

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



Autoreferat
– podsumowanie osiągnięć naukowych

Łukasz Sobotta

2019

1. Imię i Nazwisko: Łukasz Sobotta

2. Dyplomy i stopnie naukowe:

- **2015: Dyplom doktora nauk farmaceutycznych**

Tytuł rozprawy: “Ocena fotochemiczna porfirazyn i ftalocyjanin z podstawnikami heterocyklicznymi i alkoksylowymi o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej”. Praca zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, promotor: Prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek. Praca wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego.

- **2009: Stopień inżyniera**

Tytuł pracy inżynierskiej: “Interakcje lek – żywność”. Praca zrealizowana w Katedrze Higieny Żywnienia Człowieka, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, kierownik: dr hab. Joanna Suliburska.

- **2007: Dyplom magistra farmacji**

Tytuł pracy magisterskiej: “Synteza pochodnych amidowych antrachinonów i ich analogów pochodnych nafto[2,3-b]tiofen-4,9-dionu, potencjalnych inhibitorów telomerazy”. Praca zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik: dr Marcin Wierzchowski.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **od 2015:** Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, adiunkt
- **2009-2015:** Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, asystent

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego*

wynikającego z art. 16 par. 2 ustawy z dnia 14 Marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Wybrane ftalocyjaniny, chloryny i porfirazyny do inaktywacji fotodynamicznej *Enterococcus faecalis*”

Podstawą do aplikowania o stopień doktora habilitowanego jest cykl siedmiu tematycznie powiązanych publikacji (sześciu oryginalnych artykułów (**H.1-H.6.**) oraz jednego artykułu przeglądowego (**H.7.**). Wyniki badań przedstawiają właściwości fotochemiczne oraz aktywność fotodynamiczną względem *E. faecalis* fotouczulaczy z grupy chloryn, porfirazyn i ftalocyjanin. Wyselekcjonowano porfirynoidy o najkorzystniejszych właściwościach w fotodynamicznej inaktywacji *Enterococcus faecalis*.

4.2. Wykaz publikacji reprezentujących osiągnięcie naukowe, wynikające z art. 16, ust. 2, ustawy o stopniach akademickich

Odnosniki do prac z cyklu stanowiącego Osiągnięcie naukowe oznaczono literą **H.** Dla wszystkich prac podano wskaźnik Impact Factor. Ponadto, dla każdej publikacji podano liczbę punktów przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW).

- H.1.** **Łukasz Sobotta** (✉), Jolanta Długaszewska, Piotr Kasprzycki, Sebastian Lijewski, Anna Teubert, Jadwiga Mielcarek, Maria Gdaniec, Tomasz Gośliński, Piotr Fita, Ewa Tykarska, *In vitro* photodynamic activity of lipid vesicles with zinc phthalocyanine derivative against *Enterococcus faecalis*, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2018: Vol. 183, s. 111-118. **IF = 3,165**; MNiSW = **30** (*praca oryginalna*)
- H.2.** **Łukasz Sobotta** (✉), Jolanta Długaszewska, Mateusz Gierszewski, Adam Tillo, Marek Sikorski, Ewa Tykarska, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński, Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* by non-peripherally substituted magnesium phthalocyanines entrapped in lipid vesicles, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2018: Vol. 188, s. 100-106. **IF = 3,165**; MNiSW = **30** (*praca oryginalna*)
- H.3.** **Lukasz Sobotta** (✉), Sebastian Lijewski, Jolanta Długaszewska, Joanna Nowicka, Jadwiga Mielcarek, Tomasz Gośliński, Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* by conjugates of zinc(II) phthalocyanines with thymol and carvacrol loaded into lipid vesicles, *Inorganica Chim. Acta*, 2019: Vol. 489, s. 180-190. **IF = 2,264**; MNiSW = **25** (*praca oryginalna*)

- H.4. Łukasz Sobotta** (✉), Justyna Śniechowska, Daniel Ziental, Jolanta Długaszewska, Marek J. Potrzebowski, Chlorins with (trifluoromethyl)phenyl substituents – Synthesis, lipid formulation and photodynamic activity against bacteria, *Dyes Pigment.*, 2019 : Vol. 160, s. 292-300. **IF = 3,767**; MNiSW = **40** (praca oryginalna)
- H.5. Łukasz Sobotta** (✉), Daniel Ziental, Justyna Śniechowska, Jolanta Długaszewska, Marek J. Potrzebowski, Lipid vesicles loaded *meso*-substituted chlorins of high *in vitro* antimicrobial photodynamic activity, *Photochem. Photobiol. Sci.* , 2018, Vol. 18, s. 213-223. **IF = 2,902**; MNiSW = **25** (praca oryginalna)
- H.6. Łukasz Sobotta** (✉), Jolanta Długaszewska, Daniel Ziental, Wojciech Szczęółko, Tomasz Koczorowski, Tomasz Gośliński, Jadwiga Mielcarek, Optical properties of a series of pyrrolyl-substituted porphyrazines and their photoinactivation potential against *Enterococcus faecalis* after incorporation into liposomes, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2019: Vol. 368, s. 104-109. **IF = 2,891**; MNiSW = **25** (praca oryginalna)
- H.7. Łukasz Sobotta** (✉), Paulina Skupin-Mrugalska, Jarosław Piskorz, Jadwiga Mielcarek, Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria, *Dyes Pigment.*, 2019: Vol. 163, s. 337-355. **IF = 3,767**; MNiSW = **40** (praca przeglądowa)

Sumaryczna wartość Impact Factor dla siedmiu prac wynosi IF=**21,921** oraz **215** pkt. MNiSW

Oświadczenia Habilitanta dotyczące wykonywanych prac znajdują się w Załączniku 4.

***Oświadczenia Współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5.**

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego powyższego Osiągnięcia i uzyskanych wyników i ich ewentualnego wykorzystania poprawione

Fotodynamiczna inaktywacja drobnoustrojów została odkryta i opisana przez Oscara Raaba w 1900 roku, który odnotował toksyczny efekt akrydyny względem mikroorganizmów *Paramecium* po ekspozycji na światło [1]. Na początku XX wieku fotodynamiczna terapia antymikrobiologiczna (ang. *photodynamic antimicrobial chemotherapy* – PACT), nie zyskała odpowiedniego uznania ze względu na intensywny rozwój chemioterapeutyków, w tym

przeciwbakteryjnych sulfonamidów. Dodatkową przyczyną zaniechania prac nad PACT, była niewyjaśniona słaba aktywność fotouczulaczy względem bakterii Gram ujemnych. Jednak, intensywny wzrost oporności mikroorganizmów na dostępne terapie, wymusił poszukiwanie nowych metod leczenia infekcji [2,3]. Analizując dane statystyczne z ostatnich lat można zauważyć, że tylko na terenie Europy rocznie umiera ponad 20 000 ludzi z powodu zakażeń szpitalnych. Odnotowuje się coraz więcej infekcji wywoływanych przez metycylinooporny *Staphylococcus aureus*, wankomycynooporny *Enterococcus faecium*, oporne na cefalosporyny trzeciej generacji *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz oporny na karbapenemy *Pseudomonas aeruginosa* [4]. Wysoce oporne szczepy bakterii zostały określone jako patogeny “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*). Termin patogeny “ESKAPE” jest wysoce adekwatny, z uwagi na wykształcenie różnorodnych mechanizmów oporności, włącznie z “wypompowywaniem” antybiotyku z komórek bakteryjnych [5]. Intensywne poszukiwanie nowych metod zwalczania infekcji, zostało wymuszone przez szybkie rozprzestrzenianie się bakterii niewrażliwych na antybiotyki. Jedną z nowych metod intensywnie rozwijaną jest fotodynamiczna przeciwdrobnoustrojowa chemioterapia (PACT), nazywana również fotodynamiczną inaktywacją drobnoustrojów (PDI) [6–9]. PACT jest nieinwazyjną metodą, której mechanizm działania wykorzystuje interakcję światła widzialnego, fotouczulacza (PS) oraz tlenu cząsteczkowego [10–12]. W wyniku wzbudzenia PS po ekspozycji na światło, generowane są reaktywne formy tlenu (ROS), które następnie wywołują efekt cytotoksyczny prowadzący do destrukcji komórek bakteryjnych [1,13]. Termin “antybakteryjny” został zdefiniowany przez Amerykańskie Towarzystwo Mikrobiologiczne (*The American Society of Microbiology*) oraz amerykańską rządową Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration – FDA*) zgodnie, z którymi substancja działa przeciwbakteryjnie, gdy hamuje wzrost komórek bakteryjnych minimum o wartość 3 log jednostek tworzących kolonie (CFU) [4,14,15]. Z drugiej strony, Jori i wsp. stwierdzili, że fotouczulacz można określić jako przeciwbakteryjny jeżeli redukuje wzrost bakterii o 4 log CFU [2]. Skuteczność metody PACT w warunkach *in vitro* względem bakterii, grzybów, wirusów i pierwotniaków została wykazana przez wiele grup badawczych [2,16,17].

