eppendorf, przepłukując każdą studzienkę dwukrotnie 0,25 cm³ PBS w celu przeniesienia maksymalnej liczby komórek i rozcieńczenia trypsyny. Zawiesinę komórek odwirowano w czasie 3 min. przy obrotach 2400 rpm. Supernatant zdekantowano z nad osadu komórek i przepłukano dwukrotnie 0,5 cm³ PBS. Następnie osad komórek poddano 20 min. sonikacji z dodatkiem 0,5 cm³ DMF i ponownie odwirowano. Supernatant przeniesiono do kuwety kwarcowej i mierzono wartość absorbancji przy długości fali, odpowiadającej maksimum absorpcji pasma Q ftalocyjaniny **Pc1-4** w DMF, wobec odnośnika uzyskanego ze studzienki kontrolnej. Stężenie

fotoczulacza **Pc1-4** oznaczono wykorzystując krzywą wzorcową $A=f(c)$, wyznaczoną metodą najmniejszych kwadratów.

9.7. Wizualizacja wewnątrzkomórkowa

Wizualizację wewnątrzkomórkową fotoczulaczy w komórkach HSC3 wykonano metodą mikroskopii fluorescencyjnej (powiększenie obiektywu 20x). Komórki HSC3 o konfluencji ok. 80% posiano do 48-dołkowych płytek do hodowli komórkowych (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA), w gęstości $1,8 \cdot 10^5/\text{cm}^3$ medium. Komórki inkubowano 24 h w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze o 5% zawartości CO₂. Następnego dnia usunięto medium, komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS o obj. 0,5 cm³ i dodano 1 cm³ medium pozbawionego FBS i czerwieni fenolowej, zawierającego fotoczulacz **Pc1-Pc4** o stężeniu 10 μM (za wyjątkiem kontroli). Po upływie 24 h usuwano medium, komórki ponownie przemyto dwukrotnie roztworem PBS o obj. 0,5 cm³ i dodano roztwory markerów fluorescencyjnych w PBS. Komórki inkubowano ok 10-15 min., następnie usunięto roztwory markerów i dodano 0,5 cm³ PBS. Znaczniki fluorescencyjne barwiące określone organella komórkowe w żywych komórkach HSC3 zastosowano w celu zaobserwowania wewnątrzkomórkowej lokalizacji fotoczulacza. MitoTracker Green FM (Invitrogen Ltd, UK) w stężeniu 20 nM wykorzystano do wybarwienia aktywnych mitochondriów, natomiast 16 μM barwnik Hoechst'a posłużył do znakowania jąder komórkowych. Obserwowano czerwoną fluorescencję badanych związków stosując filtr Chroma 49006, zieloną dla Mitotracker Green FM stosując potrójny filtr Chroma 61002, a niebieską dla barwnika Hoechst'a zwizualizowano filtrem ET DAPI Chroma 49000 (Chroma Technology Corp, USA).

9.8. Analiza statystyczna

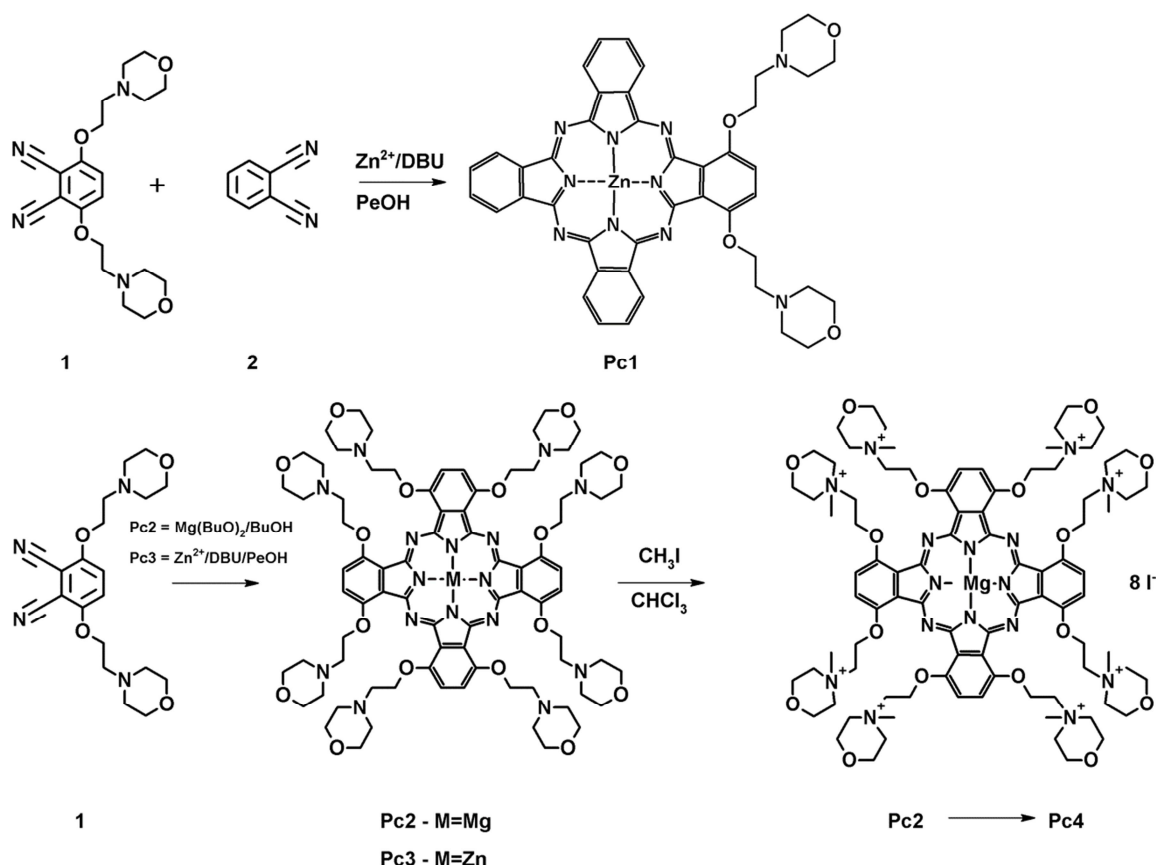
Wyniki obejmujące badania biologiczne przedstawiano jako wartość średnią, obliczoną z trzech pomiarów (\pm odchylenie standardowe). Różnice wartości średnich porównano testem t-Studenta ($p < 0,05$) z zastosowaniem oprogramowania StatView (*BrainPower Inc., Calabas, CA*).

VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Fotouczulacze to związki posiadające zdolność absorpcji promieniowania o specyficznej długości fali, a następnie przeniesienia uzyskanej energii na inne molekuly. Proces ten stanowi podstawowy mechanizm przemian fotodynamicznych i determinuje efekt leczniczy uzyskiwany w terapii fotodynamicznej. Fotouczulacze wykorzystywane w PDT to związki pochodzenia naturalnego (np. PPIX, hiperycyny) oraz uzyskiwane syntetycznie porfirynoidy, tj. pochodne porfiryn, chloryn, ftalocyjanin i porfirazyn [3]. Wiele niekorzystnych właściwości związków fotouczulających pierwszej generacji, przyczyniło się do sformułowania cech idealnego fotouczulacza oraz intensyfikacji badań mających na celu otrzymanie związków spełniających większość z określonych kryteriów [22]. Ftalocyjaniny jako związki o silnej absorpcji promieniowania w zakresie 600-800 nm, oraz wykazujące możliwość modyfikacji w części centralnej i peryferyjnej, cieszą się szczególnym zainteresowaniem naukowców [188].

Materiałem do badań w przedstawionej pracy były ftalocyjaniny **Pc1-4**, posiadające ugrupowania morfolinoetoksylowe w pozycji nieperyferyjnej α . Są to związki autorskie, zsyntetyzowane i udostępnione do badań przez Pracowników Katedry Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [210]. Substratem wyjściowym do syntezy ftalocyjanin był dinitryl, 3,6-di[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]-1,2-dicyjanobenzen (**1**). W reakcji cyklizacji dinitrylu (**1**) oraz 1,2-dicyjanobenzenu (**2**), uzyskano ftalocyjaninę **Pc-1** z jonem cynku(II) w centrum koordynacyjnym. Natomiast ftalocyjaniny z ośmioma podstawnikami morfolinoetoksyłowymi, tj. **Pc-2** oraz **Pc-3** posiadające wbudowane jony, odpowiednio magnezu(II) lub cynku(II) w części centralnej, zostały zsyntetyzowane w reakcji makrocyklizacji Linstead'a. Ftalocyjaninę **Pc-2** poddano działaniu jodku metylu i uzyskano ftalocyjaninę **Pc-4** w postaci czwartorzędowej soli. Podstawowe reakcje prowadzące do otrzymania ftalocyjanin **Pc1-4** przedstawiono na Ryc. 138. Związki zostały wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej i oczyszczone metodą klasycznej chromatografii kolumnowej, a następnie ich tożsamość została potwierdzona metodami analitycznymi, takimi jak: spektroskopia UV-Vis, ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz spektrometria mas [210]. Morfolina i jej pochodne to grupa związków heterocyklicznych, występujących w substancjach biologicznie czynnych pochodzenia naturalnego, które są wykorzystywane w procesie otrzymywania wielu leków o zróżnicowanym działaniu terapeutycznym jak np. reboksetyna, aprepitant, linezolid [211–213].

W piśmiennictwie można spotkać doniesienia dotyczące ftalocyjanin z ugrupowaniami morfolinowymi, m. in. Roncucci i wsp. [214] zaproponowali szereg struktur zawierających w centrum koordynacyjnym jony cynku(II) oraz podstawniki morfolinowe w pozycjach peryferyjnych (β) i nieperyferyjnych (α). Natomiast Zhu i wsp. [215] jako pierwsi, przeprowadzili syntezę ftalocyjaniny krzemowej (SiPc), z dwoma ligandami morfolinowymi koordynującymi apikalnie do atomu krzemu, co umożliwiło otrzymanie związków wykazujących lepszą rozpuszczalność w wodzie oraz zmniejszoną tendencję formowania agregatów.



Ryc. 138 Schemat przedstawia syntezę ftalocyjanin **Pc1-Pc4**, przeprowadzoną przez Pracowników Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, PeOH – 1-pentanol, $\text{Mg}(\text{BuO})_2$ – 1-butanolan magnezu, BuOH – 1-butanol) [210].

Ftalocyjaniny **Pc1-4**, zostały poddane badaniom weryfikującym ich potencjalne zastosowanie jako fotouczulaczy w PDT. Z tego względu właściwości fotochemiczne i fotodynamiczne ftalocyjanin **Pc1-4**, analizowano uwzględniając kryteria zdefiniowane dla idealnego fotouczulacza. Optymalny fotouczulacz powinien być związkiem o znanej, ściśle określonej i potwierdzonej strukturze chemicznej oraz wysokim stopniu czystości, wymaganym od substancji leczniczych. Dlatego charakterystykę badanych związków

Pc1-4, rozpoczęto od oceny czystości chemicznej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Ustalenie i opracowanie warunków analizy chromatograficznej ftalocyjanin i innych porfirynoidów jest zadaniem trudnym, z uwagi na silne oddziaływanie makrocykla z niepolarnymi fazami stacjonarnymi oraz ograniczoną rozpuszczalność w rozpuszczalnikach polarnych [216]. Zagadnieniem optymalizacji metody HPLC z przeznaczeniem do analizy porfirynoidów, zajmowała się m.in. Brykina i wsp. [217], wykazując, że retencja i inne parametry chromatograficzne ftalocyjanin zależą od rodzaju makrocykla, rodzaju i liczby podstawników alifatycznych, jonu metalu w centrum koordynacyjnym. Podobne wnioski wynikają także ze szczegółowej analizy tego zagadnienia, przeprowadzonej przez Uvarovą i wsp. [218], którzy omówili wpływ wielu czynników m.in. budowy cząsteczki ftalocyjanin, rodzaju fazy stacjonarnej i ruchomej oraz temperatury na wynik analizy chromatograficznej.

Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej ftalocyjanin **Pc1-3**, polegała na wyborze odpowiedniej fazy stacjonarnej oraz składu i szybkości przepływu fazy ruchomej. Rozdział chromatograficzny prowadzono w odwróconym układzie faz (RP), wykorzystując jako fazę stacjonarną zmodyfikowany żel krzemionkowy z grupami oktadecylosilanowymi, podobnie jak zaproponowała Brykina i wsp. [217]. W odniesieniu do związków **Pc1-3** zastosowano elucję gradientową, ze względu na możliwość występowania w otrzymanych próbkach nie tylko ftalocyjanin morfolinoetoksylowych, ale także zanieczyszczeń poreakcyjnych o zróżnicowanej polarności. Ponadto zawartość każdej z ftalocyjanin **Pc1-3**, oceniano stosując trzy rodzaje fazy ruchomej, których skład przedstawiono w Tabelach 3-5, 9-11, 15-17. Jak przedstawiają zamieszczone na Ryc. 10-27 chromatogramy, otrzymane z zastosowaniem faz ruchomych o różnym składzie, w wyniku rozdziału roztworów ftalocyjanin, uzyskano zróżnicowane parametry chromatograficzne (czas retencji, liczba pików). Stopień czystości ftalocyjanin **Pc1-3**, wyrażono jako procent powierzchni pików na chromatogramie, w odniesieniu do sumarycznej powierzchni wszystkich pików. Wyniki zamieszczone w Tabelach 6-8, 12-14, 18-20, wskazują, że zawartość ftalocyjanin **Pc1-3** w próbkach otrzymanych do badań, wynosiła ponad 95%. Uzyskany wysoki stopień czystości potencjalnych fotouczulaczy jest właściwością bardzo korzystną, odpowiadającą wymaganiom farmakopealnym. Metoda HPLC jest jedną z metod farmakopealnych stosowaną w przemyśle farmaceutycznym, do oceny stopnia czystości oraz tożsamości substancji leczniczych i pomocniczych. Na przykład w monografii verteporfinu w Farmakopei Amerykańskiej (USP), wymagana

zawartość substancji powinna być zawarta w granicach 94-102% [219], a jedną z zalecanych technik analitycznych jest RP-HPLC.

Wymóg dostarczania związków porfirynoidowych wysokiej czystości, zarówno w dziedzinach medycznych, jak i technologicznych, sprawia, że metoda HPLC jest szeroko stosowana do kontrolowania i oceny właściwości nowych związków fotouczulających. Mieszanina poreakcyjna otrzymywana podczas syntezy ftalocyjanin, może zawierać formy izomeryczne porfirynoidu, a jedną z zalet metody jest możliwość zastosowania HPLC do rozdzielenia powstałych izomerów. Na przykład Sommerauer i wsp. [220] opracowali metodę HPLC, wykorzystującą oddziaływania π - π do rozdzielenia izomerów alkoksylowych ftalocyjanin. W grupie technik chromatograficznych stosowanych do izolacji porfirynoidów, podkreśla się istotną rolę metod preparatywnych i półpreparatywnych [218]. HPLC jest także jedną z podstawowych metod wykorzystywanych w badaniach farmakokinetycznych, m.in. Oliveir'a i wsp. [221] zaproponowali HPLC z zastosowaniem detekcji fluorescencyjnej do oznaczania stężenia ftalocyjaniny glinowej, w osoczu i tkankach.

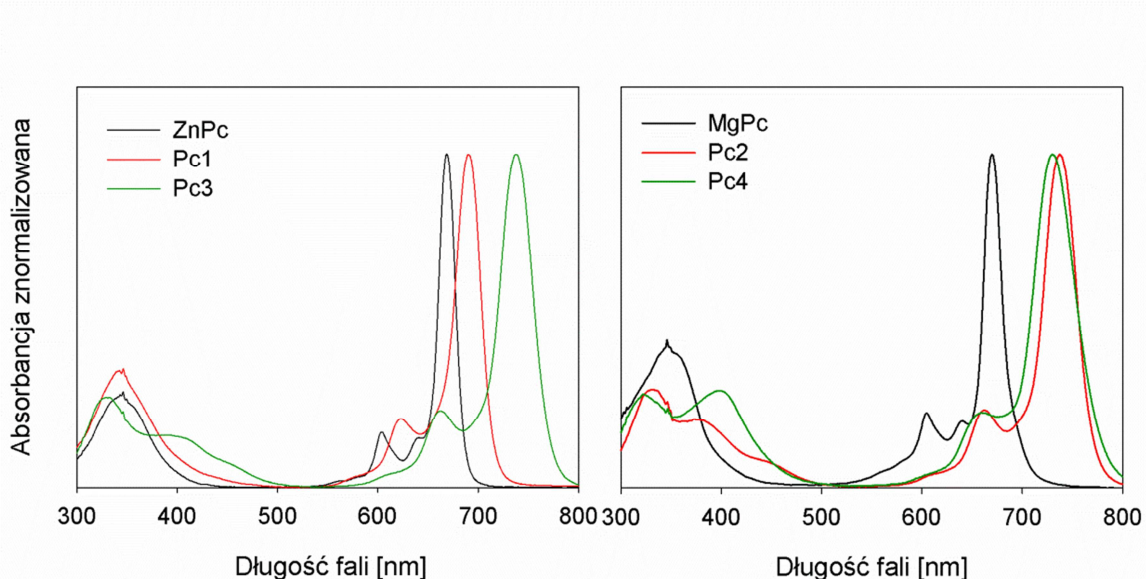
Kolejną ważną właściwością idealnego fotouczulacza jest zdolność silnej absorpcji światła czerwonego, a optymalny zakres obejmujący maksimum pasma Q, powinien znajdować się w przedziale 650-800 nm, aby zapewnić maksymalną zdolność penetracji tkanek i zminimalizować zjawisko rozpraszania światła [8]. Dlatego też kolejny etap badań, dotyczył analizy właściwości spektralnych pochodnych **Pc1-4**. Widmo absorpcyjne ftalocyjanin ściśle odzwierciedla strukturę elektronową i cząsteczkową związków, dzięki czemu spektroskopia UV-Vis stanowi podstawowe narzędzie analityczne, wykorzystywane w chemii ftalocyjanin, zarówno na etapie syntezy, jak też analizy [2]. Powstanie elektronowego widma absorpcji ftalocyjanin, związane jest z przejściami elektronów walencyjnych (σ i π) oraz wolnych par elektronowych (n). W wyniku wzbudzenia elektronów, następuje przejście z molekularnych orbitali wiążących (σ , π) na orbitale antywiązące (σ^* , π^*) o wyższej energii. W przypadku ftalocyjanin będących kompleksami metali d-elektronowych, w widmie absorpcji można zaobserwować pasma przejść $d \rightarrow d$ dla chromoforów d-d oraz przejść $d \rightarrow \pi$, w przypadku wzajemnego oddziaływania elektronów d jonu metalu z elektronami π ligandu (CT, ang. charge transfer) [222]. Przejścia typu charge transfer odpowiadają przejściom elektronów od ligandów do kationów metali (LMCT, ang. ligand to metal charge transfer) lub odwrotnie, od kationów metali do ligandów (MLCT, ang. metal to ligand charge transfer). Przejścia tego typu są

możliwe, gdy kation metalu zawierający elektrony d , może występować na zmiennych stopniach utlenienia, różniących się o jednostkę. Pasma przejść CT pojawiają się w zakresie 250-900 nm [223].