Efektywność wspomnianej metody względem bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, jest uwarunkowana strukturą chemiczną oraz obecnością ładunku elektrycznego w cząsteczce fotouczulacza [18–20]. Proces fotodynamiczny polega na przemianie energii promieniowania w energię chemiczną i wymaga „centrum energetycznego” – fotouczulacza, którego zadaniem

jest konwersja energii z jednej formy w drugą. Po absorpcji fotonu promieniowania, cząsteczka fotouczulacza przechodzi ze stanu stacjonarnego S_0 do wzbudzonego S_1 . Stan wzbudzony S_1 charakteryzuje się krótkim czasem życia, a dezaktywacja może zachodzić poprzez wyemitowanie nadmiaru energii w postaci fluorescencji. Innymi możliwymi drogami dezaktywacji są vibracje cząsteczki lub emisja ciepła. Jednakże, często obserwuje się reorganizację energetyczną cząsteczki ze stanu wzbudzonego singletowego S_1 , do stanu wzbudzonego trypletowego T_1 o stosunkowo długim czasie życia. W takim przypadku cząsteczka może zostać dezaktywowana, poprzez transfer energii do innych cząsteczek, znajdujących się w sąsiedztwie wzbudzonej molekuly. Rezultatem transferu energii jest tworzenie wolnych rodników, w tym tlenowych. Opisany powyżej proces generowania ROS, zaliczany jest do I mechanizmu procesu fotodynamicznego. Inną możliwością dezaktywacji cząsteczki ze stanu T_1 , jest bezpośrednie przeniesienie energii na tlen cząsteczkowy, tworząc wysoce reaktywny tlen singletowy. Przedstawiony mechanizm jest nazywany mechanizmem typu II procesu fotodynamicznego. Generowanie tlenu singletowego jest bezpośrednio powiązane z wydajnym tworzeniem trypletowych stanów wzbudzonych fotouczulacza. Zgodnie z danymi literaturowymi, za tworzenie trypletowych stanów wzbudzonych odpowiada sprzężenie spin-orbita. W przypadku jonów magnezu(II) obserwuje się sprzężenie z orbitalami s w przeciwieństwie do jonów cynku(II), gdzie w sprzężeniu biorą udział orbitale p i d . Z drugiej strony wiadomo, że sprzężenie spin-orbita jest bardziej nasilone dla orbitali większych (d, f) niż w przypadku orbitali s , zależność ta nazywana jest „efektem ciężkiego atomu” [21]. Znane są również porfirynoidy zawierające w centrum koordynacyjnym jony niklu, kobaltu, żelaza i miedzi, które są bardzo słabymi generatorami tlenu singletowego. Kuznetsova i wsp. podzielili koordynowane przez porfirynoidy jony metali, na otwartopowłokowe z niesparowanymi elektronami orbitali typu d lub f , oraz zamkniętopowłokowe z elektronami sparowanymi [22]. Otwartopowłokowe jony metali wykazują skomplikowaną multipletowość w stanach wzbudzonych, co wiąże się z krótkim czasem życia takiego stanu, a tym samym ze słabym generowaniem tlenu singletowego. Jony magnezu(II) oraz cynku(II) posiadają sparowane elektrony, są zaliczane do zamkniętopowłokowych, a tym samym wykazują długie czasy życia stanów wzbudzonych, co powoduje, że w kompleksach z porfirynoidami efektywnie generują tlen singletowy [22].

Najbardziej odpowiednim światłem służącym do wzbudzania fotouczulaczy, jest promieniowanie o długościach fal z czerwonego zakresu światła widzialnego. Jest to szczególnie istotne dla PDT z uwagi na fakt, iż światło o wymienionych długościach fal

najlepiej penetruje tkanki, a ponadto wykazuje najmniej interferencji ze związkami endogennymi np. składnikami krwi (hemoglobina, woda) [23–27].

W terapii fotodynamicznej kluczowy jest odpowiedni dobór fotouczulacza, a skuteczność PACT znacząco zależy od interakcji PS z błoną komórkową bakterii oraz generowania ROS, a także zależy od zdolności penetracji tkanek przez światło, niezbędne do wzbudzenia makrocycła [18,28]. Z doniesień literaturowych wynika, że dominującym mechanizmem fotodynamicznym jest mechanizm typu II [26,29,30]. Wykazano ponadto, że dla fotoaktywności przeciwbakteryjnej PS, istotna jest ich kumulacja w organellach bakterii [31]. Komórki bakteryjne wytworzyły różne mechanizmy oporności przeciw powszechnie stosowanym antybiotykami. W przypadku PACT wydaje się, że wytworzenie oporności na tlen singletowy, jest niezwykle trudne ze względu na jego wielokierunkowe działanie [32,33]. Z tego względu często nasuwa się pytanie – w jakim stopniu metoda PACT jest bezpieczna dla prawidłowych ludzkich komórek? Odpowiedź na to pytanie można znaleźć w publikacji Soukosa i wsp. z 1990 roku. Autorzy na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że zastosowanie PACT z wykorzystaniem jako PS – błękitu toluidynowego O (TBO) o stężeniu do 5,0 µg/ml oraz dawce światła 41,23 J/cm², nie obniżało żywotności keratynocytów i fibroblastów [34]. Badania kontynuowali Zeina i wsp., którzy ocenili efekt cytotoksyczny błękitu metylenowego (MB) względem keratynocytów. Stwierdzono, że poziom cytotoksyczności MB jest 200 razy niższy względem ludzkich keratynocytów w porównaniu do bakterii takich jak, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. acnes* [35]. Zeina i wsp. kontynuowali badania i na podstawie kolejnych eksperymentów wykazali, że błękit metylenowy nie powoduje genotoksyczności [36].

Z drugiej strony, Haylett i wsp. opisali pewne uszkodzenia DNA w ludzkich fibroblastach po zastosowaniu PACT z kwasem γ -aminolewulinowym (ALA), jako prekursorem protoporfiryny IX. Należy podkreślić, że obserwowano uszkodzenia DNA tylko przy zastosowaniu najwyższych dawek światła – i co bardzo istotne – stwierdzono, że wszystkie uszkodzenia fibroblasty usunęły w ciągu 24 godzin [37].

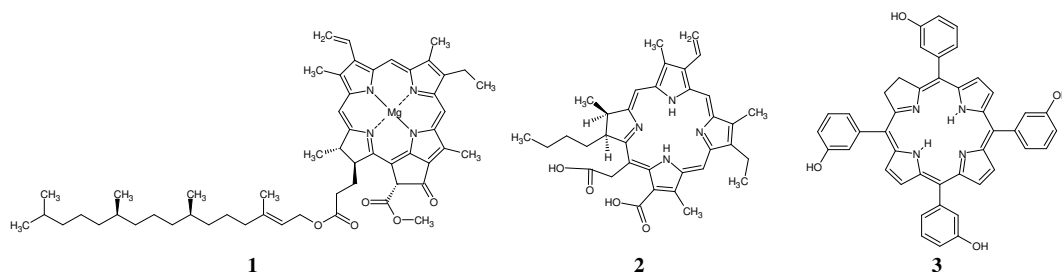
PACT stosuje się głównie w infekcjach powierzchniowych (skóra, błony śluzowe), gdzie PS jest aplikowany miejscowo w postaci iniekcji, maści czy aerozoli [11,38]. Ponadto, PACT jest skuteczną metodą leczenia infekcji specyficznych, takich jak infekcje żołądka czy jamy ustnej, dlatego też, metoda ta stała się atrakcyjną alternatywą do konwencjonalnego leczenia antybiotykami [39,40]. Wilder i wsp. przeprowadzili badania kliniczne fotoinaktywacji *Helicobacter pylori* w żołądku. Autorzy zaobserwowali znaczące obniżenie liczby żywych bakterii w obszarze żołądka poddanym terapii [41]. Z kolei w stomatologii

PACT może być stosowana w leczeniu infekcji w periodontologii [42,43], infekcji błony śluzowej wokół implantu [44], infekcji miazgi zęba (endodoncja) oraz infekcji tkanek powierzchniowych w obrębie jamy ustnej [45,46].

Endodoncja, jako dziedzina stomatologii obejmuje leczenie schorzeń miazgi zęba. W tych przypadkach najważniejszym aspektem leczenia jest całkowita eradykacja, głównie bakterii, jak również grzybów i wirusów – przyczyn schorzeń endodontycznych. Bakterie *Enterococcus faecalis* są główną przyczyną infekcji miazgi, które jako fakultatywne anaeroby mogą przetrwać warunki niesprzyjające namnażaniu, zwłaszcza jeśli umiejscowią się w kanalikach zębinowych. Kanały zębowe mogą zostać zainfekowane wg trzech mechanizmów. Pierwszy – bakterie penetrują zębinę poprzez zdrowe tkanki a mianowicie kanaliki zębinowe, których średnica wynosi od 0,2 do 0,9 μm . Należy jednak zaznaczyć, że infekcja poprzez kanaliki zębinowe następuje częściej w przypadku zębów martwych. Przyczyną jest fakt, że przez kanaliki zębinowe żywych zębów płynie płyn kanalikowy, co utrudnia ich penetrację przez bakterie. Drugi mechanizm infekcji miazgi, związany jest z ekspozycją na niekorzystne środowisko jamy ustnej, wywołane przez próchnicę (najbardziej powszechna przyczyna) lub urazy. Trzeci mechanizm jest skutkiem procesu anachorezy – bakterie są dostarczane z krwią lub limfą poprzez naczynia do uszkodzonego wierzchołka kanału zębowego. Schematycznie procedura leczenia schorzeń miazgi przebiega następująco: usunięcie miazgi, formowanie kanału pod wypełnienie, dezynfekcja oraz wypełnienie [47]. Eradykacja wspomnianych bakterii jest kluczowa dla powodzenia leczenia endodontycznego [48,49]. Powszechnie stosowanym środkiem bakteriobójczym w endodoncji jest chloran(I) sodu (NaClO) o stężeniu do 4-5%, który penetruje kanaliki w głąb do 130 μm [50]. Udowodniono, że bakterie mogą penetrować kanaliki zębinowe nawet do 300 μm w głąb, co wskazuje się jako przyczynę niepowodzeń leczenia. Bakterie, które przetrwają w kanalikach powodują nawrót dolegliwości i w konsekwencji ponowne leczenie [51,52]. Należy zaznaczyć, że *Enterococcus faecalis* wykazuje oporność względem β -laktamów (cefalosporyn), klindamycyny, tetracyklin, makrolidów, glikopeptydów (wankomycyny) [53–55]. Z danych literaturowych wynika możliwość zastosowania metody PACT w eradykacji *E. faecalis* [56,57]. Fotouczulacze często wykazują charakter hydrofobowy, co utrudnia ich dostarczenie do miejsc zainfekowanych. Problem ten można rozwiązać poprzez modyfikację cząsteczki fotouczulacza i wprowadzenie grup hydrofilowych, zwiększających jego rozpuszczalność w środowisku wodnym lub poprzez zastosowanie odpowiednich formułacji np. liposomów [58]. Ciekawym nośnikiem dla PS o potencjalnym zastosowaniu w PACT, są modyfikowane etanolem i terpenami liposomy, zwane inwasomami. Inwasomy poza lipidami zawierają nie

tylko etanol, ale również terpeny. Optymalne stężenie etanolu powoduje, że błona lipidowa nośnika staje się bardziej elastyczna, następuje efektywniejsze dostarczenie substancji czynnych do skóry (błony śluzowej), a jednocześnie nośniki efektywniej penetrują błony komórkowe [59]. Elastyczność nośników jest korzystną właściwością dla endodoncji. Potencjalną użyteczność inwazomów w eradykacji *Enterococcus faecalis* z kanałków zębinowych stwierdzili Ossmann i wsp., przeprowadzając inaktywację *E. faecalis* z wykorzystaniem inwazomów zawierających inkorporowany fotouczulacz mTHPC [57].

Obiecującą grupą fotouczulaczy są chloryny, które wywodzą się z naturalnego chlorofilu. Zbudowane są podobnie jak porfiryny tj. z czterech pierścieni pirolu, połączonych mostkami metinowymi. Jeden z pierścieni pirolu w cząsteczce chloryny – w odróżnieniu od porfiryny – posiada jedno wiązanie zredukowane.



Ryc. 1. Struktury chemiczne pochodnych chloryn **1-3** [60–63]

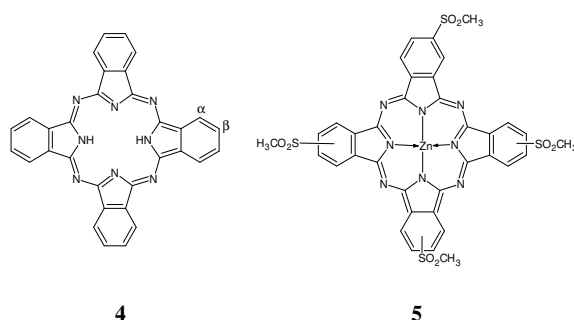
Chlorofile powszechnie występują w roślinach zielonych, a szczególnie chlorofil *a* (Chl-*a*, **1**, Ryc. 1) oraz chlorofil *b* (Chl-*b*). Związki te charakteryzują się absorpcją światła w zakresie 650-690 nm [60]. Cząsteczka Chl-*a* składa się z pierścienia makrocyklicznego chloryny, skondensowanego z pierścieniem układu cyklopentanonu oraz podstawników peryferyjnych w tym: metylowych, winylowych i innych [60]. Chlorofil *a* zastosowano, jako fotouczulacz w leczeniu m.in. *Acne vulgaris*. Song i wsp. ocenili efekty terapii u 24 pacjentów z wykorzystaniem Chl-*a* i naświetlania promieniowaniem fioletowym o $\lambda_{\max}=430$ nm oraz czerwonym ($\lambda_{\max}=660$ nm), w dawce odpowiednio 1800 i 1170 J/cm². Odnotowano znaczącą redukcję zmian skórnych oraz produkcji sebum, co powodowało złagodzenie stanu zapalnego [64]. Chloryny okazały się skuteczne również względem bakterii opornych na antybiotyki. Ferro i wsp. badali skuteczność metody PACT przeciw metycylinoopornym szczepom *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA). Skuteczność eradykacji MRSA oceniono po naświetleniu Chl-*a* rozpuszczonego w wodzie i inkorporowanego do trzech formułacji liposomalnych: DOTAP (metylosulfonian N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy), DPPC (dipalmitoilofosfatydylocholina) i DMPC (dimirystoilofosfatydylocholina). Znaczącą

redukcję liczby żywych bakterii odnotowano (>5 log) w terapii z wykorzystaniem roztworów wodnych Chl-*a*. Natomiast zastosowanie formułacji liposomalnych Chl-*a*, nie wpływało na żywotność MRSA. Należy jednak zaznaczyć, że zastosowanie Chl-*a* jako fotouczulacza w terapii fotodynamicznej, jest ograniczone z uwagi na tendencję do agregacji oraz słabej rozpuszczalności w płynach fizjologicznych [65]. Najbardziej znaną chloryną jest chloryna e6 (Ce6, 2, Fig. 1), którą zalicza się do fotouczulaczy drugiej generacji. Ce6 znalazła szerokie zastosowanie w terapii fotodynamicznej, co związane jest z małą toksycznością, relatywnie łatwą syntezą oraz zdolnością do szybkiej i selektywnej akumulacji w tkance docelowej [61]. Park i wsp. badali fotoaktywność Ce6 przeciw bakteriom odpowiedzialnym za infekcje skóry, płuc oraz jelit, m.in. Gram-dodatnie *S. aureus* i Gram-ujemne bakterie np. *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium*. Bakterie inkubowano z Ce6 przez 15 minut, a następnie eksponowano na światło o długości fali $\lambda=664$ nm w dawce: 10, 20, 30, 40 i 50 J/cm². Odnotowano wysoką aktywność Ce6 w inaktywowaniu *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, przy zastosowaniu 20 μ M chloryny i dawce światła ≥ 30 J/cm² [61]. Ce6 jako PS, może być z powodzeniem stosowana w leczeniu chorób periodontologicznych wywoływanych przez anaeroby. Aktywność fotouczulacza została zbadana w warunkach *in vitro* przeciw bakteriom anaerobowym takim jak: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *C. gingivalis*, *E. corrodens* oraz *A. actinomycetemcomitans*. Zaobserwowano, że możliwa jest eradykacja *P. gingivalis* (4,9 log), *F. nucleatum* (5,3 log) oraz *C. gingivalis* (6,7 log). Ce6 użyto w stężeniu 10,0 μ mol/l i aktywowano światłem o długości fali $\lambda=560$ nm w dawce 20,1 J/cm² i 5,3 J/cm². W zastosowanych warunkach redukcję żywotności *E. corrodens* (3 log), zaobserwowano tylko przy aktywowaniu PS dawką światła 20,1 J/cm². Natomiast *A. actinomycetemcomitans* nie był podatny na zastosowane leczenie (5,3 J/cm² – 0,2 log, 20,1 J/cm² – 1 log) [66]. Sigush i wsp. zbadali na modelu zwierzęcym (psy rasy Beagle), efektywność Ce6 w fotodynamicznej inaktywacji infekcji przestrzeni poddziąsłowej, spowodowanej przez *P. gingivalis* i *F. nucleatum*. Roztwory PS o stężeniu 10,0 μ mol/l aktywowano światłem o długości fali $\lambda_{\max}=662$ nm w dawce 12,7 J/cm². W grupie poddanej terapii z wykorzystaniem Ce6, zaobserwowano złagodzenie stanu zapalnego, zredukowany rumień oraz mniejsze krwawienie z dziąseł. Ponadto aktywowana światłem Ce6, powodowała znaczną eliminację *P. gingivalis* w porównaniu do *F. nucleatum* [67]. Garcez i wsp. analizowali skuteczność PACT w leczeniu kanałów zębowych, na miazdze zęba skolonizowanej przez antybiotykooporne bakterie. Badania przeprowadzono na 30-stu zębach ze zmianami okołowierzchołkowymi, u pacjentów leczonych wcześniej

endodontycznie antybiotykami. W 33% przypadków wykryto zakażenie bakteriami Gram-ujemnymi i w 67% Gram-dodatnimi (w tym 57% było względnie beztlenowcami). Jako PS użyto koniugatu Ce6 z polietylenoiminą o stężeniu 60 $\mu\text{mol/l}$. Kanały zębowe wypełnione fotouczulaczem naświetlano przez 4 min. promieniowaniem o długości fali $\lambda=660\text{ nm}$, dostarczając dawkę promieniowania 9,6 J/cm^2 . Odnotowano 100% eradykację bakterii [46]. Największe znaczenie w terapii fotodynamicznej spośród chloryn posiada Temoporfina (*mezo*-tetra(hydroksyfenylo)chloryna; mTHPC, Foscan®, **3**, Fig. 1) [62,63]. Zbadano skuteczność mTHPC inkorporowanej do liposomów w eradykacji *E. faecalis*. Po inkubacji zawiesiny bakterii z liposomalną mTHPC o stężeniu 50,0 $\mu\text{mol/l}$, związek aktywowano światłem czerwonym w dawce 100 J/cm^2 i zaobserwowano całkowitą eradykację. Jednocześnie przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem PS w niższych dawkach (10,0 i 30,0 $\mu\text{mol/l}$) i odnotowano redukcję żywych komórek bakteryjnych, odpowiednio o 5,8 i 6,7 log. Ponadto, autorzy zaobserwowali aktywność związku w fazie ciemnej (bez naświetlania) – redukcja o 1,5 log [68]. Skuteczność w eradykacji *E. faecalis* z kanałów zębowych przez aktywowaną mTHPC, opisali Ossmann i wsp. Autorzy stwierdzili, że PACT z wykorzystaniem mTHPC jako PS, inkorporowanego do liposomów daje lepsze rezultaty niż leczenie z wykorzystaniem 1% żelu chlorheksydyny [57]. Yang i wsp. zbadali w warunkach *in vitro*, możliwość selektywnego dostarczenia mTHPC do bakterii, przy zastosowaniu peptydu antibakteryjnego – WLBU2 oraz specyficznej lecytyny WGA (z *ang.* wheat germ agglutinin). Wymienione związki skoniugowano z liposomami zawierającymi fotouczulacz i analizowano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że mTHPC w większej ilości została dostarczona do bakterii przez modyfikowane liposomy WLBU2 i WGA, w porównaniu do liposomów niemodyfikowanych. W konsekwencji chloryna mTHPC inkorporowana do selektywnych liposomów i aktywowana światłem, spowodowała całkowitą eradykację MRSA, a znacząco poprawiła inaktywację *P. aeruginosa* [69,70].