Jak zobrazowano na Ryc. 28-31, elektronowe widma absorpcji ftalocyjanin **Pc1-4**, posiadają właściwości charakterystyczne dla widm absorpcji tego rodzaju związków, z pasmem Soret'a o niskiej intensywności w zakresie krótkofalowym 300-400 nm, oraz intensywnym pasmem Q w regionie fal dłuższych 680-760 nm. Dodatkowo w sąsiedztwie pasma Q ftalocyjanin **Pc1-4**, można zaobserwować pasmo o bardzo niskiej intensywności, które przypisuje się wibracjom cząsteczki i opisuje jako Q_{vib} [222]. Jak przedstawiono w Tabelach 21-24, ftalocyjaniny **Pc1-4** absorbują promieniowanie szczególnie intensywnie w zakresie 685-755 nm i posiadają wysokie współczynniki molowe absorpcji rzędu 10^5 - 10^6 . Pasma absorpcji Q i Soret'a ftalocyjanin, powstają w wyniku przeniesienia elektronów w obrębie orbitali $\pi \rightarrow \pi^*$, do stanu S_1 i S_2 . Pasma Q powstaje w wyniku przejścia dozwolonego π (a_{1u} , HOMO) $\rightarrow \pi^*$ (e_g , LUMO), natomiast pasmo Soret'a w wyniku przejścia π (a_{2u} , HOMO) $\rightarrow \pi^*$ (e_g , LUMO). Znaczne oddzielenie pasma Q i Soret'a w widmie ftalocyjanin, wynika z różnicy energii pomiędzy orbitalami a_{1u} i a_{2u} , spowodowanej obecnością mostków azowych w strukturze ftalocyjanin [222]. Pierścień makrocycliczny niepodstawionej ftalocyjaniny, można rozpatrywać jako anion dwuwartościowy, o symetrii cząsteczki D_{2h} , co w widmie UV-Vis odzwierciedla rozszczerzone pasmo Q. W wyniku inkorporacji jonu metalu, następuje termodynamiczna stabilizacja układu, czemu towarzyszy wzrost symetrii cząsteczki (D_{4h}) [2]. W widmach elektronowych pasma Q ftalocyjanin **Pc1-4**, zaobserwować można bardzo ostre, intensywne i pojedyncze pasmo Q, co świadczy o symetrycznej strukturze związków. Ftalocyjanina **Pc1** w porównaniu do ftalocyjanin **Pc2-4**, charakteryzuje się obniżoną symetrią.

Oddziaływania ligandu z kationem metalu typu charge transfer, wpływają na kształt pasma Soret'a [2]. Związki **Pc1-4** posiadają w centrum koordynacyjnym dwuwartościowe jony cynku Zn(II) lub magnezu Mg(II), odpowiednio dla ftalocyjanin **Pc1** i **Pc3** oraz **Pc2** i **Pc4**. Cynk należy do grupy metali przejściowych, posiada konfigurację elektronów walencyjnych $3d^{10}4s^2$, a więc wypełnione orbitale walencyjne (ang. closed-shell metal ion), dlatego ftalocyjaniny zawierające jony Zn(II), w tym także **Pc1** i **Pc3**, nie wykazują efektu CT [224]. Efektu CT również nie obserwuje się w przypadku porfirynoidów zawierających jony berylowców, do których należy magnez [2], co ma miejsce w odniesieniu do **Pc2** i **Pc4**.

Maksimum absorpcji niepodstawionych ftalocyjanin koordynujących jony typu closed-shell, jak Mg(II) lub Zn(II), jest zlokalizowane ok. 670 nm. Jak można zaobserwować na Ryc. 139, widma absorpcji ftalocyjanin **Pc1** i **Pc3** oraz **Pc2** i **Pc4**, wykazują batochromowe przesunięcie maksimów absorpcji względem niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej (**ZnPc**) i magnezowej (**MgPc**). Dla ftalocyjanin zawierających jony cynku(II) oraz dwa (**Pc1**) lub osiem podstawników morfolinoetoksylowych (**Pc3**), przesunięcie pasma Q wynosi odpowiednio 23 i 70 nm. Natomiast maksimum absorpcji ftalocyjanin **Pc2**, **Pc4**, tj. posiadających jony magnezu(II) oraz osiem podstawników morfolinoetoksylowych, uległo przesunięciu odpowiednio o 70 i 62 nm, względem związku niepodstawionego (**MgPc**).



Ryc. 139 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjanin w roztworach DMF. Lewy panel: **ZnPc** - niepodstawiona ftalocyjanina cynkowa. Prawy panel: **MgPc** - niepodstawiona ftalocyjanina magnezowa.

Zgodnie z doniesieniami wielu autorów, znaczne przesunięcie batochromowe pasma Q, następuje wskutek podstawienia pozycji nieperyferyjnych α ftalocyjanin, ugrupowaniami posiadającymi heteroatomy o właściwościach elektronodonorowych [2,225,226]. Wykazano m.in., że w przypadku oktaalkoksylowych pochodnych ftalocyjanin, w wyniku wprowadzenia ośmiu podstawników w pozycje peryferyjne i nieperyferyjne pierścienia makrocyclicznego, następuje obniżenie energii pasma Q, które ulega przesunięciu o ok. 60-90 nm [2]. Zaobserwowany efekt batochromowy w widmach elektronowych analizowanych ftalocyjanin **Pc1-4**, przypisać można obecności grup alkoksylowych, który może być dodatkowo nasilony ze względu na charakter elektronodonorowy grupy morfolinowej, posiadającej właściwości drugorzędowej aminy. Wpływ grup aminowych na przebieg widma różnych pochodnych ftalocyjaniny, był analizowany przez zespół

Lukyanets`a [2], który podaje że, podstawniki aminowe i dialkiloaminowe w pozycji *orto* ftalocyjanin, wywierają jeszcze silniejszy efekt na przesunięcie pasma Q w obszar fal dłuższych.

Istotnym problemem większości ftalocyjanin jest hydrofobowy charakter i ograniczona rozpuszczalność [188]. Idealny fotouczulacz powinien rozpuszczać się w środowisku polarnym, najlepiej w środowisku wodnym, oraz w rozpuszczalnikach wykorzystywanych do sporządzania leków. Zdolność solubilizacji fotouczulaczy stanowi kluczowy aspekt opracowania i przygotowania postaci farmaceutycznej [22,25]. Z tego względu w celu uzyskania pochodnych o lepszym profilu rozpuszczalności, ftalocyjaniny poddawane są różnym modyfikacjom w obrębie części centralnej, jak również zewnętrznej pierścienia. Szczególną rolę w poprawie właściwości solubilizacyjnych ftalocyjanin, można uzyskać wprowadzając do cząsteczki porfirynoidów peryferyjne i nieperyferyjne podstawniki. Z doniesień literaturowych m.in. Ogunsipe i wsp. [202] wynika, że obecność podstawników prowadzi do zwiększenia odległości pomiędzy płaszczyznami pierścienia, wpływa na rozmieszczenie elektronów π , ułatwia solwatację, a tym samym zwiększa zdolności solubilizacyjne fotouczulaczy. Analogiczne zależności można zauważyć także w przypadku analizowanych morfolinoetoksyłowych ftalocyjanin **Pc1-4**. Porównując związki zawierające dwa (**Pc1**) oraz osiem podstawników (**Pc3**), zauważono, że ze wzrostem liczby podstawników, wzrasta zdolność rozpuszczania w rozpuszczalnikach polarnych. Natomiast w wyniku przekształcenia **Pc2** w czwartorzędową sól amoniową, otrzymano pochodną **Pc4**, która bardzo dobrze rozpuszczała się jedynie w rozpuszczalnikach polarnych. Ciekawym przypadkiem jest zachowanie **Pc4** w DMSO, co może wynikać z właściwości koordynacyjnych tego rozpuszczalnika. Zdolność solubilizacji ftalocyjanin zależy od rodzaju jonu centralnego, np. rozpuszczalniki o właściwościach koordynacyjnych, koordynują apikalnie do jonu cynku(II) i magnezu(II), co przyczynia się do wzrostu rozpuszczalności ftalocyjanin [2].

W licznych badaniach poświęconych ftalocyjaninom i innym porfirynoidom, podkreśla się wpływ różnych rozpuszczalników na elektronowe widma absorpcji [227,228]. Zmiany położenia, niekiedy także intensywności pasm absorpcji w widmie UV-Vis, generowane polarnością rozpuszczalnika, określa się terminem solwatochromizmu. Wyróżnia się solwatochromizm negatywny, gdy ze wzrostem polarności rozpuszczalnika, pasmo ulega przesunięciu w kierunku krótszych fal (efekt hipsochromowy). Natomiast, solwatochromizm pozytywny występuje, gdy wzrastającej polarności rozpuszczalnika towarzyszy przesunięcie batochromowe [229]. Analizując elektronowe widma absorpcji

roztworów ftalocyjanin **Pc1-4**, w rozpuszczalnikach o różnej polarności, obserwowano zmiany położenia maksimum oraz intensywności pasma Q, a niekiedy także ich kształtu. Stwierdzone różnice wynikają z fizycznych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami fotouczulacza i rozpuszczalnika, które powodują zmianę energii pomiędzy stanem podstawowym, a wzbudzoną cząsteczki [229]. Analizując dane zamieszczone w Tabeli 29 oraz widma absorpcji ftalocyjaniny **Pc4**, przedstawione na Ryc. 35, można zauważyć, że wzrost polarności rozpuszczalnika powoduje przesunięcie maksimum pasma Q w kierunku fal dłuższych. W związku z powyższym można stwierdzić, że ftalocyjanina **Pc4** wykazuje zjawisko solwatochromizmu pozytywnego. W odniesieniu do pozostałych badanych ftalocyjanin **Pc1-3**, nie zauważono zależności pomiędzy położeniem maksimum pasma Q a polarnością rozpuszczalnika. Natomiast w widmach absorpcji wszystkich ftalocyjanin (**Pc1-4**), obserwowano znaczne przesunięcie pasma Q w kierunku fal dłuższych, w rozpuszczalnikach o silnych właściwościach koordynujących, takich, jak np. DMSO czy pirydyna.

Wpływ rozpuszczalnika na przebieg widma absorpcji, dostarcza informacji dotyczących oddziaływania substancji rozpuszczonej z cząsteczkami rozpuszczalnika [229]. W odniesieniu do badanych ftalocyjanin **Pc1-4**, ten rodzaj zależności analizowano metodą graficzną. W interpretacji efektów solwatochromowych wykorzystano założenia metody Bayliss'a i McRae, dotyczące oddziaływania cząsteczek niepolarniej substancji z rozpuszczalnikami o zróżnicowanej polarności [198]. W celu oceny powyższych zależności, zastosowane rozpuszczalniki podzielono na dwie grupy, przyjmując jako kryterium podziału wartość stałej dielektrycznej ϵ . Do rozpuszczalników niepolarnych zaliczono takie, których wartość stałej dielektrycznej wynosiła $\epsilon < 15$, natomiast dla polarnych przyjęto wartość $\epsilon > 15$ [199]. W roztworach ftalocyjanin w rozpuszczalnikach niepolarnych i polarnych, oddziaływania międzycząsteczkowe wynikają z istnienia dyspersyjnych sił Londona. Zakłada się, że tego rodzaju oddziaływania odpowiadają za proces solwatacji cząsteczek ftalocyjanin oraz niewielkie przesunięcia batochromowe pasma Q [229]. Bayliss i McRae przyjęli założenie, że wielkość przesunięcia batochromowego substancji niepolarnych zależy przede wszystkim od współczynnika refrakcji rozpuszczalnika (n), co graficznie zostało opisane parametrem (F), zgodnie z równaniem $F_n = (n^2 - 1)(2n^2 + 1)$ [198, 199, 229]. Yousaf i wsp. analizując analogiczne zależności w odniesieniu do rozpuszczalników polarnych, dodatkowo uwzględnili wartość stałej dielektrycznej, zgodnie z wyrażeniem $F_p = (n^2 - 1)(2n^2 + 1) + 2(\epsilon - 1)(2\epsilon + 1)/\epsilon$ [199, 200].

W przeprowadzonych badaniach w ocenie wpływu rozpuszczalników niepolarnych na widmo ftalocyjanin **Pc1-4**, korzystano z zależności Bayliss'a i McRae. Natomiast w odniesieniu do rozpuszczalników polarnych, uwzględniono parametr F_p zaproponowany przez Yousafa'a i wsp. Jak wynika z Ryc. 39 i 41, zależność $v_{\max}=f(F_p)$, wyznaczona dla roztworów ftalocyjanin **Pc2** i **Pc3** w rozpuszczalnikach polarnych, wykazuje wysoki współczynnik korelacji, tj. powyżej 0,970. Oznacza to, że przesunięcie maksimum pasma Q ftalocyjanin **Pc2** i **Pc3**, w tego rodzaju rozpuszczalnikach, jest uwarunkowane przewagą efektów solwatacyjnych nad koordynacyjnymi. Jak podano na Ryc. 36, 37, 40, mniejszą korelację ($r > 0,800$) uzyskano dla **Pc1**, zarówno w rozpuszczalnikach niepolarnych, jak i polarnych oraz w przypadku **Pc2** i **Pc3** w środowisku niepolarnym. Nie zaobserwowano natomiast liniowej zależności przesunięcia pasma Q, od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\varepsilon-1)(2\varepsilon+1))/\varepsilon$ dla czwartorzędowej soli **Pc4**. W tym przypadku brak korelacji może być spowodowany silniejszymi niż siły dyspersyjne, oddziaływaniami pomiędzy polarnym rozpuszczalnikiem, a cząsteczką obdarzoną ładunkiem dodatnim (Ryc. 42).

W odniesieniu do wielu ftalocyjanin obserwowano tendencję do formowania agregatów, szczególnie w rozpuszczalnikach o charakterze polarnym [230–232]. Agregacja jest zjawiskiem niekorzystnym w przypadku fotouczulaczy, ponieważ zmniejsza zdolność generowania tlenu singletowego, a także może wpływać na parametry farmakokinetyczne [165,168]. Dlatego idealny fotouczulacz powinien agregować w ograniczonym stopniu. Niemniej jednak zjawisko agregacji ftalocyjanin i innych porfirynoidów, jest również przedmiotem wielu badań, ponieważ agregaty wykazują unikalne właściwości spektralne, cenne z punktu widzenia nauki i technologii. Agregaty stanowią formę przejściową pomiędzy strukturą cząsteczkową a ciałem stałym, dlatego znajdują zastosowanie jako materiały mezoskopowe. Ponadto mogą być wykorzystane w fotoelektronice, do otrzymywania układów biofotonowych, urządzeń do przechowywania informacji, czy warstw Langmuira-Blodgett dla optyki nieliniowej [232].

Zwykle wyróżnia się trzy typy agregatów formowanych przez związki porfirynoidowe, w tym także ftalocyjaniny, tj. agregaty typu J, agregaty typu H i agregaty niespecyficzne [230]. Szczególna tendencja ftalocyjanin do tworzenia agregatów, jest skutkiem intensywnych oddziaływań płaskich pierścieni, posiadających zdelokalizowane elektrony π . Formowanie struktur zagregowanych wynika z istnienia sił van der Waalsa, oddziaływań typu π i wpływu rozpuszczalnika [231]. Tworzenie aglomeratów jest przede wszystkim rezultatem ograniczonej rozpuszczalności [232,233]. W przypadku

analizowanych związków **Pc1-4**, do wykazania obecności form zagregowanych wykorzystano metodę spektroskopową. W tym celu przeanalizowano elektronowe widma absorpcji, wykreślone dla ftalocyjanin **Pc1-4**, w rozpuszczalnikach o zróżnicowanych właściwościach (Tabela 25).

W odniesieniu do ftalocyjaniny **Pc1**, obserwowano zwiększoną tendencję do agregacji w rozpuszczalnikach polarnych. Jak przedstawiają Ryc. 43-58, w zakresie 683-696 nm pojawia się ostre, intensywne pasmo Q. Natomiast, pasmo występujące przy długości fali ok. 620 nm, przypisano wibracjom cząsteczki (Q_{vib}). Widmo ftalocyjaniny **Pc1** w wodnym roztworze DMSO, wykazywało szerokie pasmo Q o niskiej intensywności, posiadające $\lambda_{max} = 647$ i 695 nm (Ryc. 28). Sessler i wsp. oraz Bıyıklıoğlu i wsp. wyjaśniają, że szerokie pasmo Q powstaje w następstwie formowania agregatów typu H [231,234].

Kolejnym etapem oceny właściwości agregacyjnych ftalocyjanin **Pc1-4**, była analiza zależności wynikającej z prawa Lamberta-Beer'a. Analiza istotności parametru b, opisującego graficzną zależność $A=f(c)$ dla ftalocyjaniny **Pc1** w toluenie, trietyloaminie, chloroformie, izopropanolu, acetonie, metanolu i acetonitrylu (Tabela 30), sugeruje obecność form zagregowanych w roztworach. Jednocześnie śledząc przebieg widm roztworów **Pc1** w wymienionych rozpuszczalnikach (Ryc. 44,47,52-54,56), nie stwierdzono wyraźnego poszerzenia pasma Q, a jedynie zmniejszenie intensywności. Natomiast widmo **Pc1** w rozpuszczalnikach o właściwościach koordynujących, np. pirydynie, DMF (Ryc. 51, 55), wykazuje obecność bardzo intensywnego pasma Q. Należy jednocześnie podkreślić, że zaobserwowano znaczne nasilenie barwy ftalocyjaniny **Pc1** w rozpuszczalnikach koordynujących.