Ftalocyjaniny (Pcs, **4**, Ryc. 2) po raz pierwszy zostały opisane w latach 30 XIX wieku przez Linstead'a i Robertsona. Są to symetryczne makrocykle o strukturze wywodzącej się z porfiryn. Chemiczne modyfikacje cząsteczek Pcs umożliwiają otrzymanie związków o korzystnych właściwościach fotochemicznych. Cząsteczka ftalocyjaniny może być podstawiana w pozycjach α lub β (Ryc. 2). Modyfikacje ftalocyjanin umożliwiają zwiększenie oddziaływań z błoną komórkową bakterii i wywołanie określonych efektów fotobiologicznych [71–73]. W porównaniu do porfiryn, obecność pierścieni benzenowych

skondensowanych z pierścieniami pirolowymi, powoduje nasiloną absorpcję światła zakresu czerwonego (670-780 nm). Pasma Q ftalocyjanin jest około 2 rzędy wielkości intensywniejsze, w porównaniu do najbardziej intensywnego pasma hematoporfiryny z zakresu czerwonego. Ponadto, Pcs silniej absorbują czerwone światło od Photofrinu®. Światło z zakresu czerwonego głębiej penetruje tkanki i w konsekwencji warunkuje lepszy efekt leczniczy. Pcs również charakteryzują się dużą zdolnością generowania tlenu singletowego i optymalną fototrwałością. Poza terapią fotodynamiczną, Pcs są szeroko stosowane jako barwniki, markery fluorescencyjne do badań w modelach *in vivo* i *in vitro* oraz w katalizie [72–74].



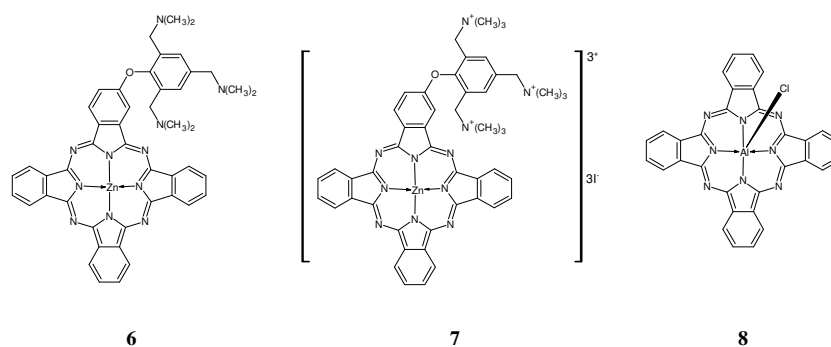
Ryc. 2. Struktury chemiczne ftalocyjanin **4-5** [71–73]

Wiele ftalocyjanin testowano pod kątem przydatności jako fotouczulacze w PACT. Ćsici i wsp. otrzymali nową hydrofobową ftalocyjaninę cynku(II) z podstawnikami metylosulfonowymi (**5**, Ryc. 2) i ocenili jej aktywność fotodynamiczną względem *S. aureus* i *E. coli*. Ftalocyjanina **5** wykazywała inaktywację *S. aureus* na poziomie 6 log, przy stężeniu 5 $\mu\text{mol/l}$. Znacznie niższą aktywność odnotowano (ok. 3 log) dla stężeń 50 $\mu\text{mol/l}$ i 100 $\mu\text{mol/l}$, co uzasadniono ograniczoną rozpuszczalnością związku w wodzie. Z drugiej strony, nie zaobserwowano efektu bakteriobójczego względem bakterii Gram ujemnych *E. coli*, dla wszystkich testowanych stężeń [75].

Słaba rozpuszczalność ftalocyjanin w środowisku wodnym, jest skutkiem hydrofobowego charakteru i tendencji do tworzenia agregatów. Rozpuszczalność ftalocyjanin w wodzie można zwiększyć m.in. modyfikując strukturę makrocykla poprzez wbudowanie podstawników obdarzonych ładunkami elektrycznymi. Należy podkreślić, że wprowadzenie do PS ładunku dodatniego, zwiększa jego aktywność względem bakterii. Zjawisko to jest rezultatem oddziaływań elektrostatycznych, dzięki którym kationowe fotouczulacze silniej przylegają do błony komórkowej bakterii [76].

Ke i wsp. badali właściwości fotodynamiczne ftalocyjaniny cynku(II) z podstawnikiem 2,4,6-tris(dimetyloaminometylo)fenoksyłowym (**6**, Ryc. 3) oraz jej postaci

kationowej (**7**, Ryc. 3), względem bakterii Gram dodatnich (*S. aureus*, MRSA) oraz Gram ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Oba fotouczulacze wykazywały wysoką aktywność względem testowanych bakterii, którą odnotowano nawet dla niskich stężeń ftalocyjanin. Stwierdzono ponadto, że pochodna kationowa wykazywała większą aktywność. Następnie zbadano potencjał fotoinaktywacji ftalocyjaniny kationowej, przeciw klinicznym szczepom bakterii (sześć różnych szczepów klinicznych *S. aureus* zarówno MRSA, jak i nie-MRSA). Autorzy stwierdzili, że w zakresie stężeń 6-14 nmol/l, pochodna kationowa ftalocyjaniny (**7**), zapewnia inaktywację bakterii na poziomie 4 log. Podobną aktywność odnotowali względem *E. coli*, jednak po zastosowaniu większych stężeń (od 0,3 do 1,3 $\mu\text{mol/l}$) [77].



Ryc. 3. Struktury chemiczne ftalocyjanin **6-8** [77,78]

Kolejne eksperymenty z wykorzystaniem ftalocyjaniny **7**, wykazały aktywność fotodynamiczną przeciw bakteriom Gram ujemnym *Porphyromonas gingivalis* i *Escherichia coli*. Ke i wsp. zbadali również wpływ makrocykla **7** o stężeniu 20 $\mu\text{mol/l}$, na komórki więzadła przyzębia. Autorzy nie odnotowali toksyczności względem ludzkich komórek [77]. Powyższe wyniki wskazują na bezpieczeństwo terapii z wykorzystaniem testowanej dozymetrii. Dodatkowo można przytoczyć wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Chen i wsp., w warunkach *in vivo* na królikach. W tych doświadczeniach rany zakażone bakteriami *E. coli* poddano terapii fotodynamicznej, z wykorzystaniem koniugatu ftalocyjaniny cynku(II) i lizyny. Odnotowano znaczące zmniejszenie liczby bakterii w leczonych ranach [79].

Podobnie jak w przypadku chloryn, jako nośniki dla ftalocyjanin bardzo często wybierane są liposomy. Longo i wsp. badali skuteczność PACT względem *Streptococcus mutans*, stosując jako fotouczulacz ftalocyjaninę AlClPc (**8**, Ryc. 3), inkorporowaną do kationowych liposomów. *S. mutans* jest jedną z bakterii odpowiedzialnych za powstawanie próchnicy. Badanie obejmowało 10 pacjentów, z radiologicznie potwierdzoną próchnicą 2/3 zęba. W terapii wykorzystano liposomalną postać AlClPc o stężeniu 5 $\mu\text{mol/l}$, którą

inkubowano w ubytkach 5 minut, a następnie naświetlano promieniowaniem o długości fali $\lambda=660$ nm, i dawce 180 J/cm^2 . Stwierdzono, że kationowe liposomy zawierające AlClPc były w znacznym stopniu adsorbowane na powierzchni bakterii, w porównaniu do komórek miazgi. W ubytkach poddanych PACT, eliminację bakterii odpowiedzialnych za próchnicę oceniono na poziomie 82%; nie zanotowano żadnych efektów niepożądanych [78]. Rodrigues i wsp. badali podatność *Cryptococcus neoformans* na PACT z zastosowaniem AlClPc w postaci nanoemulsji (AlClPc/NE). Celem określenia aktywności nowej formułacji fotouczulacza względem *C. neoformans*, próbki miazgi zęba inkubowano z AlClPc/NE o stężeniach 0,045, 0,450 lub 4,500 $\mu\text{mol/l}$. Eksperyment podzielono na dwie grupy: pierwsza (A) – komórki przemyto buforem fosforanowym i solą fizjologiczną celem usunięcia niezaadsorbowanego PS, podczas gdy druga grupa (B), nie była poddana przemywaniu. Następnie próbki obu grup eksponowano na promieniowanie o długości fali $\lambda=675$ nm, i dawce światła 5 lub 10 J/cm^2 . Zarówno w grupie A jak i B, stwierdzono inaktywację bakterii po naświetleniu PS (0,045 $\mu\text{mol/l}$) dawką 5 J/cm^2 . Ponadto zaobserwowano, że przy zastosowaniu wyższych stężeń AlClPc/NE, terapia była skuteczna tylko w przypadku grupy A. Niższa skuteczność PACT w grupie B, była związana z nadmiarem PS, który blokował penetrację próbki przez światło, a tym samym uniemożliwiał generowanie tlenu singletowego w całej objętości. Zastosowanie do wzbudzenia PS promieniowania o dawce 10 J/cm^2 , prowadziło do eliminacji *C. neoformans* w przypadku obu grup, dla wszystkich zastosowanych stężeń fotouczulacza. Stopień inaktywacji *C. neoformans* oznaczono na poziomie ~ 6 log dla stężenia fotouczulacza 4,5 $\mu\text{mol/l}$ [80].

I. Omówienie osiągnięcia naukowego

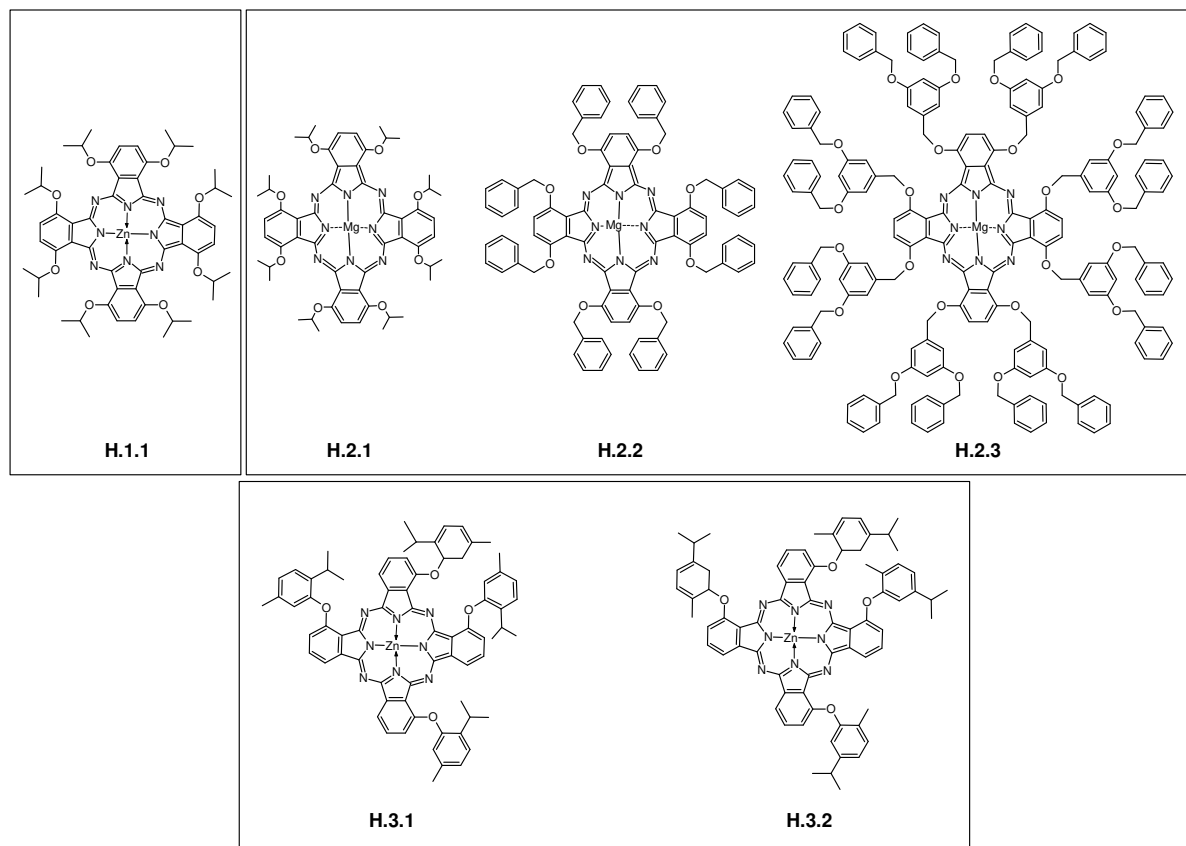
Celem mojego Osiągnięcia naukowego była: (i) ocena właściwości fizykochemicznych, (ii) ocena właściwości fotochemicznych, (iii) ocena zdolności fotoinaktywacji *Enterococcus faecalis*, jednego z głównych patogenów w endodontyce. Badane związki zostały wyselekcjonowane spośród nowo otrzymanych porfirynoidów z grupy:

- (i) ftalocyjanin
- (ii) chloryn
- (iii) porfirazyn

Pierwszy etap badań dotyczył grupy sześciu ftalocyjanin (Ryc. 4)

1. **H.1.1** – 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(2-propoksy)ftalocyjanina cynku(II)
2. **H.2.1** – 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(2-propoksy)ftalocyjanina magnezu(II)
3. **H.2.2** – 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis(benzyloksy)ftalocyjanina magnezu(II)

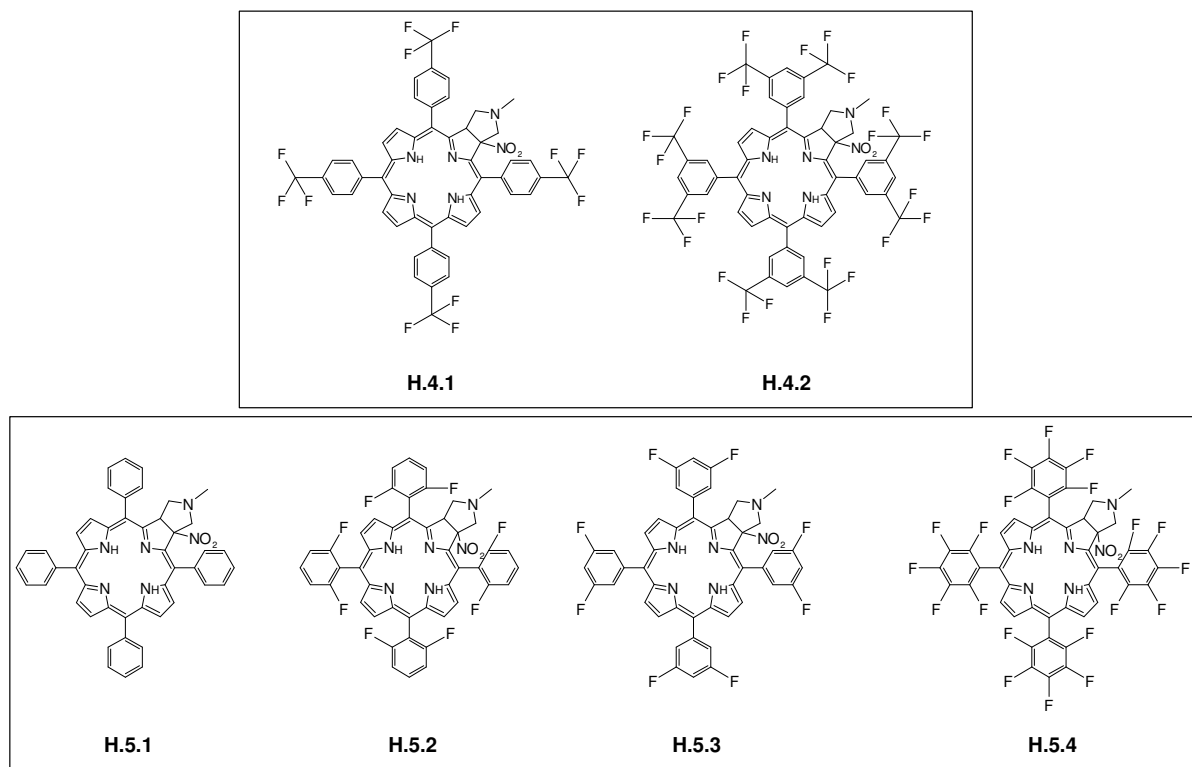
4. **H.2.3** – 1,4,8,11,15,18,22,25-oktakis[3,5-bis(benzyloksy)benzyloksy]ftalocyjanina magnezu(II)
5. **H.3.1** – 1,8,18,25-tetrakis[5-metylo-2-(propan-2-ylo)fenoksy]ftalocjanina cynku(II)
6. **H.3.2** – 1,8,18,25-tetrakis[2-metylo-5-(propan-2-ylo)fenoksy]ftalocjanina cynku(II)



Ryc. 4. Struktury chemiczne ftalocyjanin **H.1.1**, **H.2.1-H.2.3** oraz **H.3.1**, **H.3.2**

W drugim etapie objektem badań była grupa sześciu chloryn (Ryc. 5)

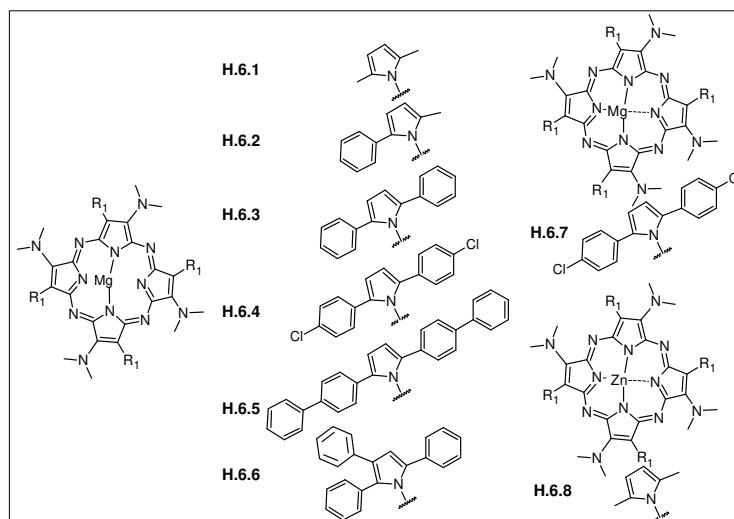
1. **H.4.1** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetra(4-(trifluorometylo)fenylo)-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina
2. **H.4.2** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetra(3,5-di(trifluorometylo)fenylo)-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina
3. **H.5.1** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetrafenylo-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina
4. **H.5.2** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetra(2,6-difluorofenylo)-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina
5. **H.5.3** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetra(3,5-difluorofenylo)-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina
6. **H.5.4** – 2,3,3 β ,21 β -tetrahydro-2-metylo-3 β -nitro-5,10,15,20-tetra(pentafluorofenylo)-1*H*,23*H*,25*H*-pirolo[3,4- β]porfina



Ryc. 5. Struktury chemiczne chloryn **H.4.1**, **H.4.2** oraz **H.5.1-H.5.4**

Trzecią grupę stanowiło osiem porfirazyn (Ryc. 6)

1. **H.6.1** – 2,7,12,18-tetrakis[2,5-dimetylo-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
2. **H.6.2** – 2,7,12,18-tetrakis[2-fenyl-5-metylo-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
3. **H.6.3** – 2,7,12,18-tetrakis[2,5-difenyl-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
4. **H.6.4** – 2,7,12,18-tetrakis[2,5-di(4'-chlorofenyl)-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
5. **H.6.5** – 2,7,12,18-tetrakis[2,5-di(bifenyl-4-ilo)-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
6. **H.6.6** – 2,7,12,18-tetrakis[2,3,5-trifenyl-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
7. **H.6.7** – 2,7,12,17-tetrakis[2,5-di(4'-chlorofenyl)-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna magnezu(II)
8. **H.6.8** – 2,7,12,18-tetrakis[2,5-dimetyl-1*H*-pirol-1-ilo]-3,8,13,18-tetrakis(dimetyloamino)porfirazyna cynku(II)



Ryc. 6. Struktury chemiczne porfirazyn **H.6.1-H.6.8**

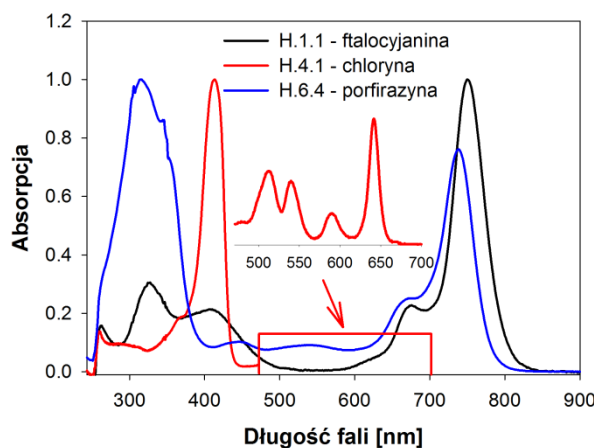
1. Właściwości spektralne

Ważnym aspektem oceny fotodynamicznej nowego fotouczulacza jest określenie właściwości spektralnych, ponieważ zlokalizowanie pasm absorpcji umożliwia prawidłowe zaplanowanie kolejnych doświadczeń, dotyczących generowania tlenu singletowego oraz badania aktywności biologicznej. Zgodnie z wnioskami podanymi przez wielu autorów, m.in. Allison i wsp. [81], Lovell i wsp. [82], Ethirajan i wsp. [24], najbardziej korzystna jest absorpcja promieniowania z zakresu światła czerwonego.