Ftalocyjaniny **Pc2** (Ryc. 59-74, Tabela 31) i **Pc3** (Ryc. 75-91, Tabela 32), zawierające osiem podstawników morfolinoetoksyłowych oraz odpowiednio jon magnezu(II) i cynku(II) w centrum koordynacyjnym, wykazywały podobną rozpuszczalność i zdolność agregacji. Stwierdzono, że **Pc2** i **Pc3** rozpuszczają się w większości zastosowanych rozpuszczalników i nie wykazują agregacji w rozpuszczalnikach o właściwościach koordynujących (TEA - Ryc. 61, Ryc. 77, DMSO - Ryc. 63, Ryc. 79, DMF - Ryc. 71, Ryc. 88, DMA - Ryc. 73, Ryc. 90), dioksanie - Ryc. 59, Ryc. 75 i wodzie - Ryc. 74, Ryc. 91. Ponadto w odniesieniu do **Pc2** nie stwierdzono agregacji w eterze dietylowym (Ryc. 62) i THF (Ryc. 66), a w przypadku **Pc3** także w pirydynie i izopropanolu (Ryc. 84, Ryc. 85). Brak agregacji **Pc2** i **Pc3**, szczególnie w rozpuszczalnikach o wysokiej polarności, jest bardzo korzystny z punktu widzenia PDT. W widmach absorpcji **Pc2** i **Pc3** w rozpuszczalnikach wykorzystanych do badań, maksimum absorpcji pasma Q znajduje

się w zakresie odpowiednio 730-761 nm i 729-751 nm. Na elektronowych widmach absorpcji niektórych roztworów **Pc2** i **Pc3** (m.in. w toluenie - Ryc. 60, Ryc. 76, chloroformie - Ryc. 64, Ryc. 80, dichlorometanie - Ryc. 67, Ryc. 83, acetonie - Ryc. 69, Ryc. 86, acetonitrylu - Ryc. 72, Ryc. 89), zauważono wykształcenie nowego pasma w sąsiedztwie pasma Q. To nowe pasmo zlokalizowane w rejonie długofalowym (ok. 800 nm), wykazywało największą intensywność w przypadku widm **Pc2** i **Pc3** w dichlorometanie (Ryc. 67, Ryc. 83). W oparciu o dane literaturowe, pasmo to przypisać można tworzeniu agregatów typu J. Huang i wsp. [235,236] wykazali, że α aryłowe i alkoksyłowe pochodne ftalocyjanin, posiadają zdolność tworzenia agregatów typu J, w rozpuszczalnikach niewykazujących właściwości koordynujących. W/w autorzy wykazali, że tak modyfikowane pochodne posiadają zdolność tworzenia struktur, w których jon centralny jednej cząsteczki ftalocyjaniny np. Zn(II), jest koordynowany przez atom tlenu, obecny w podstawniku cząsteczki sąsiedniej. Struktury te opisane zostały jako agregaty J i znacznie różnią się właściwościami od agregatów typu H. Jak podaje Niu i wsp. [232], w przypadku agregatów H płaszczyzny makrocykli różnych cząsteczek nakładają się wzajemnie bezpośrednio tworząc „stos” (face-to-face), natomiast ftalocyjaniny organizujące się w formy J, mają płaszczyzny przesunięte, przypominające strukturę schodów (side-to-side). Analizując widma ftalocyjanin **Pc2** i **Pc3**, powstawanie agregatów J zaobserwować można w roztworze dichlorometanu, jak również toluenu, chloroformu, acetonu i acetonitrylu, a ponadto w metanolu (Ryc. 70) dla **Pc2** i eterze dietylowym (Ryc. 78) dla **Pc3**. Należy podkreślić, że występowanie agregatów typu J, nie zawsze związane jest z odstępstwem od praw Lamberta-Beer’a. Ocena korelacji zależności $A=f(c)$, zamieszczona w Tabelach 31 i 32, dla roztworów **Pc2** i **Pc3** w chloroformie, nie wskazuje na obecność agregatów; jednak obserwowano zanik pasma związanego z obecnością agregatów J, wraz z rozcieńczaniem roztworów (Ryc. 64, Ryc. 80).

Przekształcenie ftalocyjanin w czwartorzędowe sole amoniowe, prowadzi do zwiększenia rozpuszczalności w środowisku polarnym [2]. **Pc4** praktycznie nie rozpuszcza się w środowisku niepolarnym, a zależność $A=f(c)$ wykazuje wysoką korelację dla roztworów w rozpuszczalnikach polarnych i DMSO (Ryc. 92-97, Tabela 33).

Kolejny etap pracy dotyczył oceny właściwości fotochemicznych i fotodynamicznych ftalocyjanin **Pc1-4**, która obejmowała analizę zdolności emisji promieniowania, generowania tlenu singletowego i fotostabilności.

Zdolność potencjalnych fotouczulaczy do emisji promieniowania ma wiele praktycznych zalet. Pomiar natężenia fluorescencji jest stosowany w badaniach przedklinicznych fotouczulaczy: (i) *in vitro* – do oceny działania na poziomie komórkowym oraz (ii) *in vivo* – w celu oceny selektywnego gromadzenia fotouczulacza w tkance docelowej oraz monitorowania PDT [13,171,180].

Zjawisko emisji promieniowania ftalocyjanin, jest jednym z procesów związanych ze zdolnością wzbudzonej cząsteczki do uczestniczenia w określonych rodzajach przejść elektronowych. Ocena właściwości fluorescencyjnych ftalocyjanin **Pc1-4**, obejmowała wykreślenie widm emisji w DMSO i DMF, po wzbudzeniu cząsteczki promieniowaniem z zakresu pasma Soret'a ($\lambda_{\text{max}}=325$ nm) i pasma Q_{max} . Wszystkie ftalocyjaniny **Pc1-4** wykazywały, typową dla tego rodzaju związków, czerwoną fluorescencję w zakresie 705-755 nm, a pasma fluorescencji były przesunięte w stronę długofalową względem pasm absorpcji. Jak przedstawiają Ryc. 98-105, widma absorpcji i emisji ftalocyjanin **Pc1-4** wzajemnie się nakładają. W przypadku widm absorpcji i emisji związków **Pc2** (Ryc. 100, Ryc. 101) i **Pc3** (Ryc. 102, Ryc. 103), wykreślonych w DMF i DMSO oraz **Pc1** (Ryc. 98) w roztworze DMSO, są one lustrzanymi odbiciami. Symetria lustrzana widma absorpcji i emisji ftalocyjaniny **Pc4** (Ryc. 104, Ryc. 105) oraz **Pc1** (Ryc. 99) w środowisku DMF jest zaburzona, co można tłumaczyć obecnością form zagregowanych [232]. Jak zaprezentowano w Tabeli 34 i 35, przesunięcia Stokes'a przyjmują niewielkie wartości, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika i wynoszą od $133\text{-}227\text{ cm}^{-1}$. Mała wartość przesunięcia maksimum fluorescencji względem maksimum absorpcji, wynika z niewielkiej różnicy energetycznej pomiędzy stanem podstawowym i wzbudzonym cząsteczek [222,237,238].

Kolejnym parametrem charakteryzującym właściwości emisyjne, jest wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_{F}), która zależy od stopnia i natury zjawiska agregacji, charakteru rozpuszczalnika i budowy wzbudzanych cząsteczek, pH, fotoindukowanego lub elektronowego transferu energii. Wydajność kwantową fluorescencji (Φ_{F}) ftalocyjanin **Pc1-4**, wyznaczono metodą porównawczą, stosując jako związek referencyjny ftalocyjaninę cynkową (ZnPc). Obliczone wartości Φ_{F} ftalocyjanin **Pc1-4**, przedstawione w Tabeli 36, potwierdzają założenia przedstawione przez Kobayashi i wsp. [239], którzy założyli, że podstawione ftalocyjaniny posiadające maksimum pasma fluorescencji przy długości fali $\lambda=750$ nm, charakteryzują się jednocześnie bardzo małą wartością Φ_{F} . Obserwacje przedstawione przez Kobayashi i wsp. znalazły potwierdzenie w uzyskanych wynikach. Oktamorfolinoetoksyłowe pochodne ftalocyjanin **Pc2**, **Pc3** i **Pc4**, których

pasmo fluorescencji położone jest ok. 750 nm, posiadały małe wartości Φ_F . Ponadto Kobayashi i wsp. wykazali, że podstawione ftalocyjaniny posiadające maksimum fluorescencji przy krótszych długościach fal, charakteryzuje większa wydajność kwantowa fluorescencji Φ_F . W tym przypadku także uzyskano potwierdzenie przedstawionych założeń. Natomiast porównanie wartości Φ_F wyznaczonych dla **Pc2** i **Pc3**, pozwoliło wykazać wpływ jonu metalu na wydajność kwantową fluorescencji. Pochodna magnezowa **Pc2** w porównaniu ze związkiem **Pc3**, charakteryzuje się, większą wartością Φ_F . Podobne zależności można odnaleźć w doniesieniach literaturowych [222]. Ftalocyjaniny demetalowane lub posiadające w centrum pierścienia jony metali należących do III okresu układu okresowego pierwiastków (np. Mg(II), Al(III)), charakteryzują się wysokimi wartościami wydajności kwantowej fluorescencji, w granicach 0,57-0,85, co uwarunkowane jest długim czasem życia fluorescencji (3,8-9,0 ns). Natomiast pochodne zawierające jony pierwiastków należących do IV okresu (Zn (II), Ga(IV)), charakteryzują się krótszym czasem życia fluorescencji (3,1-4,7 ns), co przekłada się na uzyskiwanie znacznie mniejszych wartości $\Phi_F = 0,3-0,37$ [222]. Wydajność kwantowa fluorescencji, zależy również od zdolności związku do dezaktywacji w wyniku przejścia międzysystemowego (ang. intersystem crossing), ze stanu S_1 do stanu T_1 . Obecność jonu metalu o właściwościach paramagnetycznych, np. Zn(II) zwiększa prawdopodobieństwo przejścia międzysystemowego, prowadząc do zmniejszenia Φ_F [2], co zaobserwowano w przypadku **Pc1** i **Pc3**. Jednocześnie wymienione związki, charakteryzują się wysoką wydajnością kwantową generowania tlenu singletowego. Duże różnice wydajności kwantowej fluorescencji Φ_F , wyznaczone w zależności od rozpuszczalnika (DMSO i DMF), uzyskano dla ftalocyjaniny dwupodstawionej **Pc1** i czwartorzędowej soli **Pc4**. W przypadku ftalocyjaniny **Pc1** bardzo duża wartość Φ_F uzyskana w DMSO, może wynikać ze specyficznego oddziaływania jonu Zn(II), podstawnika i rozpuszczalnika. Ponadto duża wartość Φ_F świadczy o długim czasie życia fluorescencji, co ogranicza transfer energii w procesie przejścia międzysystemowego ze stanu $S_1 \rightarrow T_1$, któremu towarzyszy zjawisko generowania tlenu singletowego [222].

Wydajność kwantowa fluorescencji zależy także w dużym stopniu od rodzaju rozpuszczalnika. W odniesieniu do ftalocyjanin **Pc1-Pc4** można zauważyć, że większe wydajności kwantowe fluorescencji Φ_F , uzyskano w roztworach DMSO niż DMF, co można wyjaśnić różną lepkością η rozpuszczalników, która wynosi odpowiednio 1,987 oraz 0,794 mPa·s (25 °C) [240]. Obserwowane zależności znajdują uzasadnienie w piśmiennictwie, a wielu autorów dowiodło, że lepkość roztworu otaczającego fluorofor,

wpływa na właściwości fluorescencyjne [241], m.in. Ogunsipe i wsp. oraz Durmus i wsp. wykazali, że im większa lepkość rozpuszczalnika tym większa wartość Φ_F [202,242].

Idealny fotouczulacz powinien charakteryzować się wysoką wydajnością generowania tlenu singletowego Φ_Δ i/lub innych reaktywnych form tlenu. Z tego względu jednym z celów pracy, była ocena zdolności ftalocyjanin **Pc1-4** do generowania tlenu singletowego, który jest uważany za główny czynnik odpowiedzialny za efekt terapeutyczny uzyskiwany w terapii fotodynamicznej [7]. Podobnie jak w przypadku fluorescencji, zdolność generowania tlenu singletowego przez metaloftalocyjaniny **Pc1-4**, jest uzależniona od zmiany stanów elektronowych wzbudzonej cząsteczki. Ilościowo, Φ_Δ określa liczbę cząsteczek 1O_2 , wygenerowaną przez fotouczulacz wzbudzony w wyniku absorpcji jednego fotonu. Zdolność generowania tlenu singletowego zależy od wielu czynników, m.in. energii stanu wzbudzonego fotouczulacza, obecności wygaszaczy 1O_2 , rozpuszczalnika, czasu życia stanu trypletowego, efektywnego transferu energii pomiędzy fotouczulaczem w stanie wzbudzonym T_1 , a tlenem cząsteczkowym w stanie podstawowym (T_0), rodzaju jonów metalu koordynującego, tendencji fotouczulacza do agregacji [243].

Zdolność generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaniny **Pc1-Pc4**, oceniano metodą pośrednią w roztworze DMSO i DMF, w warunkach tlenowych. DPBF zastosowano jako chemiczny wygaszacz tlenu singletowego, który posiada wymagane właściwości tj. reakcja zachodzi w stosunku stechiometrycznym 1:1 i ma szybki przebieg [244]. Mieszaninę roztworów ftalocyjanin **Pc1-4** z DPBF, naświetlano promieniowaniem o długości fali odpowiadającej λ_{max} pasma Q, a przebieg reakcji monitorowano spektrofotometrycznie, analizując zmiany absorbancji w maksimum pasma DPBF przy $\lambda=417$ nm. Jak podaje Spiller i wsp. [244] do zalet DPBF zaliczyć należy także fakt, że produkty jego fotodegradacji nie reagują z cząsteczką wygaszacza oraz z 1O_2 i nie wykazują absorpcji promieniowania w zakresie widzialnym. Natomiast wadą DPBF jest brak selektywnej zdolności wygaszania tlenu singletowego, gdyż posiada także zdolność reagowania z innymi rodnikami i utleniaczami (poza rodnikiem nadtlenkowym). Ponadto w bardziej stężonych roztworach DPBF, w obecności 1O_2 , może zachodzić wolnorodnikowa reakcja łańcuchowa [244], dlatego podczas badania ftalocyjanin **Pc1-4**, stosowano roztwory DPBF o stężeniu ok. $3 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ [244,245]. Reakcji wolnorodnikowej DPBF można zapobiegać również poprzez dodatek związków nukleofilowych, jak np. tiosiarczan(VI) sodu, jodek sodu lub wodorotlenek sodu [244].

Na Ryc. 106, 107, 110, 111, 114, 115, 118, 119, przedstawiających rozkład DPBF, pod wpływem tlenu singletowego generowanego przez ftalocyjaniny **Pc1-4**, nie obserwowano zmian absorpcji pasma Q. Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego ftalocyjanin **Pc1-4**, wyznaczono względem ftalocyjaniny cynkowej, a wyniki przedstawiono w Tabeli 41. Wszystkie badane związki **Pc1-4** wykazywały zdolność generowania tlenu singletowego, a najbardziej efektywna okazała się ftalocyjanina **Pc3**. Jak wynika z Tabeli 41, ftalocyjaniny posiadające w centrum koordynacyjnym jon Zn(II) - **Pc1** i **Pc3** - wykazywały znacznie większe wartości Φ_{Δ} . Z doniesień literaturowych wynika, że ftalocyjaniny demetalowane generują tlen singletowy bardzo słabo lub wcale. Natomiast kompleksowanie ftalocyjanin jonami metali przejściowych pozwala uzyskać związki o krótkim czasie życia stanu trypletowego, a tym samym niskiej wartości Φ_{Δ} [1]. Szczególną rolę w stabilizacji stanu trypletowego fotouczulaczy, odgrywają jony metali przejściowych o właściwościach paramagnetycznych i zapełnionych orbitalach walencyjnych, jak np. jony Zn(II) [2], co uzasadnia wysokie wartości Φ_{Δ} otrzymane dla ftalocyjanin cynkowych **Pc1** i **Pc3**. Zgodnie z przewidywaniami, mniejszą zdolność generowania $^1\text{O}_2$ wykazywały ftalocyjaniny zawierające jony magnezu(II), tj. **Pc2** i **Pc4**. Ponadto, w przypadku ftalocyjaniny **Pc4**, na zmniejszenie wydajności generowania $^1\text{O}_2$ wpływa także jonowy charakter czwartorzędowej soli amoniowej. Postać jonowa, tj. **Pc4** słabiej generowała tlen singletowy w porównaniu do **Pc2**. Wydajność kwantowa ftalocyjanin **Pc2** i **Pc4**, wynosiła odpowiednio w roztworze DMSO $\Phi_{\Delta\text{Pc2}}=0,21$ oraz $\Phi_{\Delta\text{Pc4}}=0,12$, a w środowisku DMF $\Phi_{\Delta\text{Pc2}}=0,25$, $\Phi_{\Delta\text{Pc4}}=0,14$. Analogiczne zależności obserwowali, Bıyıklıoğlu i wsp. [246], którzy analizowali efekty przekształcenia tetra- i oktapodstawionych chinolinowych pochodnych ZnPc w czwartorzędowe sole amoniowe. Innym parametrem wpływającym na generowanie tlenu jest lepkość rozpuszczalnika, co można zauważyć na przykładzie ftalocyjaniny **Pc1** w DMSO, gdzie obserwowano niewielką wartość Φ_{Δ} . Podobne uzasadnienie można znaleźć w pracach Ogunsipe i wsp. oraz Durmus i wsp. [202,242]. Suhling i wsp. [241] wyjaśniają, że w przypadku większej wartości η , następuje redukcja możliwych zderzeń cząsteczki fotouczulacza z tlenem singletowym.

Tlen singletowy, wygenerowany w wyniku wzbudzenia fotouczulacza, posiada zdolność utleniania różnych substratów, np. lipidów błon komórkowych, białek, kwasów nukleinowych itp., w tym również cząsteczek fotouczulacza. W odniesieniu do wielu ftalocyjanin w czasie naświetlania, obserwowano zanik barwy roztworu oraz zmniejszenie intensywności pasma Soret'a i Q, co określa się terminem autooksydacyjnego

fotowycielania (ang. photobleaching). Stabilność fotouczulaczy w czasie naświetlania jest bardzo istotna z punktu widzenia PDT. Związki efektywnie generujące tlen singletowy, szczególnie zaś ftalocyjaniny, zwykle wykazują wysoką podatność na fotoutlenianie [247]. Zależność taką zaobserwowano również w odniesieniu do badanych ftalocyjanin **Pc1-4**. Ponadto rozkład fotochemiczny fotouczulacza, sprzyja jego szybkiej „eliminacji”, zmniejszając ryzyko wystąpienia działań niepożądanych związanych z fototoksycznością, pod warunkiem, że nie towarzyszy temu powstanie toksycznych produktów. W przeciwnym razie zjawisko fotodegradacji jest procesem wysoce niepożądanym w PDT [247].

Z tego względu w ramach realizowanych zadań przewidziano także badania fotodegradacji ftalocyjanin **Pc1-4**. Podatność ftalocyjanin na rozkład pod wpływem światła, zależy od wielu czynników, a w tym od budowy cząsteczki, stężenia, właściwości rozpuszczalnika, natężenia promieniowania. W wielu pracach dowiedziono, że metaloftalocyjaniny są bardziej podatne na rozkład pod wpływem promieniowania o krótszych długościach fali światła widzialnego i UV [242,247,248]. Fotodegradacja fotouczulaczy, zachodzić może według różnych mechanizmów, np. fotomodyfikacji lub fotowycielania [247]. Jak przedstawiono na Ryc. 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, naświetlaniu ftalocyjanin **Pc1-4**, promieniowaniem z zakresu 450-900 nm, nie towarzyszyła zmiana kształtu ani wykształcanie nowych pasm, co świadczy o występowaniu zjawiska fotowycielania. Schnurpfeil i wsp. [249] badając proces fotodegradacji ftalocyjanin dowiódł, że zjawisko fotowycielania jest skutkiem fragmentacji pierścienia na bezbarwne cząsteczki, a głównym fotoproduktem są pochodne ftalimidu.

Proces fotodegradacji ftalocyjanin **Pc1-Pc4** analizowano w roztworze DMSO i DMF. W tym celu w odstępach czasu wykreślano widma absorpcji roztworu poddawanego naświetlaniu. Jak zobrazowano na Ryc. 124, Ryc. 128, Ryc. 132, w wyniku ekspozycji świetlnej ftalocyjanin **Pc1-3** w roztworze DMF, obserwowano zmiany intensywności pasm absorpcji. Natomiast stabilność związków w DMSO była zdecydowanie większa i, jak przedstawiono na Ryc. 122, Ryc. 126, Ryc. 130, Ryc. 134, nie obserwowano istotnych zmian przebiegu widm. Według doniesień literaturowych, DMSO wykazuje silne działanie koordynujące względem metaloftalocyjanin, a tym samym chroni cząsteczkę przed oksydacyjnym atakiem tlenu singletowego [250].

Kolejny etap zakładał wyznaczenie parametrów kinetycznych fotodegradacji. W tym celu analizowano zmiany absorbancji w maksimum pasma Q i wykreślono zależności $\ln A/A_0 = f(t)$. Obserwowane zmiany przedstawione graficznie na Ryc. 123, 125, 127, 129,

131, 133, 135, 137, wskazują, że rozkład fotochemiczny ftalocyjanin miał przebieg jedno- lub dwuetapowy. Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ obrazująca rozkład **Pc2** (Ryc. 129) w DMF i **Pc4** (Ryc. 137) w roztworze wodnym, obrazuje reakcje jednoetapowe, natomiast fotodegradacja ftalocyjanin **Pc1-4** w DMSO (Ryc. 123, 127, 131, 135) oraz **Pc1** (Ryc. 125) i **Pc3** (Ryc. 133) w DMF, przebiegała dwuetapowo. Poszczególne etapy miały charakter reakcji kinetycznej pierwszego rzędu. Dla poszczególnych zależności kinetycznych rozkładu ftalocyjanin **Pc1-4**, wyznaczono stałą szybkości reakcji oraz czas połowicznego fotorozkładu $t_{0,5}$. Jak przedstawiono na Ryc. 123, 127, 125, 131, 133, 135, w przypadku, procesów charakteryzujących się przebiegiem dwuetapowym, można zaobserwować, że etap pierwszy przebiegał ze znacznie większą szybkością. Jednocześnie porównanie parametru $t_{0,5}$ wykazywało znacznie szybszy przebieg procesu fotodegradacji w roztworze DMF.

Ostatni etap oceny aktywności fotodynamicznej ftalocyjanin **Pc1-4**, zakładał zbadanie aktywności *in vitro* fotouczulaczy na komórkach wyizolowanych z tkanki nowotworowej. Badania biologiczne ftalocyjanin **Pc1-3** wykonano na związkach „wolnych” i enkapsulowanych w nośniki liposomalne, które otrzymano metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego. Charakterystykę uzyskanych liposomów przedstawiono w Tabeli 46. Materiał biologiczny stanowiły komórki raka kolczystokomórkowego nowotworów głowy i szyi (ang. *human squamous cell carcinoma*, HSCC), wyizolowane z tkanki nowotworowej zlokalizowanej na języku (HSC3) i w obrębie ślinianek większych (H413). HSCC jest szóstym, najpowszechniej występującym typem nowotworu na świecie, diagnozowanym u ok. 600 tys. pacjentów rocznie. Oszacowano, że w USA każdego roku przybywa 50 tys. nowych zachorowań na HSCC, a jednocześnie rak kolczystokomórkowy głowy i szyi jest przyczyną ok. 10 tys. zgonów. Pomimo wspólnego pochodzenia, nowotwory HSCC charakteryzują się dużym zróżnicowaniem w zależności od anatomicznego umiejscowienia tkanki nowotworowej i dlatego wymagają zindywidualizowanej terapii [251]. Terapia fotodynamiczna jest metodą o obiecującym zastosowaniu w leczeniu nowotworów, co potwierdzają zarówno badania jak też praktyka kliniczna, gdzie preparat Foscan jest stosowany w paliatywnym leczeniu nowotworów głowy i szyi [252,253]. Zastosowanie PDT w leczeniu nowotworów HSCC w obrębie głowy i szyi, jest możliwe z uwagi na lokalizację zmiany nowotworowej, łatwo dostępnej do naświetlania przy wykorzystaniu obecnie dostępnych źródeł promieniowania. Ponadto, możliwość stosowania różnych dróg podania fotouczulacza, np. dożylniej w postaci iniekcji, miejscowej w formie opatrunku okluzyjnego, sprzyja selektywnemu działaniu

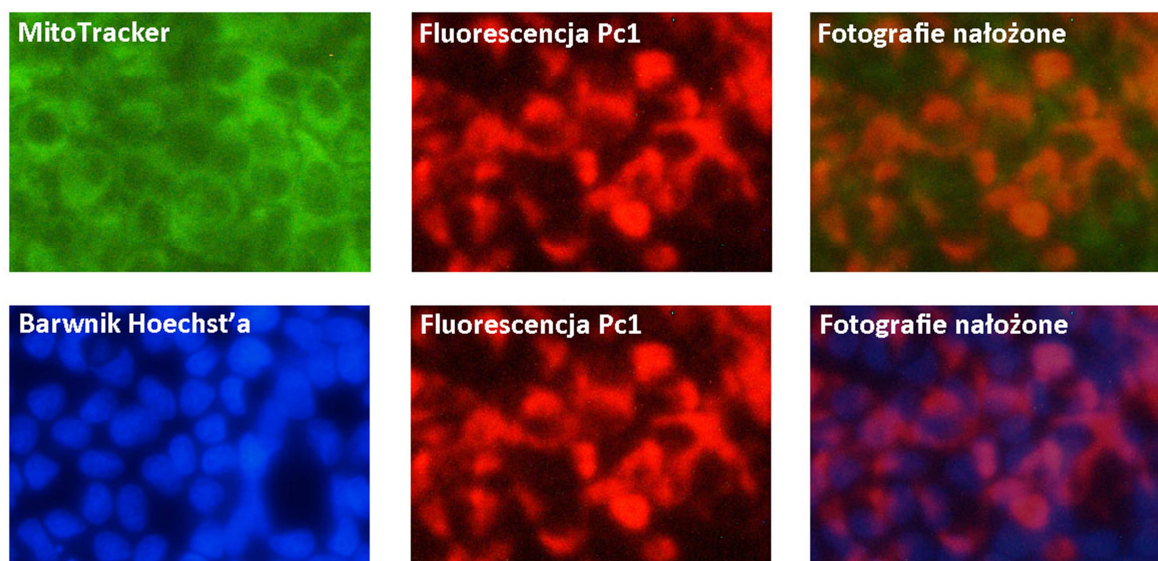
w obrębie tkanki nowotworowej i zmniejszaniu ryzyka występowania działań niepożądanych [21].

Badanie aktywności biologicznej fotouczulaczy realizowano w dwóch etapach, oceniając tzw. toksyczność ciemną i jasną ftalocyjanin **Pc1-4** w formie wolnej oraz po wbudowaniu w liposomy **lipPc1-4**. Ftalocyjaniny **Pc1-4** badano w liposomach o składzie fotouczulacz, 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina i L- α -fosfatydylo-DL-glicerol w stosunku molowym 0,1:8:2, w których stężenie fotouczulacza wynosiło 100 μ M. W pierwszym etapie oceniano aktywność fotouczulaczy **Pc1-4** i **lipPc1-4** w fazie ciemnej, dla trzech podstawowych stężeń 0,1, 1,0 i 10 μ M, w celu wykluczenia potencjalnej toksyczności *per se*. Na podstawie wyników zestawionych w Tabeli 48, uzyskanych po 24 h inkubacji ftalocyjanin **Pc1-4** i **lipPc1-4** z komórkami HSC3 bez dostępu światła, nie zaobserwowano działania toksycznego. Kontrola zawierająca 0,5% DMSO w medium oraz liposomy bez wbudowanych ftalocyjanin nie wykazywały działania toksycznego w ciemności (Tabela 50). Podobne wyniki uzyskano w przypadku ftalocyjaniny **Pc2-3** w formie wolnej i liposomalnej, odnośnie komórek H413. Natomiast w fazie ciemnej ftalocyjanina **Pc1** w stężeniu 1 i 10 μ M, spowodowała zahamowanie wzrostu linii H413, odpowiednio o ok. 20 i 60%. W kolejnych etapach badań, zastosowano niższe stężenia związku **Pc1**, tj. 0,01, 0,1 i 0,5 μ M, dla których nie stwierdzono działania cytotoksycznego. Już na etapie oceny toksyczności ciemnej, można zauważyć zróżnicowaną wrażliwość komórek nowotworowych, na działanie związków fotouczulających.

W kolejnym etapie analizy aktywności przeciwnowotworowej, tzw. toksyczności jasnej, komórki inkubowane z ftalocyjaninami **Pc1-4** i **lipPc1-4**, po upływie 24 h poddano naświetlaniu. W celu aktywacji odpowiednio ftalocyjaniny **Pc1** oraz **Pc2-4**, jako źródło światła zastosowano diody, emitujące promieniowanie o długości fali $\lambda_{\max}=690$ nm i $\lambda_{\max}=735$ nm. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 49. Ftalocyjaniny **Pc2-4** i **lipPc2-3** nie wykazały aktywności fotodynamicznej, zarówno względem komórek HSC3, jak też H413. Nie obserwowano również działania toksycznego liposomów bez wbudowanych ftalocyjanin względem badanych linii komórkowych ani kontroli 0,5% DMSO (Tabela 50). Natomiast w przypadku komórek HSC3, zaobserwowano bardzo silne działanie fotocytotoksyczne związku **Pc1** oraz jego liposomalnej postaci, które już przy stężeniu 0,1 μ M, spowodowały spadek przeżywalności komórek do 10%.

Podjęto próbę wyjaśnienia braku aktywności **Pc2-4**, badając wchłanianie komórkowe związków. W tym celu komórki HSC3, inkubowano z ftalocyjaninami **Pc1-4** o stężeniu 10 μ M przez 24 h. Część hodowli komórkowej wykorzystano w badaniu wizualizacji

komórek przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Przygotowanie prób do obrazowania fluorescencyjnego, polegało na dodaniu do studzienek zawierających komórki HSC3 markerów fluorescencyjnych: MitoTracker Green - barwiącego aktywne mitochondria oraz barwnika Hoechst'a - markera kwasów nukleinowych. Następnie stosując odpowiednie filtry, obserwowano intensywną czerwoną fluorescencję ftalocyjaniny **Pc1**, zieloną MitoTrackera oraz niebieską barwnika Hoechst'a. Czerwoną fluorescencję uzyskano wyłącznie w przypadku ftalocyjaniny **Pc1** (Ryc. 140).

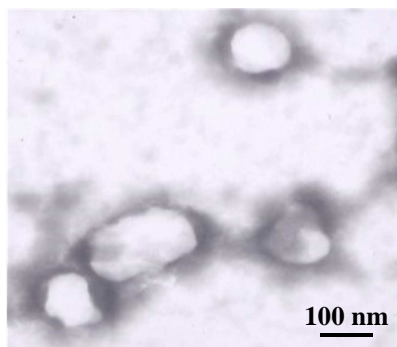


Ryc. 140 Zdjęcia uzyskane techniką mikroskopii fluorescencyjnej. Wizualizacja wewnątrzkomórkowa ftalocyjaniny **Pc1**: panel 1) komórki wybarwione barwnikiem Mitotracker Green i Hoechst; panel 2) czerwona fluorescencja ftalocyjaniny **Pc1**; panel 3) nałożone fotografie panelu 1 i 2 (powiększenie obiektywu 20x).

Pozostałe komórki HSC3, niewykorzystane w badaniu wizualizacji komórkowej, poddano ekstrakcji DMF w celu oceny zdolności wchłaniania fotouczulaczy **Pc1-4**. Po zakończeniu ekstrakcji, wykreślano widma absorpcji wyekstrahowanych roztworów. Intensywną absorpcję wykazywał jedynie ekstrakt wyizolowany z komórek inkubowanych z ftalocyjaniną **Pc1**, pozostałe ekstrakty nie wykazywały obecności chromoforów ftalocyjanin. Na podstawie badania wizualizacji komórkowej i oceny stopnia wchłaniania fotouczulaczy **Pc1-4** przez komórki HSC3 stwierdzono, że ftalocyjaniny **Pc2-4**, nie wiązały się z komórkami, co może uzasadniać brak fotocytotoksyczności.

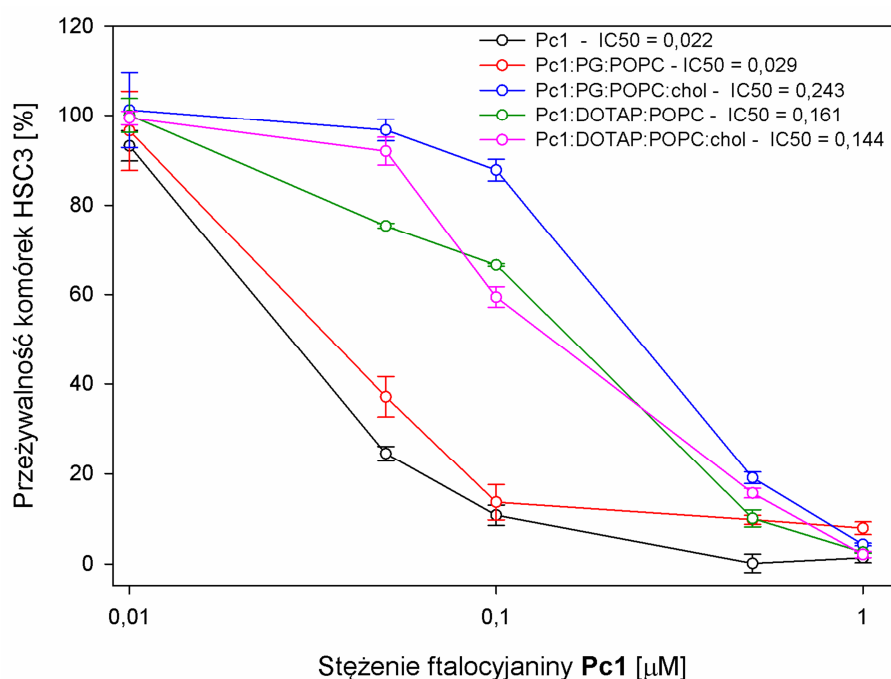
W związku z powyższym, dalsze badania aktywności biologicznej analizowano w odniesieniu do ftalocyjaniny **Pc1**. Przygotowano cztery rodzaje liposomów z enkapsulowaną **Pc1**, tj. POPC:PG, POPC:PG:chol, POPC:DOTAP, POPC:DOTAP:chol

(Tabela 46). W wyniku kalibracji wymiarowej uzyskano małe liposomy jednolamelarne z inkorporowaną **Pc1** o wielkości średnicy 100-150 nm (Ryc. 141).



Ryc. 141 Fotografia liposomów **Pc1**:POPC:PG uzyskana metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej z zastosowaniem techniki barwienia negatywnego.

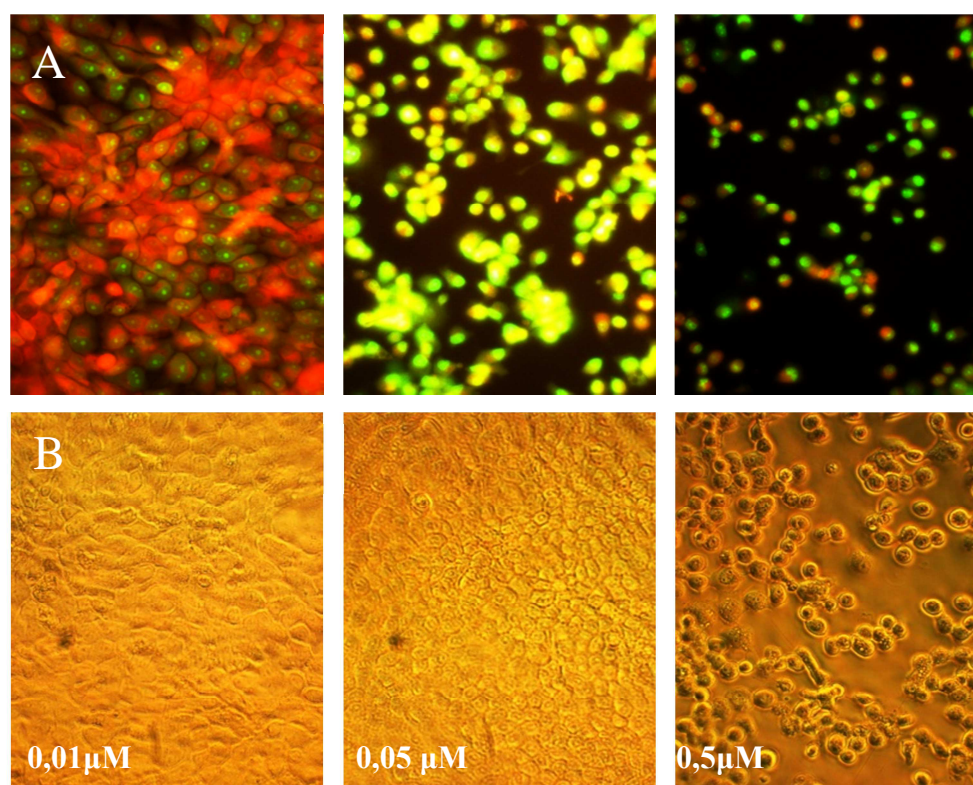
Następnie dla ftalocyjaniny **Pc1** w zakresie stężeń 0,01-1,0 μM , w formie wolnej i czterech liposomalnych formuacji, wyznaczono parametr IC_{50} , czyli stężenie hamujące wzrost komórek HSC3 w 50% (Ryc. 142). Wykazano, że największą zdolnością inhibicji wzrostu komórek HSC3, charakteryzuje się **Pc1** w formie wolnej i w liposomach o ładunku ujemnym PG:POPC, dla których wartość IC_{50} , wynosiła odpowiednio 0,022 i 0,029 μM . Jak wynika z Ryc. 142, wprowadzenie cholesterolu do błony liposomu, spowodowało ok. 10-krotne zmniejszenie aktywności cytotoksycznej **Pc1**. Obserwowane zależności mogą wynikać ze zmniejszonego uwalniania **Pc1** z nośnika, na skutek stabilizacji i zmniejszenia płynności błony liposomalnej, wynikającej z obecności cholesterolu. Należy także podkreślić, że zmiana ładunku błony liposomu na dodatni, poprzez wprowadzenie DOTAP, również nie wpłynęła korzystnie na działanie fotocytotoksyczne **Pc1**.



Ryc. 142 Zależność przeżywalności komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 od stężenia ftalocyjaniny **Pc1** w formie wolnej i enkapsulowanej w liposomy.

Można zakładać, że powyższy efekt jest skutkiem zmniejszonego powinowactwa liposomów obdarzonych ładunkiem dodatnim, względem komórek nowotworowych HSCC.