Porfirynoidy dzięki obecności sprzężonego układu wiązań π są chromo- i fluoroforami, absorbują oraz emitują promieniowanie z zakresu światła widzialnego i bliskiej podczerwieni. Spośród porfirynoidów, ftalocyjaniny charakteryzują się najbardziej odpowiednim dla PDT/PACT profilem widma UV-Vis. Wykazują dużą absorpcję promieniowania w paśmie Q, natomiast pasmo Soreta w porównaniu do innych grup fotouczulaczy (porfiryń, porfirazyn, chloryn), posiada mniejszą intensywność. Widma UV-Vis ocenianych w niniejszym Osiągnięciu nowych ftalocyjanin **H.1.1**, **H.2.1-H.2.3**, **H.3.1**, **H.3.2**, posiadały w czerwonym zakresie promieniowania dobrze wykształcone pasma Q, wykazujące analityczną długość fali w przedziale $\lambda_{\max}=700-756$ nm oraz wysokie wartości współczynników absorpcji $\log \epsilon=4,64-5,37$ (Ryc. 7), szczególnie obiecujące w kontekście wykorzystania w PDT [21,83–87].

Porównanie widm UV-Vis ftalocyjanin umożliwiło ocenę – w jaki sposób rodzaj jonu w centrum koordynacyjnym, jak i wielkość podstawników wpływa na zdolność absorbowania promieniowania. I tak, analizując właściwości widm ftalocyjaniny **H.1.1** i **H.2.1**, posiadających osiem podstawników 2-propoksyłowych, a także odpowiednio jon cynku(II)

oraz magnezu(II) – stwierdzono, że rodzaj jonu w centrum koordynacyjnym nie odgrywa znaczącej roli, zarówno w wielkości molowego współczynnika absorpcji, jak i maksimum pasma Q. Stacjonarne właściwości absorpcyjne pochodnych posiadających jon cynku(II) lub magnezu(II) nie różniły się znacząco, a maksima pasma Q przesunięte są tylko o ok. 5 nm.



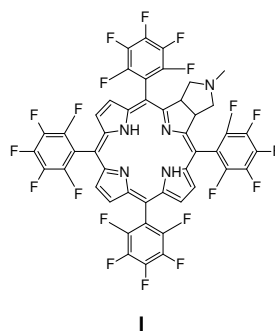
Ryc. 7. Widma elektronowe absorpcji ftalocyjaniny, chloryny i porfirazyny

Natomiast większe różnice obserwowano analizując, jak położenie maksimum absorpcji zależy od rodzaju i usytuowania podstawnika oraz jego zdolności elektronodonorowych względem pierścienia makrocyklicznego. Stwierdzono, że w przypadku ftalocyjanin magnezu(II) podstawniki 2-propoksyłowe (**H.2.1**), benzyloksyłowe (**H.2.2**) oraz 3,5-di(benzyloksy)benzyloksyłowe (**H.2.3**), znajdujące się w pozycjach α powodują silne przesunięcie pasm absorpcji w kierunku fal dłuższych. Jednocześnie prześledzono wpływ wielkości podstawników na przebieg widm UV-Vis, a wyznaczone wartości współczynników molowych wskazały, że intensywność absorpcji w zależności od wielkości podstawników nieperyferyjnych, wzrasta zgodnie z szeregiem:

$$\mathbf{H.2.1} (\log \epsilon = 4,99) < \mathbf{H.2.2} (\log \epsilon = 5,18) < \mathbf{H.2.3} (\log \epsilon = 5,36).$$

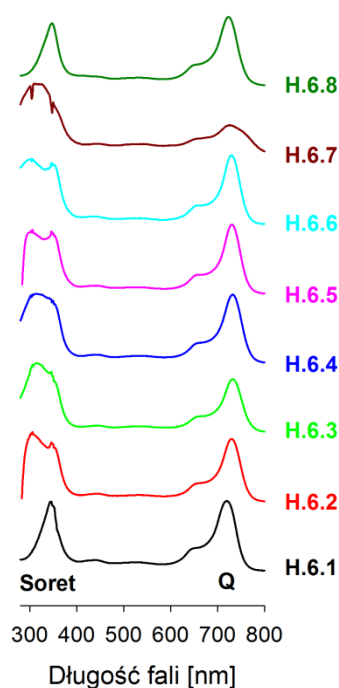
Wśród porfirynoidów obiecującą grupę fotouczulaczy stanowią chloryny, które były kolejnym obiektem moich badań. Analizowano demetalowane związki posiadające podstawniki 4-(trifluorometylo)fenyłowe (**H.4.1**), 3,5-di(trifluorometylo)fenyłowe (**H.4.2**), fenyłowe (**H.5.1**), 2,6-difluorofenyłowe (**H.5.2**), 3,5-difluorofenyłowe (**H.5.3**) oraz 2,3,4,5,6-pentafluorofenyłowe (**H.5.4**). Chloryny w porównaniu z ftalocyjaninami [86,88] i porfirazynami [83], charakteryzują się mniej intensywną absorpcją w zakresie światła czerwonego (Ryc. 7). Dla wszystkich chloryn odnotowano charakterystyczną dla tej grupy związków, silną absorpcję w zakresie pasma Soreta, a wartości molowego współczynnika

absorpcji mieściły się w przedziale $\log \epsilon = 5,00-5,25$ [89,90]. Elektronowe widma absorpcji analizowanych chloryn, charakteryzowały się znacznie mniej intensywnym pasmem Q. Ponadto, na skutek zaburzenia symetrii cząsteczki obserwowano rozszczepienie pasma Q na sub-pasma, wykazujące maksimum długości fali przy 510 nm, 540 nm, 590 nm oraz 640 nm. Wszystkie cząsteczki badanych chloryn posiadały w pozycji β grupę nitrową, która ma charakter elektronoakceptorowy. Znaczenie grupy nitrowej w procesie absorpcji promieniowania zilustrowano porównując widmo chloryny **H.5.4**, zawierającej oprócz czterech podstawników pentafluorofenylowych także grupę nitrową w pozycji β [91,92], z opisanym w literaturze związkiem (**I**) posiadającym analogiczne podstawniki, ale pozbawionym grupy $-\text{NO}_2$ (Ryc. 5, Ryc. 8). Zaobserwowano, że obecność grupy nitrowej powoduje hipsochromowe przesunięcie pasma Q_y , a maksima absorpcji występują odpowiednio przy $\lambda_{\text{max}}=640$ nm (**H.5.4**) oraz $\lambda_{\text{max}}=650$ nm (**I**) [93].



Ryc. 8. Struktura chemiczna chloryny **I** [93]

Trzecią grupą ocenianych porfirynoidów były porfirazyny. W widmach absorpcji porfirazyn, z wyjątkiem **H.6.7**, obserwowano dwa dobrze wykształcone pasma o porównywalnej intensywności, Soreta oraz Q. Maksimum absorpcji badanych związków mieściło się w zakresie tzw. okna terapeutycznego (600-800 nm), co jest czynnikiem sprzyjającym zastosowaniu badanych makrocycyli w terapii fotodynamicznej jako fotosensybilizatorów. Podstawniki peryferyjne porfirazyn tj. dimetyloaminowe, wykazują silne właściwości elektronodonorowe do systemu π -elektronów makrocyckla, co powoduje zmiany w kształcie pasm absorpcji. W przypadku prawie wszystkich badanych porfirazyn (wyjątek **H.6.7**), zarejestrowano dobrze wykształcony pojedynczy sygnał w zakresie pasma Q. Ponadto dla porfirazyny magnezu(II) i cynku(II) z podstawnikami 2,5-dimetylopirolilowymi (**H.6.1** i **H.6.8**, Ryc. 9), pasmo Soreta przyjmowało kształt ostrego, pojedynczego sygnału o dużej intensywności.



Ryc. 9. Elektronowe widma absorpcji porfirazyn **H.6.1-H.6.8**

Jednocześnie, dla porfirazyn posiadających rozbudowane podstawniki, powodujące zawady steryczne tj. 2-fenilo-5-metylopirolilowe (**H.6.2**), 2,5-difenylopirolilowe (**H.6.3**), 2,5-di(4'-chlorofenilo)pirolilowe (**H.6.4**), 2,5-di(bifenyl-4-ilo)pirolilowe (**H.6.5**), 2,3,5-trifenylopirolilowe (**H.6.6**), a także 2,5-di(4'-chlorofenilo)pirolilowe (**H.6.7**) – Ryc. 9, odnotowano szerokie, częściowo rozszczepione pasmo Soreta. Poszerzenie pasma w widmach wymienionych związków, jest skutkiem nałożenia na pasmo Soreta przy ok. $\lambda_{\max}=350$ nm, wysokoenergetycznego intensywnego pasma pochodzącego od peryferyjnych podstawników z ugrupowaniem fenylpirolilowym, posiadającym maksimum przy ok. 305 nm.

Związki stosowane jako fotouczulacze w terapii fotodynamicznej (PDT), ocenia się również pod kątem możliwości wykorzystania w diagnostyce fotodynamicznej (PDD), określając ich właściwości emisyjne. Analogiczny sposób postępowania zastosowano dla badanych porfirynoidów, analizując ich potencjalne zastosowanie w przeciwbakteryjnej diagnostyce fotodynamicznej. Z danych literaturowych, m.in. z badań przeprowadzonych przez Kim i wsp. [94] oraz Rice i wsp. [95] wynika, że jednym z kierunków rozwoju PACT, jest właśnie diagnostyka infekcji bakteryjnych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji fotouczulaczy [96].