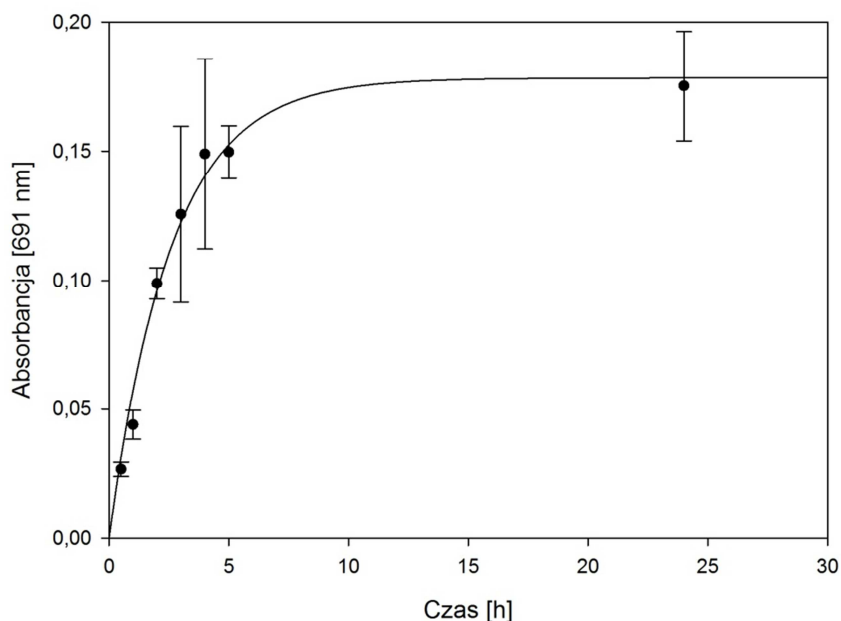
Ze wzrostem stężenia ftalocyjaniny **Pc1** obserwowano spadek przeżywalności komórek HSC3, czemu towarzyszyły zmiany morfologiczne hodowli, obserwowane, po upływie 24 godzin od zakończenia naświetlania. Komórki HSC3 to tzw. komórki adherentne, które wykazują zdolność adhezji, tj. w trakcie podziałów tworzą pojedynczą warstwę komórek, które ściśle do siebie przylegają. Analizując metodą mikroskopową następstwa działania fotocytotoksycznego ftalocyjaniny **Pc1**, zauważono, że komórki HSC3 odseparowują się od siebie, następuje obkurczanie błony komórkowej i zmiana kształtu komórek (Ryc. 143).



Ryc. 143 Zmiany morfologii komórek HSC3 po upływie 24 h od zakończenia naświetlania hodowli, inkubowanej z **Pc1** o stężeniu 0,01, 0,05 i 0,5 μM : A) fotografie uzyskane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego w wyniku wybarwienia komórek markerami SYTO Green (zielona fluorescencja) i Cell Trace Calcein red-orange AM (czerwona fluorescencja) B) fotografie uzyskane w trybie kontrastowo-fazowym (powiększenie obiektywu 20x).

W końcowym etapie badań biologicznych, analizowano stopień internalizacji ftalocyjaniny **Pc1** przez komórki HSC3. Komórki inkubowano z ftalocyjaniną **Pc1** o stężeniu 10 μM w czasie 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 24 h. Po upływie wyznaczonego czasu komórki poddano

ekstrakcji DMF, a następnie mierzono wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=691$ nm. Uzyskane wyniki wskazują, że po upływie 5 h i 24 h, z komórkami związało się odpowiednio 11,85% i 13,87% początkowej ilości ftalocyjaniny **Pc1** (Ryc. 144). Lau i wsp. [209] oceniając stopień wchłaniania koniugatu ftalocyjaniny cynkowej z oksaliplatyną przez komórki HT29, uzyskali dla dwóch różnych koniugatów wynik na poziomie ok. 3 i 16%.



Ryc. 144 Zmiany wartości absorbancji ekstraktów wyizolowanych z komórek, po upływie 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 24 h inkubacji ftalocyjaniny **Pc1** z komórkami HSC3.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują, że budowa cząsteczki porfirynoidu, determinuje właściwości fizykochemiczne oraz fotodynamiczne badanej grupy związków **Pc1-Pc4**. Największy potencjał jako fotouczulacz do zastosowania w terapii fotodynamicznej posiada ftalocyjanina **Pc1**. O potencjalnej skuteczności terapeutycznej **Pc1** mogą decydować właściwości hydrofobowe oraz budowa cząsteczki (układ podstawników, obniżona symetria, rozkład ładunku), ułatwiające oddziaływanie **Pc1** z lipidami błon komórkowych. Opracowane dla **Pc1** nośniki liposomalne, nie spowodowały nasilenia aktywności fotodynamicznej. Liposomy pełnią rolę czynnika solubilizacyjnego dla hydrofobowego, nierozpuszczalnego w środowisku wodnym związku **Pc1**, przy czym najlepszy efekt biologiczny uzyskano stosując liposomy POPC:PG.

VII. WNIOSKI

Przeprowadzono ocenę właściwości fizykochemicznych i fotodynamicznych czterech morfolinoetoksylowych pochodnych ftalocyjaniny **Pc1-4**, w odniesieniu do właściwości idealnego fotouczulacza wraz z oceną zdolności inaktywacji komórek raka kolczystokomórkowego w formie wolnej i liposomalnej. Analiza otrzymanych wyników w odniesieniu do dostępnego piśmiennictwa, pozwala sformułować następujące wnioski:

1. Ftalocyjaniny **Pc1-4** spełniają kryterium czystości chemicznej oraz posiadają odpowiednie właściwości spektralne, założone w wymaganiach dla potencjalnych związków fotouczulających. Widma posiadają charakterystyczne pasma absorpcji, tj. pasmo Soret'a i Q oraz wykazują intensywną absorpcję promieniowania w zakresie 600-800 nm ($\epsilon=10^5-10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$).
2. Położenie maksimum absorpcji pasma Q zależy od liczby podstawników morfolinoetoksylowych. Związek zawierający dwa podstawniki (**Pc1**) posiada maksimum absorpcji przy ok. $\lambda_{\text{max}}=690 \text{ nm}$, natomiast związki posiadające osiem podstawników (**Pc2-4**) wykazywały położenie λ_{max} w zakresie 740-750 nm.
3. Przesunięcie batochromowe pasma Q ftalocyjanin (**Pc1** i **Pc3**), jest funkcją współczynnika refrakcji rozpuszczalnika niepolarnego. Natomiast ftalocyjanin **Pc1-3** w rozpuszczalnikach polarnych, jest funkcją parametru uwzględniającego współczynnik refrakcji oraz stałą dielektryczną rozpuszczalnika.
4. Podstawniki morfolinoetoksylowe w pozycjach nieperyferyjnych zwiększają zdolności solubilizacyjne ftalocyjanin.
5. Zwiększenie liczby podstawników morfolinoetoksylowych zmniejsza tendencję do agregacji ftalocyjanin.
6. Ftalocyjaniny **Pc1-4** wykazują zdolność generowania tlenu singletowego; największe wartości wykazywały ftalocyjaniny zawierające w centrum koordynacyjnym jony cynku(II).

W rozworach DMF wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego rośnie w szeregu:



7. Ekspozycja ftalocyjanin **Pc1-4** na promieniowanie widzialne generuje jedno- lub dwuetapowy proces fotowysielania, zachodzący zgodnie z reakcją kinetyczną pierwszego rzędu. Związki wykazujące większą wydajność kwantową generowania tlenu singletowego, wykazują większą podatność na proces fotodegradacji.
8. Komórki raka kolczystokomórkowego nowotworów głowy i szyi wykazują zróżnicowaną wrażliwość na inaktywację metodą PDT z zastosowaniem różnych stężeń ftalocyjaniny **Pc1**.
9. Ftalocyjanina **Pc1** posiada najbardziej obiecujące właściwości jako potencjalny fotouczulacz do zastosowania w terapii fotodynamicznej.
10. Opracowane formułacje liposomalne dla ftalocyjaniny **Pc1**, stanowią dogodny nośnik pełniący rolę czynnika solubilizacyjnego dla hydrofobowego, nierozpuszczalnego w środowisku wodnym fotouczulacza.

VIII. STRESZCZENIE

W pracy doktorskiej pt. „Fotochemiczna oraz fotodynamiczna aktywność wybranych porfirynoidów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym inkorporowanych w nośniki liposomowe” przedstawiono analizę właściwości fizykochemicznych i fotodynamicznych ftalocyjanin **Pc1-4** wraz z oceną aktywności biologicznej w formie wolnej i liposomalnej. Badane ftalocyjaniny to związki autorskie, które zostały zsyntetyzowane w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, modyfikowane nieperyferyjnie ugrupowaniami morfolino-etoksyłowymi. Dwa z analizowanych związków, zawierały w centrum koordynacyjnym jony cynku(II) oraz odpowiednio dwa (**Pc1**) lub osiem podstawników (**Pc3**). Natomiast ftalocyjaniny **Pc2** i **Pc4**, posiadały wbudowane jony Mg(II) oraz osiem podstawników. Ftalocyjanina **Pc4** miała postać czwartorzędowej soli amoniowej, i była jonową formą związku **Pc2**.

W pierwszym etapie pracy dokonano oceny czystości chemicznej otrzymanych ftalocyjanin **Pc1-3** metodą HPLC. Optymalizacja procesu chromatograficznego polegała na ustaleniu składu fazy ruchomej oraz warunków rozdzielania w trzech układach. Stwierdzono, że analizowane próbki spełniają kryterium czystości chemicznej wymagane od potencjalnych fotosensybilizatorów w PDT, a zawartość ftalocyjanin wynosiła >95%.

Następnie analizowano właściwości absorpcyjne ftalocyjanin **Pc1-4** metodami spektroskopowymi i wyznaczono molowe współczynniki absorpcji. Przebieg elektronowych widm absorpcji ftalocyjanin **Pc1-4**, wykazał obecność charakterystycznych pasm, tj. pasma Soret'a i Q oraz silną absorpcję promieniowania w zakresie 600-800 nm ($\epsilon=10^5-10^6 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$). Wykreślono widma związków **Pc1-4** w rozpuszczalnikach o zróżnicowanych właściwościach, które wykorzystano do oceny wpływu rozpuszczalników na widmo UV-Vis i oddziaływania rozpuszczalników ze związkami. Zjawisko solwatochromizmu pozytywnego obserwowano w odniesieniu do ftalocyjaniny **Pc4** w rozpuszczalnikach polarnych. Największy wpływ na przesunięcie batochromowe maksimum pasma Q, wywierała woda i rozpuszczalniki o właściwościach koordynacyjnych (DMSO, pirydyna). W procesie solwatacji ftalocyjanin **Pc1** i **Pc3** w rozpuszczalnikach niepolarnych oraz **Pc1-3** w środowisku polarnym, dominującą rolę odgrywały siły dyspersyjne. Kolejny etap dotyczył analizy właściwości agregacyjnych ftalocyjanin w rozpuszczalnikach o różnej polarności; określono zakres stężeń dla postaci monomerycznej. Największe powinowactwo względem rozpuszczalników polarnych

wykazała ftalocyjanina **Pc2**, **Pc3** oraz **Pc4**. Ftalocyjaniny **Pc1-4** wykazywały niewielką zdolność emisji promieniowania, a wydajność kwantowa fluorescencji, którą wyznaczono metodą pośrednią, z wyjątkiem wartości uzyskanej dla **Pc1** w roztworze DMSO, była niższa w porównaniu ze wzorcem niepodstawionej ftalocyjaniny cynkowej.

Zdolność generowania tlenu singletowego badano metodą pośrednią z wykorzystaniem difenylloizobenzofuranu, jako wygaszacza tlenu singletowego. Wszystkie ftalocyjaniny **Pc1-4** generowały tlen singletowy w rozpuszczalnikach organicznych. Największe wartości wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego, wykazywały ftalocyjaniny posiadające w centrum koordynacyjnym jony cynku(II), tj. **Pc3** i **Pc1**.

Fotodegradacja ftalocyjanin **Pc1-4**, którą określono jako tzw. proces fotowysbielenia, była procesem jedno lub dwuetapowym i przebiegała zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Proces fotodegradacji ftalocyjanin zależał od środowiska, a związki które wykazywały wysoką wydajność kwantową generowania tlenu singletowego, posiadały większą podatność na proces fotochemicznego rozkładu.

W badaniach aktywności biologicznej w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem linii komórkowych raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413, fotocytotoksyczną aktywność wykazała ftalocyjanina **Pc1**. Zaobserwowano zróżnicowaną odpowiedź linii komórek nowotworowych na inaktywację fotodynamiczną, przy czym **Pc1** wykazywała efekt toksyczny względem komórek H413, także bez naświetlania. Dla ftalocyjaniny **Pc1** opracowano i przygotowano cztery formułacje liposomalne. Szczególnie obiecujący efekt uzyskano dla liposomów o ładunku ujemnym, zbudowanych z 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glycero-3-fosfocholiny (POPC) i fosfatydyloglicerolu (PG). Otrzymano porównywalną wartość stężenia IC_{50} , wyznaczoną dla ftalocyjaniny **Pc1** w „formie wolnej” oraz inkorporowanej w liposomy POPC-PG. Wykazano, że ftalocyjanina **Pc1**, w porównaniu do związków **Pc2-4** wykazuje powinowactwo względem komórek HSC3, co zadecydowało o skutecznej inhibicji wzrostu hodowli komórek raka kolczystokomórkowego.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że budowa cząsteczki porfirynoidu, determinuje właściwości fizykochemiczne oraz fotodynamiczne. Największy potencjał jako fotouczulacz do zastosowania w terapii fotodynamicznej posiada ftalocyjanina **Pc1**. Opracowany dla **Pc1** nośnik liposomalny POPC:PG, nie powoduje nasilenia aktywności fotodynamicznej, a pełni rolę czynnika solubilizacyjnego dla hydrofobowego, nierozpuszczalnego w środowisku wodnym fotouczulacza.

IX. ABSTRACT

Title: Photochemical and photodynamic activity of selected porphyrinoids possessing potential anticancer activity incorporated into liposome carriers

The scope of the dissertation was to evaluate physicochemical and photodynamic properties and determine biological activity of phthalocyanines **Pc1-4**, non-incorporated and incorporated into liposomes. Novel phthalocyanine derivatives **Pc1-4** endowed non-peripherally with 2-(morpholin-4-yl)ethoxy substituents were synthesized in the Department of Chemical Technology of Drugs, Poznan University of Medical Sciences. Two out of four studied compounds were coordinated by zinc(II) ion and possessed two (**Pc1**) and eight substituents (**Pc3**), respectively. Whereas, **Pc2** and **Pc4** phthalocyanines, had inserted Mg(II) ion and eight substituents. Phthalocyanine **Pc2** was quaternized what resulted in quaternary ammonium salt, **Pc4**.

In the first step, purity of **Pc1-3** samples was assessed by HPLC chromatography. Conditions of chromatographic process were optimized by selection of mobile phase ratio and elution mode. It has been found that the porphyrinoids have met the purity criteria required for potential photosensitizers in PDT, as the content of phthalocyanines **Pc1-3** in the studied samples was higher than 95 %.

Spectral properties of phthalocyanines **Pc1-4** were studied by spectroscopic technique and molar absorption coefficients were determined. Absorption spectra of the derivatives **Pc1-4** are typical of the phthalocyanine chromophore and possess less intense Soret band at 300-400 nm and sharp and intense Q (680-750 nm) band with molar coefficient of $\epsilon = 10^5$ - 10^6 . Spectra of the compounds **Pc1-4** were plotted in a variety of solvents and used for solvent effects study. Positive solvatochromism was observed with respect to the **Pc4** in polar solvents. The highest impact on Q band bathochromic shift was exerted by water and coordinating solvents (DMSO, pyridine). Dispersion forces contribute to the solvation of phthalocyanines **Pc1** and **Pc3** in non-polar solvents and **Pc1-3** in polar ones. Aggregation of phthalocyanines **Pc1-4** was analyzed in solvents of different polarity. The aim of the study was to identify the range of concentrations, where the monomeric form of the compound prevails. The greatest affinity for polar solvents showed phthalocyanine **Pc2**, **Pc3** and **Pc4**.

Furthermore, physical and photochemical properties of phthalocyanines **Pc1-4** were studied. **Pc1-4** showed poor emission properties and fluorescence quantum yield (determined by the comparative method) was lower compared with the standard

unsubstituted zinc phthalocyanine (ZnPc), with the exception of the value determined for **Pc1** in DMSO. The singlet oxygen quantum yield for **Pc1-4** was determined in DMSO and DMF, by relative method using ZnPc as a standard and 1,3-diphenylisobenzofuran as a singlet oxygen quencher. All phthalocyanines **Pc1-4** showed the ability to generate singlet oxygen effectively in organic solvents. The highest values of singlet oxygen quantum yield was obtained for phthalocyanines possessing zinc(II) ion, i.e. **Pc3** and **Pc1**. Subsequently, photostability of **Pc1-4** was studied upon illumination with a visible light beam (450-900 nm) in DMSO, DMF, and in case of **Pc4** also in water. Photodegradation of phthalocyanines **Pc1-4** was characterized by a decrease in the intensity of both the Soret and Q bands, without a shift in maxima or formation of new bands in the visible region. This scheme of photodegradation is called photobleaching. To study kinetic parameters of **Pc1-4** photodegradation, changes of the absorbance at the maximum of the Q band ($\ln A/A_0$) were plotted against the time of irradiation. Kinetic curves have shown that photodegradation of **Pc1-4** is one or two stage process, and each of the first order kinetics. Photodegradation of **Pc1-4** was highly influenced by the solvent and compounds with high singlet oxygen quantum yield had greater susceptibility toward photochemical degradation. Finally, biological activity of **Pc1-4** was studied against human squamous cell carcinoma (HSCC), HSC3 and H413. Cancer cell lines expressed different sensitivity toward photodynamic inactivation by **Pc1**. The **Pc1** inhibited the growth of H413 cells in the dark and generally showed highest photocytotoxic activity against both cell lines. Therefore, **Pc1** was submitted for additional liposomal encapsulation into four formulations. Negatively charged liposomes composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and phosphatidylglycerol (PG) have been found to be most promising vesicle for **Pc1**. The IC_{50} values determined (using HSC3 cells) for **Pc1** non-incorporated and incorporated into liposomes POPC:PG, were comparable. Cellular uptake and fluorescent microscopy experiments have shown that, to the contrary to **Pc2-4**, phthalocyanine **Pc1** had good affinity toward HSC3 cells. Additionally **Pc1** was active despite of its highly hydrophobic character.

The results have shown that the structure of phthalocyanine molecule is crucial for the physico-chemical properties and photodynamic activity of potential photosensitizer. The most promising properties as a potential photosensitizer for PDT have been found for **Pc1**. Liposomal carrier, developed for **Pc1** and composed of POPC and PG, does not potentiate photodynamic activity of the compound but plays an important role as a solubilizing matrix for the hydrophobic, insoluble photosensitizer.

X. WYKAZ RYCIN

Ryc. 1 Podstawowe struktury związków porfirynoidowych.....	7
Ryc. 2 Diagram Jabłońskiego obrazujący przejścia elektronowe we wzbudzonej cząsteczce fotocuczulacza (opis w tekście).....	8
Ryc. 3 Rodzaje liposomów: SUV - małe jednolamelarne liposomy, LUV - duże jednolamelarne liposomy, MLV - wielkie wielolamelarne liposomy, MVV – liposomy wielopęcherzykowe.	15
Ryc. 4 Struktury agregatów cząsteczek amfifilowych. Badania polimorfizmu związków amfifilowych doprowadziły do sformułowania tzw. koncepcji kształtu molekularnego, według której różnym cząsteczkom amfifilowym można przypisać różne kształty w zależności od stosunku powierzchni przekroju poprzecznego polarnej główki, do przekroju poprzecznego hydrofobowych łańcuchów acylowych. W sposób ilościowy powyższy stosunek opisuje parametr S. W przypadku większych „główek” polarnych – $S < 1/3$ powstają struktury micelarne i faza heksagonalna (H_I). Dla cząsteczek o wartości $S \sim 1$ preferowaną formą agregatu jest dwuwarstwa i faza lamelarna. Dla małych „główek” polarnych – $S > 1/3$, preferowana jest struktura odwróconej miceli i faza heksagonalna (H_{II}).	18
Ryc. 5 Inkorporacja substancji leczniczej o charakterze słabej zasady w liposomy, z zastosowaniem gradientu pH na granicy błony liposomu.	24
Ryc. 6 Rodzaje terapeutycznych liposomów.	27
Ryc. 7 Pochodne porfiryn inkorporowane w liposomy do badań w PDT (ALA – kwas 5-aminolewulinowy).	41
Ryc. 8 Pochodne bakteriochloryn i chloryn inkorporowane w liposomy do badań w PDT.	44
Ryc. 9 Ftalocyjanina cynkowa (ZnPc) jako główny przedstawiciel pochodnych ftalocyjanin badany w formie liposomalnej do zastosowania w PDT.	51
Ryc. 10 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	65
Ryc. 11 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	65
Ryc. 12 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	66
Ryc. 13 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	66
Ryc. 14 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 690$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	67
Ryc. 15 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc1	67
Ryc. 16 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	69
Ryc. 17 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	69
Ryc. 18 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda = 735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	70

Ryc. 19 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	70
Ryc. 20 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=735$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	71
Ryc. 21 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=343$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc2	71
Ryc. 22 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	73
Ryc. 23 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem I układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	73
Ryc. 24 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	74
Ryc. 25 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem II układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	74
Ryc. 26 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=730$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	75
Ryc. 27 Chromatogram uzyskany z zastosowaniem III układu chromatograficznego, przy długości fali detekcji $\lambda=320$ nm oraz widmo UV-Vis ftalocyjaniny Pc3	75
Ryc. 28 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc1 w różnych rozpuszczalnikach.....	77
Ryc. 29 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc2 w różnych rozpuszczalnikach.....	78
Ryc. 30 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc3 w różnych rozpuszczalnikach.....	79
Ryc. 31 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc4 w różnych rozpuszczalnikach.....	80
Ryc. 32 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc1 wykreślone w 15 rozpuszczalnikach.....	83
Ryc. 33 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc2 wykreślone w 16 rozpuszczalnikach.....	85
Ryc. 34 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc3 wykreślone w 17 rozpuszczalnikach.....	87
Ryc. 35 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjaniny Pc4 wykreślone w 6 rozpuszczalnikach.....	89
Ryc. 36 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc1 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- <i>n</i> -heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trietyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.....	92
Ryc. 37 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc1 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.....	92
Ryc. 38 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc2 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- <i>n</i> -heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trietyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.....	93
Ryc. 39 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc2 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną	

rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.....	93
Ryc. 40 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc3 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła rozpuszczalników niepolarnych: 1- n-heksan, 2- cykloheksan, 3- 1,4-dioksan, 4- toluen, 5- trietyloamina, 6- eter dietylowy, 7- dimetylosulfotlenek, 8- chloroform, 9- octan etylu, 10- tetrahydrofuran, 11- dichlorometan, 12- pirydyna.....	94
Ryc. 41 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc3 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.....	94
Ryc. 42 Zależność liczby falowej ν_{\max} [cm^{-1}] maksimum pasma Q ftalocyjaniny Pc4 od parametru $(n^2-1)(2n^2+1)+(2(\epsilon-1)(2\epsilon+1)/\epsilon)$, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła, ϵ – stałą dielektryczną rozpuszczalników polarnych): 13- izopropanol, 14- aceton, 15- metanol, 16- dimetyloformamid, 17- acetonitryl, 18- dimetyloacetamid, 19- woda.....	95
Ryc. 43 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w 1,4-dioksanie ($\lambda=688$ nm).	96
Ryc. 44 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w toluenie ($\lambda=691$ nm).....	97
Ryc. 45 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w trietyloaminie ($\lambda=683$ nm).	97
Ryc. 46 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w dimetylosulfotlenku ($\lambda=696$ nm).	97
Ryc. 47 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w chloroformie ($\lambda=692$ nm).	98
Ryc. 48 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w octanie etylu ($\lambda=686$ nm).	98
Ryc. 49 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w tetrahydrofuranie ($\lambda=687$ nm).	98
Ryc. 50 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w dichlorometanie ($\lambda=690$ nm).	99
Ryc. 51 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w pirydynie ($\lambda=695$ nm).....	99
Ryc. 52 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w izopropanolu ($\lambda=685$ nm).	99
Ryc. 53 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w acetonie ($\lambda=685$ nm).....	100
Ryc. 54 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w metanolu ($\lambda=686$ nm).....	100
Ryc. 55 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w dimetyloformamidzie ($\lambda=691$ nm).	100

Ryc. 56 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w acetonitrylu ($\lambda=687$ nm).....	101
Ryc. 57 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w dimetyloacetamidzie ($\lambda=689$ nm).....	101
Ryc. 58 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc1 w 0,5% wodnym roztworze DMSO ($\lambda=647$ nm).....	101
Ryc. 59 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w 1,4-dioksanie ($\lambda=738$ nm).....	103
Ryc. 60 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w toluenie ($\lambda=731$ nm).....	103
Ryc. 61 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w trietyloaminie ($\lambda=726$ nm).....	104
Ryc. 62 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w eterze dietylowym ($\lambda=730$ nm).....	104
Ryc. 63 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w dimetylosulfotlenku ($\lambda=744$ nm).....	104
Ryc. 64 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w chloroformie ($\lambda=739$ nm).....	105
Ryc. 65 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w octanie etylu ($\lambda=737$ nm).....	105
Ryc. 66 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w tetrahydrofuranie ($\lambda=732$ nm).....	105
Ryc. 67 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w dichlorometanie ($\lambda_1=761$ nm, $\lambda_2=802$ nm).....	106
Ryc. 68 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w pirydynie ($\lambda=738$ nm).....	106
Ryc. 69 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w acetonie ($\lambda=733$ nm).....	106
Ryc. 70 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w metanolu ($\lambda=733$ nm).....	107
Ryc. 71 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w dimetyloformamidzie ($\lambda=738$ nm).....	107
Ryc. 72 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w acetonitrylu ($\lambda=735$ nm).....	107
Ryc. 73 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w dimetyloacetamidzie ($\lambda=737$ nm).....	108
Ryc. 74 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc2 w wodzie ($\lambda=751$ nm).....	108
Ryc. 75 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w 1,4-dioksanie ($\lambda=737$ nm).....	110

Ryc. 76 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w toluenie ($\lambda=737$ nm).....	110
Ryc. 77 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w trietyloaminie ($\lambda=727$ nm).....	111
Ryc. 78 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w eterze dietylowym ($\lambda=729$ nm).....	111
Ryc. 79 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w dimetylosulfotlenku ($\lambda=746$ nm).....	111
Ryc. 80 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w chloroformie ($\lambda=739$ nm).....	112
Ryc. 81 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w octanie etylu ($\lambda=731$ nm).....	112
Ryc. 82 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w tetrahydrofuranie ($\lambda=734$ nm).....	112
Ryc. 83 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w dichlorometanie ($\lambda_1=739$ nm, $\lambda_2=805$ nm).....	113
Ryc. 84 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w pirydynie ($\lambda=743$ nm).....	113
Ryc. 85 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w izopropanolu ($\lambda=731$ nm).....	113
Ryc. 86 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w acetonie ($\lambda=732$ nm).....	114
Ryc. 87 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w metanolu ($\lambda=735$ nm).....	114
Ryc. 88 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w dimetyloformamidzie ($\lambda=738$ nm).....	114
Ryc. 89 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3	115
Ryc. 90 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3	115
Ryc. 91 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc3 w wodzie ($\lambda=755$ nm).....	115
Ryc. 92 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w dimetylosulfotlenku ($\lambda=748$ nm).....	117
Ryc. 93 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w metanolu ($\lambda=729$ nm).....	117
Ryc. 94 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w dimetyloformamidzie ($\lambda=730$ nm).....	118
Ryc. 95 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w acetonitrylu ($\lambda=732$ nm).....	118
Ryc. 96 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w dimetyloacetamidzie ($\lambda=735$ nm).....	118

Ryc. 97 Elektronowe widma absorpcji oraz wykres zależności $A=f(c)$ ftalocyjaniny Pc4 w wodzie ($\lambda=735$ nm).....	119
Ryc. 98 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMSO, uzyskane po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=695$ nm.	122
Ryc. 99 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc1 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=690$ nm w roztworze DMF.	122
Ryc. 100 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc2 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=744$ nm w roztworze DMSO.	123
Ryc. 101 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc2 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=738$ nm w roztworze DMSO.	123
Ryc. 102 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc3 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=746$ nm w roztworze DMSO.	124
Ryc. 103 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc3 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=738$ nm w roztworze DMF.	124
Ryc. 104 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc4 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=738$ nm w roztworze DMSO.	125
Ryc. 105 Widmo absorpcji i emisji ftalocyjaniny Pc4 uzyskane przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{Wz}=325$ oraz $\lambda_{Wz}=730$ nm w roztworze DMF.	125
Ryc. 106 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc1 i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=696$ nm.	129
Ryc. 107 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc1 i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=691$ nm.	129
Ryc. 108 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{max}=696$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc1 i DPBF.	130
Ryc. 109 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{max}=691$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc1 i DPBF.	130
Ryc. 110 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=745$ nm.	132
Ryc. 111 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=738$ nm.	132
Ryc. 112 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{max}=745$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF.	133
Ryc. 113 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{max}=738$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc2 i DPBF.	133
Ryc. 114 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=746$ nm.	135
Ryc. 115 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{max}=738$ nm.	135
Ryc. 116 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{max}=746$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF.	136

Ryc. 117 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=738$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc3 i DPBF.....	136
Ryc. 118 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF w roztworze DMSO, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\max}=741$ nm.....	138
Ryc. 119 Zmiany w widmie elektronowym mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF w roztworze DMF, w czasie ekspozycji na promieniowanie o długości fali $\lambda_{\max}=730$ nm.....	138
Ryc. 120 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMSO, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=746$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF.....	139
Ryc. 121 Wykres zależności $\ln A_0/A=f(t)$ procesu rozkładu DPBF pod wpływem 1O_2 , w roztworze DMF, podczas naświetlania promieniowaniem o $\lambda_{\max}=730$ nm mieszaniny ftalocyjaniny Pc4 i DPBF.....	139
Ryc. 122 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	143
Ryc. 123 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	143
Ryc. 124 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMF; czas naświetlania 600 s.....	144
Ryc. 125 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMF; czas naświetlania 600 s.....	144
Ryc. 126 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	146
Ryc. 127 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	146
Ryc. 128 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMF; czas naświetlania 240 s.....	147
Ryc. 129 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMF; czas naświetlania 240 s.....	147
Ryc. 130 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	149
Ryc. 131 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	149
Ryc. 132 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMF; czas naświetlania 360 s.....	150
Ryc. 133 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMF; czas naświetlania 360 s.....	150
Ryc. 134 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	152
Ryc. 135 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze DMSO; czas naświetlania 600 s.....	152
Ryc. 136 Zmiany przebiegu elektronowych widm absorpcji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze wodnym; czas naświetlania 40 s.....	153

Ryc. 137 Zależność $\ln A/A_0 = f(t)$ podczas fotodegradacji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze wodnym; czas naświetlania 40 s.....	153
Ryc. 138 Schemat przedstawiający syntezę ftalocyjanin Pc1-Pc4 (DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, PeOH – 1-pentanol) [210].....	165
Ryc. 139 Elektronowe widma absorpcji ftalocyjanin w roztworach DMF. Lewy panel: ZnPc - niepodstawiona ftalocyjanina cynkowa. Prawy panel: MgPc - niepodstawiona ftalocyjanina magnezowa..	169
Ryc. 140 Zdjęcia uzyskane techniką mikroskopii fluorescencyjnej. Wizualizacja wewnątrzkomórkowa ftalocyjaniny Pc1: panel 1) komórki wybarwione barwnikiem Mitotracker Green i Hoechst; panel 2) czerwona fluorescencja ftalocyjaniny Pc1; panel 3) nałożone fotografie panelu 1 i 2 (powiększenie obiektywu 20x).....	182
Ryc. 141 Fotografia liposomów Pc1:POPC:PG uzyskana metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej z zastosowaniem techniki barwienia negatywnego.	183
Ryc. 142 Zależność przeżywalności komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 od stężenia ftalocyjaniny Pc1 w formie wolnej i enkapsulowanej w liposomy.....	183
Ryc. 143 Zmiany morfologii komórek HSC3 po upływie 24 h od zakończenia naświetlania hodowli, inkubowanej z Pc1 o stężeniu 0,01, 0,05 i 0,5 μM : A) fotografie uzyskane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego w wyniku wybarwienia komórek markerami SYTO Green (zielona fluorescencja) i Cell Trace Calcein red-orange AM (czerwona fluorescencja) B) fotografie uzyskane w trybie kontrastowo-fazowym (powiększenie obiektywu 20x).	184
Ryc. 144 Zmiany wartości absorbancji ekstraktów wyizolowanych z komórek, po upływie 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 24 h inkubacji ftalocyjaniny Pc1 z komórkami HSC3.....	185

XI. WYKAZ TABEL

Tabela 1 Przykłady ligandów wykorzystywanych do otrzymywania liposomów stosowanych w terapii celowanej określonych typów nowotworów.....	32
Tabela 2 Produkty zarejestrowane oraz znajdujące się w badaniach klinicznych, zawierające liposomalną postać substancji leczniczej, posiadającej wskazania w terapii przeciwnowotworowej.....	38
Tabela 3 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.....	64
Tabela 4 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.....	64
Tabela 5 Skład oraz gradient stężenia fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.....	64
Tabela 6 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem I układu chromatograficznego.....	65
Tabela 7 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem II układu chromatograficznego.....	66
Tabela 8 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc1 z zastosowaniem III układu chromatograficznego.....	67
Tabela 9 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.....	68
Tabela 10 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.....	68
Tabela 11 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.....	68
Tabela 12 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2 z zastosowaniem I układu chromatograficznego.....	69
Tabela 13 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2 z zastosowaniem II układu chromatograficznego.....	70
Tabela 14 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc2 z zastosowaniem III układu chromatograficznego.....	71
Tabela 15 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym I.....	72
Tabela 16 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym II.....	72
Tabela 17 Skład oraz gradient stężeń fazy ruchomej w układzie chromatograficznym III.....	72
Tabela 18 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3 z zastosowaniem I układu chromatograficznego.....	73
Tabela 19 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3 z zastosowaniem II układu chromatograficznego.....	74
Tabela 20 Wyniki analizy chromatograficznej ftalocyjaniny Pc3 z zastosowaniem III układu chromatograficznego.....	75
Tabela 21 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc1	77
Tabela 22 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc2	78
Tabela 23 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc3	79
Tabela 24 Molowe współczynniki absorpcji ftalocyjaniny Pc4	80
Tabela 25 Charakterystyka rozpuszczalników zastosowanych w analizie przebiegu widm ftalocyjanin Pc1-4 . Jako kryterium podziału rozpuszczalników na niepolarne i polarne, przyjęto wartość stałej dielektrycznej, ϵ (niepolarne – $\epsilon < 15$, polarne – $\epsilon > 15$).....	82

Tabela 26 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny Pc1 wykreślonych w 15 rozpuszczalnikach.....	84
Tabela 27 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny Pc2 , wykreślonych w 16 rozpuszczalnikach.....	86
Tabela 28 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny Pc3 wykreślonych w 17 rozpuszczalnikach.....	88
Tabela 29 Położenie maksimów absorpcji pasma Soret'a i pasma Q w elektronowych widmach absorpcji ftalocyjaniny Pc4 wykreślonych w 6 rozpuszczalnikach.....	90
Tabela 30 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyjaniny Pc1 wraz z analizą statystyczną.....	102
Tabela 31 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyjaniny Pc2 wraz z analizą statystyczną.....	109
Tabela 32 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyjaniny Pc3 wraz z analizą statystyczną.....	116
Tabela 33 Parametry krzywych wzorcowych ftalocyjaniny Pc4 wraz z analizą statystyczną.....	120
Tabela 34 Maksima absorpcji i emisji widm ftalocyjanin Pc1-4 wykreślonych w roztworze DMSO, przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{Wz} = 325$ nm oraz wartości przesunięcia Stokes'a.....	121
Tabela 35 Maksima absorpcji i emisji widm ftalocyjanin Pc1-4 wykreślonych w roztworze DMF, przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{Wz} = 325$ nm oraz wartość przesunięcia Stokes'a.....	121
Tabela 36 Wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_F) wyznaczona metodą porównawczą dla ftalocyjanin Pc1-4 w roztworze DMSO i DMF, przy wzbudzeniu w paśmie Soreta, przy długości fali $\lambda_{Ex}=325$ nm.....	126
Tabela 37 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc1 podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.....	131
Tabela 38 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc2 podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.....	134
Tabela 39 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc3 podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.....	137
Tabela 40 Parametry kinetyczne rozkładu DPBF podczas generowania tlenu singletowego przez ftalocyjaninę Pc4 podczas naświetlania w roztworze DMSO i DMF.....	140
Tabela 41 Wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego Φ_{Δ} przez ftalocyjaniny Pc1-4 w roztworze DMSO i DMF.....	141
Tabela 42 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny Pc1 w roztworze DMSO i DMF.....	145
Tabela 43 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny Pc2 w roztworze DMSO i DMF.....	148
Tabela 44 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny Pc3 w roztworze DMSO i DMF.....	151
Tabela 45 Parametry kinetyczne fotodegradacji ftalocyjaniny Pc4 w roztworze DMSO i roztworze wodnym.....	154
Tabela 46 Skład lipidowy i charakterystyka liposomów wykorzystywanych do inkorporowania ftalocyjanin Pc1-4	156
Tabela 47 Skład pożywek do hodowli komórkowych linii HSC3 i H413.....	157
Tabela 48 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności ciemnej ftalocyjanin Pc1-4 w formie wolnej (Pc) i liposomalnej (lipPc).....	160
Tabela 49 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności jasnej ftalocyjanin Pc1-4 w formie wolnej (Pc) i liposomalnej (lipPc).....	161

Tabela 50 Przeżywalność komórek raka kolczystokomórkowego HSC3 i H413 w badaniu toksyczności ciemnej i jasnej dla kontroli 0,5% DMSO i liposomów bez inkorporowanych ftalocyjanin	162
---	-----

XII. PIŚMIENICTWO

- [1] Ali H, van Lier JE. Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers. *Chem Rev* 1999;99:2379–450.
- [2] Kadish KM, Smith KM, Guillard R. Handbook of porphyrin science: with applications to chemistry, physics, materials science, engineering, biology and medicine. World Scientific;2010.
- [3] Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C* 2011;12:46–67.
- [4] <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/photodynamic> - na dzień 10.03.2014.
- [5] Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. *Photodiagn Photodyn Ther* 2008;5:19–28.
- [6] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther* 2004;1:279–93.
- [7] Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009;24:259–68.
- [8] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin* 2011;61:250–81.
- [9] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther* 2005;2:1–23.
- [10] Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol* 2006;2:53–71.
- [11] Mitra A, Stables GI. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagn Photodyn Ther* 2006;3:116–27.
- [12] Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45:195–214.
- [13] Zaak D, Wieland WF, Stief CG, Burger M. Routine use of photodynamic diagnosis of bladder cancer: practical and economic issues. *Eur Urol Suppl* 2008;7:536–41.
- [14] Kostron H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. *Methods Mol Biol* 2010;635:261–80
- [15] Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. *Cent Eur J Biol* 2010;5:400–6.
- [16] Van Duijnhoven FH, Aalbers RIJM, Rovers JP, Terpstra OT, Kuppen PJK. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology* 2003;207:105–13.
- [17] Canti G, Calastretti A, Bevilacqua A, Reddi E, Palumbo G, Nicolin A. Combination of photodynamic therapy, immunotherapy, chemotherapy in murine leukemia. *Neoplasma* 2010;57:184–8.
- [18] Kimura T, Takatsuki S, Miyoshi S, Fukumoto K, Takahashi M, Ogawa E, et al. nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:1025–31.
- [19] Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694–707.
- [20] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889–905.
- [21] Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn Photodyn Ther* 2010;7:61–75.
- [22] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999;4:507–17.
- [23] Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:1–28.
- [24] Garland MJ, Cassidy CM, Woolfson D, Donnelly RF. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future Med Chem* 2009;1:667–91.
- [25] Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002;66:89–106.
- [26] Lovell JF, Liu TWB, Chen J, Zheng G. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem Rev* 2010;110:2839–57.
- [27] Derycke A, de Witte P. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:17–30.
- [28] Chen B, Pogue BW, Hasan T. Liposomal delivery of photosensitizing agents. *Expert Opin Drug Deliv* 2005;2:477–87.
- [29] Jin CS, Zheng G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg Med* 2011;43:734–48.
- [30] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004;303:1818–22.