Dla badanych – w ramach opisywanego Osiągnięcia – związków makrocyklicznych, zarejestrowane widma wzbudzenia stanowiły lustrzane odbicia elektronowych widm absorpcji, co wskazało, że geometria wzbudzonych porfirynoidów nie różni się znacząco, od geometrii cząsteczek w stanie podstawowym.

W grupie ftalocyjanin **H.2.1-H.2.3**, analizowano zależność wielkości peryferium makrocykla, a wydajności kwantowej fluorescencji i stwierdzono, że intensywność procesu jest proporcjonalna do rozmiarów peryferium. Zaobserwowano, że właściwości emisyjne ftalocyjanin magnezu(II) były zależne od rozmiarów podstawnika, a wydajność (Φ_{FL}) wzrastała kolejno dla związków zawierających podstawniki 2-propoksyłowe (**H.2.1**, $\Phi_{FL}=0,01$), benzyloksyłowe (**H.2.2**, $\Phi_{FL}=0,10$) oraz 3,5-bis(benzyloksy)benzyloksyłowe (**H.2.3**, $\Phi_{FL}=0,17$). Ponadto niezależnie od długości fali światła wzbudzającego, w widmach emisji zarejestrowano tylko jedno pasmo w czerwonym zakresie promieniowania. Natomiast porównanie właściwości emisyjnych ftalocyjaniny **H.1.1** oraz **H.2.1** wykazało, że w przypadku tej pary związków, rodzaj jonu metalu w centrum koordynacyjnym w niewielkim stopniu wpływa na zdolność fluorescencji.

Ponadto, w przypadku ftalocyjaniny cynku(II) z podstawnikami 2-propoksyłowymi (**H.1.1**), uzupełniono badania emisyjne o pomiary czasu zaniku emisji z sub-nanosekundową rozdzielczością czasową. Niskie wydajności kwantowe fluorescencji powiązано z czasem życia, np. w DMF uzyskano wartość $0,67 \pm 0,02$ ns. Dla ftalocyjaniny **H.1.1** przeprowadzono również eksperymenty protonowania. Na podstawie zarejestrowanych zmian w elektronowych widmach absorpcji podczas miareczkowania kwasem, potwierdzono otrzymanie form mono- i diprotonowanych. Nie obserwowano powstania formy tri- oraz tetraprotonowanej ponieważ dalsze dodawanie kwasu powodowało rozkład ftalocyjaniny. Ponadto stwierdzono, że formy protonowane charakteryzują się znacznie skróconym czasem życia fluorescencji, co wynika z nieradiacyjnej deaktywacji stanu wzbudzonego. Ten rodzaj badań przeprowadzono we współpracy z dr Piotrem Kasprzyckim i dr hab. Piotrem Fitą z Wydziału Fizyki UW. Dla ftalocyjaniny cynku(II) z podstawnikami 2-propoksyłowymi **H.1.1**, we współpracy z dr hab. Ewą Tykarską oraz prof. dr hab. Marią Gdaniec, wykonane zostały badania krystalograficzne. Strukturalna analiza rentgenowska monokryształu wyhodowanego przez powolne odparowanie pirydyny wykazała, że ftalocyjanina **H.1.1**, krystalizuje w grupie przestrzennej P21/c. Stwierdzono, że na skutek podstawienia pierścienia ftalocyjaniny podstawnikami w pozycjach nieperyferyjnych, dochodzi do jego deformacji.

W grupie chloryn (**H.4.1**, **H.4.2**, **H.5.1-H.5.4**) analizowano cząsteczki zawierające różną liczbę atomów fluoru, co pozwoliło prześledzić ich wpływ na wydajność fluorescencji. Wykazano, że demetalowana chloryna zawierająca podstawniki 4-(trifluorometylo)fenylowe **H.4.1**, posiada porównywalną wydajność kwantową fluorescencji, jak demetalowana chloryna z podstawnikami 3,5-di(trifluorometylo)fenylowymi **H.4.2** (Tab. 1). Wynika z tego, że liczba podstawników trifluorometylowych nie ma wpływu na proces emisji. Natomiast dla chloryny **H.5.1** z podstawnikami fenylowymi oraz trzech chloryn posiadających podstawniki fluorofenylowe **H.5.2-H.5.4**, zaobserwowano zmniejszenie wydajności kwantowej fluorescencji, ze wzrostem liczby atomów fluoru w pierścieniu fenylowym. Na przykład, dla chloryny z podstawnikami fenylowymi **H.5.1** wydajność wynosiła $\Phi_{FL}=0,44$, natomiast zawierającej rozbudowane podstawniki 2,3,4,5,6-pentafluorofenylowe **H.5.4** $\Phi_{FL}=0,22$ (Tab. 1). Podobnie jak w przypadku oceny właściwości absorpcyjnych, porównanie wydajności kwantowej fluorescencji chloryny **H.5.4** (z grupą $-NO_2$ w pozycji β) oraz związku **I** (brak grupy nitrowej), pozwoliło wnioskować jakie znaczenie posiada grupa nitrowa dla właściwości fluorochromowych. Analiza uzyskanej wartości $\Phi_{FL}=0,15$ dla **H.5.4** oraz deklarowanej $\Phi_{FL}=0,16$ w przypadku związku **I** [93] wskazała, że podstawienie pierścienia chloryny elektronoakceptorową grupą nitrową, ma tylko niewielki wpływ na zdolność związku do fluorescencji.

Przedmiotem badań emisyjnych była również grupa ośmiu porfirazyn (**H.6.1-H.6.8**), które charakteryzowały się małą wydajnością kwantową fluorescencji (Tab. 1). Niska wydajność jest skutkiem obecności podstawników dimetyloaminowych ponieważ wolne pary elektronowe przy atomie azotu oddziałują z elektronami π pierścienia makrocyklicznego, powodując nieradiacyjną relaksację stanów wzbudzonych cząsteczki [97]. W widmach emisji porfirazyn odnotowano dwa pasma w zakresie UV-Vis. Pierwsze pasmo pojawia się w czerwonym zakresie widma i jest skutkiem transformacji stanu wzbudzonego S_1 do stanu podstawowego S_0 . Drugie pasmo emisji przypisane przejściom cząsteczki ze stanu S_2 do S_0 , występowało w niebieskim zakresie widma. Obserwowany rodzaj fluorescencji określany jako emisja dualna, została wcześniej odnotowana przez Lee i wsp. oraz Trivedi i wsp. [98,99], którzy badali zdolności emisyjne okso- i tioporfirazyn. Emisję dualną można uzyskać wzbudzając związek światłem UV, natomiast wzbudzenie promieniowaniem o większych długościach fal, skutkuje pojawieniem się tylko jednego pasma. Podobnie jak w przypadku elektronowych widm absorpcji, analizowano zależność przebiegu widm emisji od rodzaju podstawników peryferyjnych makrocykla. Porfirazyny magnezu(II) z podstawnikami

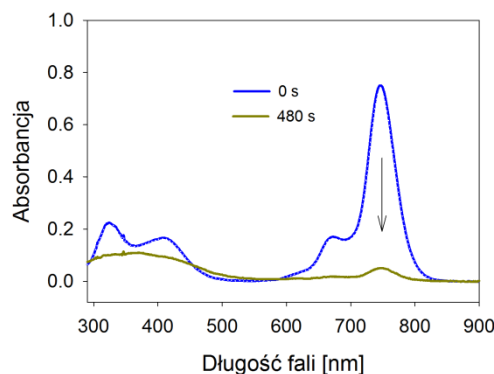
fenylopirolilowymi **H.6.3-H.6.7**, wzbudzone promieniowaniem $\lambda=325$ nm, wykazywały emisję zarówno w zakresie niebieskim, jak i czerwonym. Natomiast w tych samych warunkach, porfirazyny magnezu(II) z podstawnikami 2,5-di(4'-chlorofenylo)pirolilowymi **H.6.4** lub 2,3,5-trifenylopirolilowymi **H.6.6**, emitowały promieniowanie słabiej w zakresie niebieskim, a silniej w czerwonym. W przypadku związków **H.6.1** i **H.6.2**, tj. porfirazyn magnezu(II) z podstawnikami metylopirolilowymi lub metylofenylopirolilowymi, nie obserwowano emisji promieniowania z zakresu UV. Spośród badanych Pzs, największą wydajność kwantową fluorescencji odnotowano dla porfirazyny **H.6.1**, zawierającej cztery podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe ($\Phi_{FL}=5\cdot 10^{-2}$).

2. Fotostabilność

Określenie fotostabilności fotouczulacza jest kluczowe dla zoptymalizowania dozymetrii w badaniach biologicznych, jest niezbędne w ustaleniu czasu naświetlania oraz dawki promieniowania. Porfirynoidy mogą ulegać fotodegradacji na dwa sposoby. Pierwszy – fotowybielanie – polega na fragmentacji cząsteczki makrocykla i tworzeniu wielu niskocząsteczkowych związków, któremu towarzyszy jednoczesny zanik barwy. Drugi mechanizm opiera się na modyfikacji porfirynoidu, prowadzącej do powstania innego związku makrocyklicznego. Zachodzący proces nazywa się fototransformacją i może być obserwowany na podstawie przesunięć pasm absorpcji w widmie UV-Vis oraz zmiany koloru próbki [100]. Ponadto Hadjur i wsp. wykazali, że w procesie fotodegradacji kluczową rolę odgrywa tlen singletowy [101].

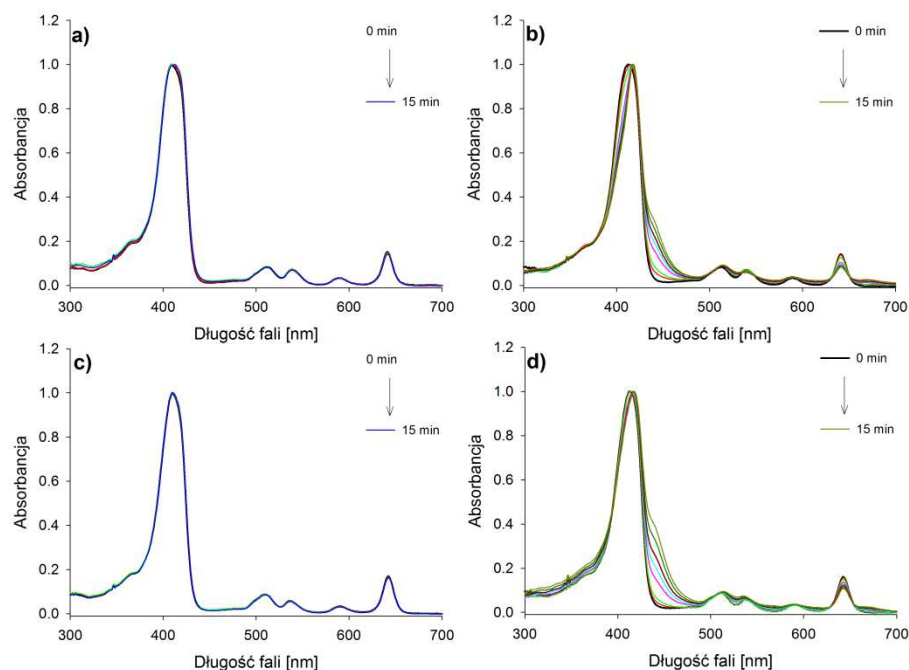
Naświetlanie ftalocyjanin zazwyczaj powoduje ich degradację na drodze fotowybielania – tworzą się bezbarwne ftalimidy. Przebieg i szybkość procesu zależy od wielu czynników, również od rodzaju jonu skoordynowanego w centrum makrocyklicznego pierścienia, podstawników, wydajności kwantowej tworzenia stanu trypletowego, zawad przestrzennych i wielu innych [22]. Badane w ramach Osiągnięcia porfirazyny i ftalocyjaniny w czasie naświetlania ulegały procesowi fotowybielania, tworzyły się niskocząsteczkowe bezbarwne związki. Fotodegradacja zachodziła znacznie szybciej w roztworach DMF, w porównaniu do DMSO [83,86].

Podczas ekspozycji ftalocyjaniny cynku(II) zawierającej podstawniki 2-propoksyłowe **H.1.1** na promieniowanie z zakresu widzialnego, obserwowano zmniejszenie intensywności pasm absorpcji (Ryc. 10), a wydajność kwantowa procesu wynosiła, odpowiednio $\Phi_P=3,1\cdot 10^{-4}$ (DMF) i $1,2\cdot 10^{-5}$ (DMSO). Jednocześnie nie odnotowano dodatkowych pasm, co jest charakterystyczne dla rozkładu zgodnie z mechanizmem fotowybielania.



Ryc. 10. Widma UV-Vis ftalocyjaniny **H.1.1** przed naświetlaniem i po ekspozycji na światło

Według tego samego mechanizmu rozkładały się również ftalocyjaniny magnezu(II) **H.2.1-H.2.3**, a proces zachodził z większą wydajnością w DMF (Tab. 1). Różnice w szybkości rozkładu fotochemicznego w zależności od rozpuszczalnika, wynikają ze zróżnicowanych właściwości koordynacyjnych. Tego rodzaju spostrzeżenia zostały przedstawione przez Kuznetsovą i wsp., którzy stwierdzili, że w pierwszej fazie procesu fotowycielania następuje koordynacja tlenu molekularnego do jonu metalu w centrum makrocykla, następnie proces jest inicjowany i poprzez produkty przejściowe prowadzi do powstania ftalimidu. W roztworach DMSO rozpuszczalnik konkuruje z tlenem w procesie koordynacji do jonu metalu, a tym samym zaburza proces rozkładu [22]. W przypadku analogicznych ftalocyjanin **H.1.1** i **H.2.1**, różniących się tylko skoordynowanym jonem metalu, odpowiednio cynku(II) i magnezu(II), wykazano większą stabilność pochodnej magnezowej (Tab. 1). Obserwowane różnice powiązano z generowaniem tlenu singletowego ponieważ lepszym generatorem okazał się związek mniej trwały tj. ftalocyjanina cynku(II) (Tab. 1). Na przykładzie ftalocyjanin magnezu(II) **H.2.1-H.2.3** analizowano zależność pomiędzy fotostabilnością, a zawadą przestrzenną tworzoną przez podstawniki na peryferium makrocykla. Stwierdzono, że fotostabilność ftalocyjanin magnezu(II) wzrasta zgodnie z szeregiem: **H.2.1** < **H.2.2** < **H.2.3**, tj. od związku z mało rozwiniętym peryferium do peryferium tworzącym zawady przestrzenne. Obserwowana zależność wskazała, że rozbudowane podstawniki, jak np. w przypadku **H.2.3**, utrudniają oddziaływanie tlenu singletowego z pierścieniem makrocyklicznym.



Ryc. 11. Zmiany elektronowych widm absorpcji chloryn w czasie ekspozycji na światło widzialne: a) **H.5.2** w DMF; b) **H.5.2** w DMSO; c) **H.5.4** w DMF; d) **H.5.4** w DMSO

Proces fotodegradacji chloryn był badany dotychczas przez kilka grup naukowców, jednak należy zaznaczyć, że większość tych badań dotyczyła jednego fotouczulacza, a mianowicie temoporfiny (Foscan®), zatwierdzonej do użytku klinicznego w leczeniu nowotworów. W wyniku naświetlania Foscanu®, Jones i wsp. oraz Bonnett i wsp. wykazali tworzenie nowego związku makrocyklicznego i jednocześnie związków niskocząsteczkowych [29,102]. Analogicznie do Foscanu®, badane demetalowane chloryny zarówno z podstawnikami trifluorometylofenylowymi **H.4.1** i **H.4.2**, jak i z podstawnikami fenylowymi i fluorofenylowymi **H.5.1-H.5.4**, ulegały fotodegradacji na drodze fototransformacji z wytworzeniem związków makrocyklicznych (Tab. 1, Ryc. 11). Widma spektrometrii mas po ekspozycji chloryn na promieniowanie, wykazywały nowe sygnały o zbliżonych wartościach m/z , jakie obserwowano dla związków macierzystych. Jednocześnie zaobserwowano zmianę barwy naświetlanych roztworów.

| Związek | Rozp. | Φ_{FL} | $10^6\Phi_P$ | Φ_A | λ | log ϵ | |
|----------------|-------|-------------|--------------|----------|-----------|----------------|------|
| Ftalocyjaniny | H.1.1 | DMF | 0.01 | 306 | 0.18 | 746 | 4.64 |
| | | DMSO | 0.00 | 12 | 0.16 | 750 | 4.52 |
| | H.2.1 | DMF | 0.02 | 90 | 0.04 | 749 | 4.99 |
| | | DMSO | 0.02 | 8 | 0.03 | 756 | 5.01 |
| | H.2.2 | DMF | 0.10 | 85 | 0.14 | 738 | 5.18 |
| | | DMSO | 0.04 | 6 | 0.13 | 746 | 5.10 |
| | H.2.3 | DMF | 0.17 | 38 | 0.13 | 741 | 5.36 |
| | | DMSO | 0.04 | 3 | 0.11 | 745 | 5.22 |
| | H.3.1 | DMF | 0.11 | 17 | 0.15 | 696 | 5.37 |
| | | DMSO | 0.02 | 3 | 0.18 | 700 | 5.34 |
| | H.3.2 | DMF | 0.08 | 24 | 0.15 | 695 | 5.25 |
| | | DMSO | 0.03 | 4 | 0.13 | 698 | 5.22 |
| Chloryny | H.4.1 | DMF | 0.20 | 5 | 0.50 | 409 | 5.10 |
| | | DMSO | 0.31 | 247 | 0.45 | 413 | 5.06 |
| | H.4.2 | DMF | 0.21 | 3 | 0.69 | 410 | 5.26 |
| | | DMSO | 0.30 | 810 | 0.57 | 415 | 5.27 |
| | H.5.1 | DMF | 0.19 | 5 | 0.46 | 407 | 5.21 |
| | | DMSO | 0.44 | 25 | 0.16 | 409 | 5.21 |
| | H.5.2 | DMF | 0.21 | 2 | 0.63 | 402 | 5.23 |
| | | DMSO | 0.35 | 122 | 0.41 | 404 | 5.23 |
| | H.5.3 | DMF | 0.17 | 1 | 0.59 | 407 | 5.25 |
| | | DMSO | 0.27 | 123 | 0.32 | 409 | 5.25 |
| | H.5.4 | DMF | 0.15 | 2 | 0.86 | 400 | 5.23 |
| | | DMSO | 0.22 | 137 | 0.54 | 402 | 5.24 |
| Porfirazyny | H.6.1 | DMF | 0.05 | 181 | 0.14 | 719 | 4.83 |
| | | DMSO | 0.01 | 137 | 0.14 | 723 | 4.82 |
| | H.6.2 | DMF | 0.03 | 147 | 0.09 | 730 | 4.92 |
| | | DMSO | 0.04 | 112 | 0.07 | 726 | 4.89 |
| | H.6.3 | DMF | 0.04 | 99 | 0.12 | 733 | 4.62 |
| | | DMSO | 0.01 | 9 | 0.12 | 738 | 4.63 |
| | H.6.4 | DMF | 0.04 | 248 | 0.15 | 733 | 4.62 |
| | | DMSO | 0.01 | 17 | 0.13 | 738 | 4.59 |
| | H.6.5 | DMF | 0.04 | 203 | 0.09 | 730 | 4.97 |
| | | DMSO | 0.01 | 15 | 0.06 | 736 | 4.95 |
| | H.6.6 | DMF | 0.03 | 98 | 0.11 | 733 | 4.62 |
| | | DMSO | 0.06 | 26 | 0.13 | 738 | 4.63 |
| H.6.7 | DMF | 0.01 | 510 | 0.04 | 724 | 3.78 | |
| | DMSO | 0.00 | 29 | 0.06 | 731 | 3.80 | |
| H.6.8 | DMF | 0.02 | 182 | 0.25 | 724 | 4.83 | |
| | DMSO | 0.01 | 181 | 0