- [31] Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:104–20.
- [32] O'Driscoll CM, Griffin BT. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility—The potential impact of lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:617–24.
- [33] Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol* 1964;8:660–668.
- [34] Bangham AD, Hill MW, Miller NGA. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. Plenum Press; 1974.
- [35] Düzgüneş N, Gregoriadis G. Introduction: The origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Methods Enzymol.*, Academic Press; 2005;391:1–3.
- [36] Müller RH, Hildebrand GE, Jachowicz R, Kubis AA, Klawe J, Bröker M. *Technologia nowoczesnych postaci leków*. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2003.
- [37] Kulkarni SB, Betageri GV, Singh M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J Microencapsul* 1995;12:229–46.
- [38] Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm* 1997;154:123–40.
- [39] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Szweykowska-Kulińska Z, Jarmołowski A, Augustyniak H. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN; 2009.
- [40] Spanjer HH, Scherphof GL. Targeting of lactosylceramide-containing liposomes to hepatocytes *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1983;734:40–7.
- [41] Robb ID. *Specialist Surfactants*. Springer; 1996.
- [42] Lasic DD. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J* 1988;256:1-1.
- [43] Lasic DD. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier; 1993.
- [44] Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv* 2011;2011:1–9.
- [45] Huang CH. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 1969;8:344–52.
- [46] Barenholz Y, Amselem S, Lichtenberg D. A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - French press. *FEBS Lett* 1979;99:210–4.
- [47] Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1979;557:9–23.
- [48] Schneider T, Sachse A, Röbling G, Brandl M. Large-scale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device. *Drug Dev Ind Pharm* 1994;20:2787–807.
- [49] Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1973;298:1015–9.
- [50] Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1976;443:629–34.
- [51] Stano P, Bufali S, Pisano C, Bucci F, Barbarino M, Santaniello M, et al. Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method. *J Liposome Res* 2004;14:87–109.
- [52] Düzgüneş N. *Liposomes*. Academic Press; 2003.
- [53] Turánek J, Záluská D, Neca J. Linkup of a fast protein liquid chromatography system with a stirred thermostated cell for sterile preparation of liposomes by the proliposome-liposome method: application to encapsulation of antibiotics, synthetic peptide immunomodulators, and a photosensitizer. *Anal Biochem* 1997;249:131–9.
- [54] Turánek J, Kasná A, Záluská D, Neca J. Preparation of sterile liposomes by proliposome-liposome method. *Methods Enzymol* 2003;367:111–25.
- [55] Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphiphathic weak bases. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151:201–15.
- [56] Li X, Hirsh DJ, Cabral-Lilly D, Zirkel A, Gruner SM, Janoff AS, et al. Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1998;1415:23–40.
- [57] Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999;51:691–743.
- [58] Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994;269:2550–61.

- [59] Murray KD, Etheridge CJ, Shah SI, Matthews DA, Russell W, Gurling HM, et al. Enhanced cationic liposome-mediated transfection using the DNA-binding peptide mu (μ) from the adenovirus core. *Gene Ther* 2001;8:453–60.
- [60] Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – A Review (Part 1). *Trop J Pharm Res* 2013;12:255–64.
- [61] Perche F, Torchilin VP. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *J Drug Deliv* 2013;2013:1–32.
- [62] Storm G, Crommelin DJ. Liposomes: quo vadis? *Pharm Sci Technol Today* 1998;1:19–31.
- [63] Cattel L, Ceruti M, Dosio F. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *Tumori* 2003;89:237–49.
- [64] Senior J, Gregoriadis G. Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett* 1982;145:109–14.
- [65] Frank MM. The reticuloendothelial system and bloodstream clearance. *J Lab Clin Med* 1993;122:487–8.
- [66] Guo LS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN, Havel RJ. Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1980;21:993–1003.
- [67] Vemuri S, Yu CD, Degroot JS, Roosdorp N. *In vitro* interaction of sized and unsized liposome vesicles with high density lipoproteins. *Drug Dev Ind Pharm* 1990;16:1579–84.
- [68] Bakker-Woudenberg IAJM. Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;17:5–20.
- [69] Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1981;665:538–45.
- [70] Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, et al. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv* 2011;2011:1–19.
- [71] Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res* 1994;11:402–6.
- [72] Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:6949–53.
- [73] Zhuang J, Ping Q, Song Y, Qi J, Cui Z. Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of mitoxantrone liposomes. *Int J Nanomedicine* 2010;5:407–16.
- [74] Gradauer K, Vonach C, Leitinger G, Kolb D, Fröhlich E, et al. Chemical coupling of thiolated chitosan to preformed liposomes improves mucoadhesive properties. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2523–34.
- [75] Gobin AS, Rhea R, Newman RA, Mathur AB. Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. *Int J Nanomedicine* 2006;1:81–7.
- [76] Mu X, Zhong Z. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes. *Int J Pharm* 2006;318:55–61.
- [77] Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 1997;54 Suppl 4:15–21.
- [78] Tang J, Fu H, Kuang Q, Zhang L, Zhang Q, Liu Y, et al. Liposomes co-modified with cholesterol anchored cleavable PEG and octaarginines for tumor targeted drug delivery. *J Drug Target* 2014;9:doi:10.3109/1061186X.2013.875029.
- [79] Allen TM, Hansen C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1991;1068:133–41.
- [80] Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Controlled Release* 2001;74:47–61.
- [81] Zalipsky S, Qazen M, Walker JA, Mullah N, Quinn YP, Huang SK. New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine. *Bioconjug Chem* 1999;10:703–7.
- [82] Karathanasis E, Ayyagari AL, Bhavane R, Bellamkonda RV, Annapragada AV. Preparation of *in vivo* cleavable agglomerated liposomes suitable for modulated pulmonary drug delivery. *J Control Release* 2005;103:159–75.
- [83] Caelyx, INN-doxorubicin hydrochloride http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000089/WC500020180.pdf - stan na dzień 10.03.2014
- [84] Forssen E, Willis M. Ligand-targeted liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:249–71.
- [85] Salvati E, Re F, Sesana S, Cambianica I, Sancini G, Masserini M, et al. Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- β peptide: the chemical design affects the permeability across an *in vitro* model. *Int J Nanomedicine* 2013;8:1749–58.

- [86] Chen Y, Deng YJ, Hao YL. Surface modification of liposomes for cardiomyocytes targeting *in vitro*. *Pharmazie* 2005;60:238–40.
- [87] Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allémann E. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci* 2004;93:1980–92.
- [88] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:145–60.
- [89] Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992;79:2807–20.
- [90] Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. *In vivo* fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 2003;9:6551–9.
- [91] Gupta Y, Jain A, Jain P, Jain SK. Design and development of folate appended liposomes for enhanced delivery of 5-FU to tumor cells. *J Drug Target* 2007;15:231–40.
- [92] Zhang Z, Yao J. Preparation of irinotecan-loaded folate-targeted liposome for tumor targeting delivery and its antitumor activity. *AAPS PharmSciTech* 2012;13:802–10.
- [93] Moret F, Scheglmann D, Reddi E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC). *Photochem Photobiol Sci* 2013;12:823.
- [94] He X, Na MH, Kim JS, Lee GY, Park JY, Hoffman AS, et al. A novel peptide probe for imaging and targeted delivery of liposomal doxorubicin to lung tumor. *Mol Pharm* 2011;8:430–8.
- [95] Jayanna PK, Torchilin VP, Petrenko VA. Liposomes targeted by fusion phage proteins. *Nanomed Nanotechnol* 2009;5:83–9.
- [96] Paliwal SR, Paliwal R, Mishra N, Mehta A, Vyas SP. A novel cancer targeting approach based on estrone anchored stealth liposome for site-specific breast cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:343–53.
- [97] Qin Y, Song QG, Zhang ZR, Liu J, Fu Y, He Q, et al. Ovarian tumor targeting of docetaxel-loaded liposomes mediated by luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *In vivo* distribution in nude mice. *Arzneimittelforschung* 2008;58:529–34.
- [98] Bagari R, Bansal D, Gulbake A, Jain A, Soni V, Jain SK. Chondroitin sulfate functionalized liposomes for solid tumor targeting. *J Drug Target* 2011;19:251–7.
- [99] Qhattal HSS, Liu X. Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Mol Pharm* 2011;8:1233–46.
- [100] Zhou X, Zhang M, Yung B, Li H, Zhou C, Lee LJ, et al. Lactosylated liposomes for targeted delivery of doxorubicin to hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomed* 2012;7:5465–74.
- [101] Wang K, Na MH, Hoffman AS, Shim G, Han SE, Oh YK, et al. *In situ* dose amplification by apoptosis-targeted drug delivery. *J Control Release* 2011;154:214–7.
- [102] Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, et al. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2005;1669:69–74.
- [103] Li X, Ding L, Xu Y, Wang Y, Ping Q. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. *Int J Pharm* 2009;373:116–23.
- [104] Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:161–9.
- [105] Kobayashi T, Ishida T, Okada Y, Ise S, Harashima H, Kiwada H. Effect of transferrin receptor targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *Int J Pharm* 2007;329:94–102.
- [106] Derycke ASL, De Witte PAM. Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. *Int J Oncol* 2002;20:181–7.
- [107] Gijssens A, Derycke ASL, Missiaen L, De Vos D, Huwyler J, Eberle A, et al. Targeting of the photocytotoxic compound AlPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. *Int J Cancer J Int Cancer* 2002;101:78–85.
- [108] Derycke ASL, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, De Vos D, Kasran A, et al. Transferrin conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1620–30.
- [109] Paszko E, Vaz GMF, Ehrhardt C, Senge MO. Transferrin conjugation does not increase the efficiency of liposomal Foscan during *in vitro* photodynamic therapy of oesophageal cancer. *Eur J Pharm Sci* 2013;48:202–10.
- [110] Oussoren C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:143–56.
- [111] Fujimoto Y, Okuhata Y, Tyngi S, Namba Y, Oku N. Magnetic resonance lymphography of profundus lymph nodes with liposomal gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid. *Biol Pharm Bull* 2000;23:97–100.

- [112] Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Wu W. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, *in vitro* characterization, and improved protection against enzymatic degradation. *Int J Nanomed* 2011;6:1155–66.
- [113] Guan P, Lu Y, Qi J, Niu M, Lian R, Hu F, et al. Enhanced oral bioavailability of cyclosporine A by liposomes containing a bile salt. *Int J Nanomed* 2011;6:965–74.
- [114] Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Morimoto K, Kakemi M, Yamashita S, et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: Improvement of stability of insulin in GI tract. *Int J Pharm* 1997;157:73–80.
- [115] Wu Z, Ping Q, Wei Y, Lai J. Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:966–72.
- [116] Jain S, Patil SR, Swarnakar NK, Agrawal AK. Oral delivery of doxorubicin using novel polyelectrolyte stabilized liposomes (layersomes). *Mol Pharm* 2012;9:2626–35.
- [117] Channarong S, Chaicumpa W, Sinchaipanid N, Mitrevej A. Development and evaluation of chitosan coated liposomes for oral DNA vaccine: the improvement of Peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. *AAPS PharmSciTech* 2011;12:192–200.
- [118] Watarai S, Iwase T, Tajima T, Yuba E, Kono K. Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer modified liposomes as a vaccine carrier. *Sci World J* 2013;2013:1–7.
- [119] Gaspar MM, Bakowsky U, Ehrhardt C. Inhaled liposomes—current strategies and future challenges. *J Biomed Nanotechnol* 2008;4:245–57.
- [120] Saari M, Vidgren MT, Koskinen MO, Turjanmaa VM, Nieminen MM. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. *Int J Pharm* 1999;181:1–9.
- [121] Darwis Y, Kellaway IW. Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. *Int J Pharm* 2001;215:113–21.
- [122] Desai TR, Hancock REW, Finlay WH. A facile method of delivery of liposomes by nebulization. *J Control Release* 2002;84:69–78.
- [123] Suarez S, Gonzalez-Rothi RJ, Schreier H, Hochhaus G. Effect of dose and release rate on pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetate phosphate. *Pharm Res* 1998;15:461–5.
- [124] Ten RM, Anderson PM, Zein NN, Temesgen Z, Clawson ML, Weiss W. Interleukin-2 liposomes for primary immune deficiency using the aerosol route. *Int Immunopharmacol* 2002;2:333–44.
- [125] Yaksh TL, Provencher JC, Rathbun ML, Myers RR, Powell H, Richter P, et al. Safety assessment of encapsulated morphine delivered epidurally in a sustained-release multivesicular liposome preparation in dogs. *Drug Deliv* 2000;7:27–36.
- [126] Hung O et al. Phase Ib clinical trial of aerosolized liposome encapsulated fentanyl (AeroLEFTM). *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:P4.
- [127] Kleemann E, Schmehl T, Gessler T, Bakowsky U, Kissel T, Seeger W. Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm Res* 2007;24:277–87.
- [128] Maghraby GMME, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol* 2006;58:415–29.
- [129] Maghraby GMME, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci* 2008;34:203–22.
- [130] Rajan R, Jose S, Mukund VPB, Vasudevan DT. Transferosomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *J Adv Pharm Technol Res* 2011;2:138–43.
- [131] Eichenfield LF, Funk A, Fallon-Friedlander S, Cunningham BB. A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% liposomal lidocaine) as compared with eutectic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. *Pediatrics* 2002;109:1093–9.
- [132] Franz-Montan M, Silva ALR, Cogo K, Bergamaschi C de C, Volpato MC, Ranali J, et al. Liposome encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg* 2007;104:1528–31.
- [133] Layegh P, Rajabi O, Jafari MR, Emamgholi Tabar Malekshah P, Moghiman T, Ashraf H, et al. Efficacy of topical liposomal amphotericin B versus intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res* 2011;2011:doi:10.1155/2011/656523.
- [134] Glavas-Dodov M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Calis S, Simonoska M, Hincal AA. 5-Fluorouracil in topical liposome gels for anticancer treatment—formulation and evaluation. *Acta Pharm* 2003;53:241–50.
- [135] Bhatia A, Kumar R, Katare OP. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and *in vitro* evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2004;7:252–9.

- [136] Visudyne, INN-verteporfin - http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_Product_Information/human/000305/WC500052407.pdf - stan na dzień 10.03.2014
- [137] Dragicevic-Curic N, Fahr A. Liposomes in topical photodynamic therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2012;9:1015–32.
- [138] Casas A, Batlle A. Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents* 2002;2:465–75.
- [139] Pierre MB, Tedesco AC, Marchetti JM, Bentley MVL. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. *BMC Dermatol* 2001;1:5.
- [140] Oh EK, Jin SE, Kim JK, Park JS, Park Y, Kim CK. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. *Eur J Pharm Sci* 2011;44:149–57.
- [141] Johansson A, Svensson J, Bendsoe N, Svanberg K, Alexandratou E, Kyriazi M, et al. Fluorescence and absorption assessment of a lipid mTHPC formulation following topical application in a nonmelanotic skin tumor model. *J Biomed Opt* 2007;12:1-9.
- [142] Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and *in vitro* skin penetration studies. *J Control Release* 2008;127:59–69.
- [143] Ježek P, Nekvasil M, Škobisová E, Urbánková E, Jirsa M, Zadinová M, et al. Experimental photodynamic therapy with meso-tetrakisphenylporphyrin (TPP) in liposomes leads to disintegration of human amelanotic melanoma implanted to nude mice. *Int J Cancer* 2003;103:693–702.
- [144] Xiao Z, Owen RJ, Liu W, Tulip J, Brown K, Woo T, et al. Lipophilic photosensitizer administration via the prostate arteries for photodynamic therapy of the canine prostate. *Photodiagn Photodyn Ther* 2010;7:106–14.
- [145] Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1973;36:292–6.
- [146] Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:36–48.
- [147] Gregoriadis G. Overview of liposomes. *J Antimicrob Chemother* 1991;28 Suppl B:39–48.
- [148] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000;65:271–84.
- [149] Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JLS. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res* 2003;20:1337–50.
- [150] Nevozhay D, Kańska U, Budzyńska R, Boratyński J. Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy Hig Med Dosw* 2006;61:350–60.
- [151] Barenholz Y, Cohen R. Rational design of amphiphile-based drug carriers and sterically stabilized carriers. *J Liposome Res* 1995;5:905–32.
- [152] PhotoBarr Public statement on Withdrawal - http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000493/WC500040354.pdf - stan na dzień 10.03.2014
- [153] Spikes JD. A preliminary comparison of the photosensitizing properties of porphyrins in aqueous solution and liposomal systems. *Adv Exp Med Biol* 1983;160:181–92.
- [154] Jori G, Reddi E, Cozzani I, Tomio L. Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 1986;53:615–21.
- [155] Jiang F, Lilge L, Logie B, Li Y, Chopp M. Photodynamic therapy of 9L gliosarcoma with liposome delivered photofrin. *Photochem Photobiol* 1997;65:701–6.
- [156] Ricchelli F, Jori G, Gobbo S, Tronchin M. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991;1065:42–8.
- [157] Postigo F, Mora M, De Madariaga MA, Nonell S, Sagristá ML. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *Int J Pharm* 2004;278:239–54.
- [158] Nawalany K, Rusin A, Kepczyński M, Mikhailov A, Kramer-Marek G, Snietura M, et al. Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: *in vitro* studies. *J Photochem Photobiol B* 2009;97:8–17.
- [159] Ferro S, Ricchelli F, Monti D, Mancini G, Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1026–34.
- [160] Gardner DM, Taylor VM, Cedeno DL, Padhee S, Robledo SM, Jones MA, et al. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. *Photochem Photobiol* 2010;86:645–52.

- [161] De Leeuw J, van der Beek N, Bjerring P, Martino Neumann H. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid 0.5% liposomal spray and intense pulsed light in combination with topical keratolytic agents. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:460–9.
- [162] Yeung CK, Shek SY, Yu CS, Kono T, Chan HH. Liposome-encapsulated 0.5% 5-aminolevulinic acid with intense pulsed light for the treatment of inflammatory facial acne: a pilot study. *Dermatol Surg* 2011;37:450–9.
- [163] Bjerring P, Christiansen K, Troilius A, Bekhor P, de Leeuw J. Skin fluorescence controlled photodynamic photorejuvenation. *Lasers Surg Med* 2009;41:327–36.
- [164] Damoiseau X, Schuitmaker HJ, Lagerberg JW, Hoebeke M. Increase of the photosensitizing efficiency of the bacteriochlorin a by liposome-incorporation. *J Photochem Photobiol B* 2001;60:50–60.
- [165] Damoiseau X, Tfibel F, Hoebeke M, Fontaine-Aupart MP. Effect of aggregation on bacteriochlorin a triplet-state formation: a laser flash photolysis study. *Photochem Photobiol* 2002;76:480–5.
- [166] Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) – a second-generation photosensitizer: photochemistry and photobiology. *Photochem Photobiol* 2011;87:1240–96.
- [167] Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the mesotetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J* 1989;261:277–80.
- [168] Foscan, INN-temoporfin -http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000318/WC500024398.pdf - stan na dzień 10.03.2014
- [169] Kuntsche J, Freisleben I, Steiniger F, Fahr A. Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:305–15.
- [170] Compagnin C, Moret F, Celotti L, Miotto G, Woodhams JH, MacRobert AJ, et al. Metatetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded liposomes sterically stabilised with poly(ethylene glycol) of different length and density: characterisation, *in vitro* cellular uptake and phototoxicity. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:1751–59.
- [171] Reshetov V, Zorin V, Siupa A, D’Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction. *Photochem Photobiol* 2012;88:1256–64.
- [172] Kachatkou D, Sasnouski S, Zorin V, Zorina T, D’Hallewin M-A, Guillemin F, et al. Unusual photoinduced response of mTHPC liposomal formulation (Foslip). *Photochem Photobiol* 2009;85:719–24.
- [173] Petri A, Yova D, Alexandratou E, Kyriazi M, Rallis M. Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan® and Fospeg in a human prostate cancer cell line. *Photodiagn Photodyn Ther* 2012;9:344–54.
- [174] Reshetov V, Kachatkou D, Shmigol T, Zorin V, D’Hallewin M-A, Guillemin F, et al. Redistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) from conventional and PEGylated liposomes to biological substrates. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:911–9.
- [175] Hefesha H, Loew S, Liu X, May S, Fahr A. Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. *J Control Release* 2011;150:279–86.
- [176] Gyenge EB, Hiestand S, Graefe S, Walt H, Maake C. Cellular and molecular effects of the liposomal mTHPC derivative Foslipos in prostate carcinoma cells *in vitro*. *Photodiagn Photodyn Ther* 2011;8:86–96.
- [177] Besic Gyenge E, Forny P, Lüscher D, Laass A, Walt H, Maake C. Effects of hypericin and a chlorin based photosensitizer alone or in combination in squamous cell carcinoma cells in the dark. *Photodiagn Photodyn Ther* 2012;9:321–31.
- [178] Pegaz B, Debeve E, Ballini JP, Wagnières G, Spaniol S, Albrecht V, et al. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Eur J Pharm Sci* 2006;28:134–40.
- [179] Bovis MJ, Woodhams JH, Loizidou M, Scheglmann D, Bown SG, MacRobert AJ. Improved *in vivo* delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *J Control Release* 2012;157:196–205.
- [180] De Visscher S, Robinson DJ, Kaščáková S, de Bruijn R, Poeg A, Sterenborg HJ, et al. Fluorescence kinetics of Foscan, Fospeg and Foslip in the window-chamber model. *Head Neck Oncol* 2009;1:O18.
- [181] Bendsoe N, Persson L, Johansson A, Axelsson J, Svensson J, Gräfe S, et al. Fluorescence monitoring of a topically applied liposomal Temoporfin formulation and photodynamic therapy of non-pigmented skin malignancies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2007;26:117–26.

- [182] D'Hallewin MA, Kochetkov D, Viry-Babel Y, Leroux A, Werkmeister E, Dumas D, et al. Photodynamic therapy with intratumoral administration of Lipid-Based mTHPC in a model of breast cancer recurrence. *Lasers Surg Med* 2008;40:543–9.
- [183] Hansch A, Frey O, Gajda M, Susanna G, Boettcher J, Bräuer R, et al. Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints. *Lasers Surg Med* 2008;40:265–72.
- [184] Richter AM, Kelly B, Chow J, Liu DJ, Towers GH, Dolphin D, et al. Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:1327–32.
- [185] Aveline BM, Hasan T, Redmond RW. The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA). *J Photochem Photobiol B* 1995;30:161–9.
- [186] Richter AM, Waterfield E, Jain AK, Canaan AJ, Allison BA, Levy JG. Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model. *Photochem Photobiol* 1993;57:1000–6.
- [187] Chowdhary RK, Shariff I, Dolphin D. Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:13–9.
- [188] Sekkat N, Bergh H van den, Nyokong T, Lange N. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. *Molecules* 2011;17:98–144.
- [189] Isele U, van Hoogevest P, Leuenberger H, Capraro H-G, Schieweck K. Pharmaceutical development of CGP 55847: a liposomal Zn-phthalocyanine formulation using a controlled organic solvent dilution method. *Proc SPIE* 1994;2078:397–403.
- [190] De Oliveira CA, Kohn LK, Antonio MA, Carvalho JE, Moreira MR, Machado AEH, et al. Photoinactivation of different human tumor cell lines and sheep red blood cells *in vitro* by liposome bound Zn(II) Phthalocyanine: Effects of cholesterol. *J Photochem Photobiol B* 2010;100:92–9.
- [191] Maranhão DS, De Lima RG, Primo FL, Da Silva RS, Tedesco AC. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. *Photochem Photobiol* 2009;85:705–13.
- [192] Bolfarini GC, Siqueira-Moura MP, Demets GJF, Morais PC, Tedesco AC. *In vitro* evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma. *J Photochem Photobiol B* 2012;115:1–4.
- [193] Aygun A, Torrey K, Kumar A, Stephenson LD. Investigation of factors affecting controlled release from photosensitive DMPC and DSPC liposomes. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;167:743–57.
- [194] Decreau R, Richard MJ, Verrando P, Chanon M, Julliard M. Photodynamic activities of silicon phthalocyanines against achromic M6 melanoma cells and healthy human melanocytes and keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 1999;48:48–56.
- [195] Morgan J, Gray AG, Huehns ER. Specific targeting and toxicity of sulphonated aluminium phthalocyanine photosensitised liposomes directed to cells by monoclonal antibody *in vitro*. *Br J Cancer* 1989;59:366–70.
- [196] Gupta S, Dwarakanath BS, Chaudhury NK, Mishra AK, Muralidhar K, Jain V. *In vitro* and *in vivo* targeted delivery of photosensitizers to the tumor cells for enhanced photodynamic effects. *J Cancer Res Ther* 2011;7:314–24.
- [197] Qualls MM, Thompson DH. Chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate delivered via acid-labile diplasmeylcholine-folate liposomes: intracellular localization and synergistic phototoxicity. *Int J Cancer J Int Cancer* 2001;93:384–92.
- [198] Bayliss NS. The effect of the electrostatic polarization of the solvent on electronic absorption spectra in solution. *J Chem Phys* 1950;18:292.
- [199] Yousaf M, Lazzouni M. Q-band electronic absorption of silicon 2,3-naphthalocyanine bis(trihexylsilyloxy) in various solvents. *Dyes Pigments* 1995;28:69–75.
- [200] Sobotta L, Fita P, Szczołko W, Wrotyński M, Wierchowski M, Gosłinski T, et al. Functional singlet oxygen generators based on porphyrazines with peripheral 2,5-dimethylpyrrol-1-yl and dimethylamino groups. *J Photochem Photobiol A* 2013;269:9–16.
- [201] Birks JB. *Photophysics of aromatic molecules*. Wiley-Interscience; 1970.
- [202] Ogunsipe A, Maree D, Nyokong T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *J Mol Struct* 2003;650:131–40.
- [203] Piskorz J, Skupin P, Lijewski S, Korpusinski M, Sciepora M, Konopka K, et al. Synthesis, physical-chemical properties and *in vitro* photodynamic activity against oral cancer cells of novel porphyrazines possessing fluoroalkylthio and dietherthio substituents. *J Fluor Chem* 2012;135:265–71.
- [204] Paula LF de, Santos RO, Menezes HD, Britto JR de, Vieira Jr JB, Gontijo Filho PP, et al. A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. *J Braz Chem Soc* 2010;21:694–700.

- [205] 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* 1989;18:498–501.
- [206] Prime SS, Nixon SVR, Crane IJ, Stone A, Matthews JB, Maitland NJ, et al. The behaviour of human oral squamous cell carcinoma in cell culture. *J Pathol* 1990;160:259–69.
- [207] Fields RD, Lancaster MV. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 1993;11:48–50.
- [208] Konopka K, Pretzer E, Felgner PL, Düzgüneş 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 Mol Cell Res* 1996;1312:186–96.
- [209] Lau JTF, Lo P-C, Fong W-P, Ng DKP. A Zinc(II) phthalocyanine conjugated with an oxaliplatin derivative for dual chemo- and photodynamic therapy. *J Med Chem* 2012;55:5446–54.
- [210] Szczołko Wojciech. Synteza, charakterystyka i właściwości biologiczne nowych układów porfirynoidowych o rozbudowanych grupach peryferyjnych. Rozprawa doktorska. Poznań;2013.
- [211] Barbachyn MR, Ford CW. Oxazolidinone structure–activity relationships leading to linezolid. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:2010–23.
- [212] Fish PV, Deur C, Gan X, Greene K, Hoople D, Mackenny M, et al. Design and synthesis of morpholine derivatives. SAR for dual serotonin and noradrenaline reuptake inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:2562–6.
- [213] Sladojevich F, Trabocchi A, Guarna A. Stereoselective cyclopropanation of serine- and threonine derived oxazines to access new morpholine-based scaffolds. *Org Biomol Chem* 2008;6:3328.
- [214] Cosimelli B, De Filippis MP, Dei D, Fantetti L, Jori G, Masini I, et al. Zinc-phthalocyanines and corresponding conjugates, their preparation and use in photodynamic therapy and as diagnostic agents. Google Patents; 1999.
- [215] Zhu Y-J, Huang J-D, Jiang X-J, Sun J-C. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and *in vitro* photodynamic activity. *Inorg Chem Commun* 2006;9:473–7.
- [216] Jiang Z, Shao J, Chen M, Wang J, Jia L. A novel SPE-HPLC method for simultaneous determination of selected sulfonated phthalocyanine zinc complexes in mouse plasma following cassette dosing. *The Analyst* 2013;138:4385–92.
- [217] Brykina GD, Uvarova MI, Shpigun OA. RP-HPLC of some metal phthalocyanines. *Microchim Acta* 1998;128:251–4.
- [218] Uvarova MI, Brykina GD, Shpigun OA. Porphyrins and phthalocyanines in high-performance liquid chromatography. *J Anal Chem* 2000;55:910–25.
- [219] http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m88105.html. - stan na dzień 10.03.2014
- [220] Sommerauer M, Rager C, Hanack M. Separation of 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrasubstituted phthalocyanines with newly developed HPLC phases. *J Am Chem Soc* 1996;118:10085–93.
- [221] Oliveira LT, Garcia GM, Kano EK, Tedesco AC, Mosqueira VCF. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. *J Pharm Biomed Anal* 2011;56:70–7.
- [222] Kadish KM, Smith KM, Guillard R. *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: spectroscopic and electrochemical characterization*. Elsevier; 2003.
- [223] Szczepaniak W. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN; 2004.
- [224] Fukuda T, Homma S, Kobayashi N. Deformed phthalocyanines: Synthesis and characterization of zinc phthalocyanines bearing phenyl substituents at the 1-, 4-, 8-, 11-, 15-, 18-, 22-, and/or 25-positions. *Chem Eur J* 2005;11:5205–16.
- [225] Ogata H, Higashi R, Kobayashi N. Electronic absorption spectra of substituted phthalocyanines in solution and as films. *J Porphyr Phthalocyanines* 2003;7:551–7.
- [226] Nemykin VN, Lukyanets EA. Synthesis of substituted phthalocyanines. *Ark J Org Chem* 2010;2010:136-208.
- [227] Chidawanyika W, Antunes E, Nyokong T. Synthesis and solvent effects on the photophysical properties of novel cadmium phenoxy phthalocyanines. *J Photochem Photobiol A* 2008;195:183–90.
- [228] Moeno S, Nyokong T. Solvent and central metal effects on the photophysical and photochemical properties of peripherally tetra mercaptopyridine substituted metallophthalocyanines. *J Photochem Photobiol A* 2009;203:204–10.
- [229] Reichardt C. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Wiley-VCH; 2011.
- [230] Maiti NC, Mazumdar S, Perisamy N. J- and H-aggregates of porphyrins with surfactants: fluorescence, stopped flow and electron microscopy studies. *J Porphyr Phthalocya* 1998;2:369–76.

- [231] Sessler JL, Jayawickramarajah J, Gouloumis A, Dan Pantos G, Torres T, Guldi DM. Guanosine and fullerene derived de-aggregation of a new phthalocyanine-linked cytidine derivative. *Tetrahedron* 2006;62:2123–31.
- [232] Niu L, Zhong C, Chen Z, Zhang Z, Li Z, Zhang F, et al. Novel azobenzene-phthalocyanine dyads—design of photo-modulated J-aggregation. *Chin Sci Bull* 2009;54:1169–75.
- [233] Kuznetsova NA, Gretsova NS, Derkacheva VM, Kaliya OL, Lukyanets EA. Sulfonated phthalocyanines: aggregation and singlet oxygen quantum yield in aqueous solutions. *J Porphyr Phthalocya* 2003;07:147–54.
- [234] Bıyıklođlu Z, akır V, akır D, Kantekin H. Crown ether-substituted water soluble phthalocyanines and their aggregation, electrochemical studies. *J Organomet Chem* 2014;749:18–25.
- [235] Huang X, Zhao F, Li Z, Huang L, Tang Y, Zhang F, et al. A novel self-aggregates of phthalocyanine based on Zn-O coordination. *Chem Lett* 2007;36:108–9.
- [236] Huang X, Zhao F, Li Z, Tang Y, Zhang F, Tung C-H. Self-assembled nanowire networks of aryloxy zinc phthalocyanines based on Zn–O coordination. *Langmuir* 2007;23:5167–72.
- [237] Erdogmuş A, Lütfi Ugur A, Memişođlu A, Erden İ. Synthesis, spectral and photophysical properties of novel phthalocyanines bearing bulky phenantroxy moiety. *J Lumin* 2013;134:483–90.
- [238] Paula Cormick M, Rovera M, Durantini EN. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J Photochem Photobiol A* 2008;194:220–9.
- [239] Kobayashi N, Ogata H, Nonaka N, Luk'yanets EA. Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. *Chem Eur J* 2003;9:5123–34.
- [240] Haynes WM, Lide DR, Bruno TJ. *CRC handbook of chemistry and physics a ready-reference book of chemical and physical data: 2013-2014*. CRC Press; 2013.
- [241] Suhling K, Davis DM, Phillips D. The influence of solvent viscosity on the fluorescence decay and time-resolved anisotropy of green fluorescent protein. *J Fluoresc* 2002;12:91–5.
- [242] Durmuş M, Nyokong T. Photophysicochemical and fluorescence quenching studies of benzyloxyphenoxy-substituted zinc phthalocyanines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2008;69:1170–7.
- [243] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 2002;233:351–71.
- [244] Spiller W, Kliesch H, Woehrl D, Hackbarth S, Roeder B, Schnurpfeil G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *J Porphyr Phthalocya* 1998;2:145–58.
- [245] Gümrukü G, Karaođlan GK, Erdođmuş A, Gül A, Avciata U. Photophysical, Photochemical, and BQ quenching properties of zinc phthalocyanines with fused or interrupted extended conjugation. *J Chem* 2014;2014:1–11.
- [246] Bıyıklođlu Z, Durmuş M, Kantekin H. Synthesis, photophysical and photochemical properties of quinoline substituted zinc (II) phthalocyanines and their quaternized derivatives. *J Photochem Photobiol A* 2010;211:32–41.
- [247] Kuznetsova NA, Kaliya OL. Oxidative photobleaching of phthalocyanines in solution. *J Porphyr Phthalocya* 2012;16:705–12.
- [248] D' Alessandro N, Tonucci L, Morvillo A, Dragani LK, Deo MD, Bressan M. Thermal stability and photostability of water solutions of sulfophthalocyanines of Ru(II), Cu(II), Ni(II), Fe(III) and Co(II). *J Organomet Chem* 2005;690:2133–41.
- [249] Schnurpfeil G, Sobbi AK, Spiller W, Kliesch H, Woehrl D. Photo-oxidative stability and its correlation with semi-empirical MO calculations of various tetraazaporphyrin derivatives in solution. *J Porphyr Phthalocya* 1997;1:159–67.
- [250] Nyokong T, Ahsen V. *Photosensitizers in medicine, environment, and security*. Dordrecht; New York: Springer; 2012.
- [251] Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2012;122:1951–7.
- [252] Biel MA. Photodynamic therapy of head and neck cancers. *Methods Mol Biol* 2010;635:281–93.
- [253] Copper MP, Tan IB, Oppelaar H, Ruevekamp MC, Stewart FA. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:709–11.

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej p.t.:

**„Fotochemiczna oraz fotodynamiczna aktywność wybranych porfirynoidów
o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym inkorporowanych w nośniki
liposomowe”**

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktora nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis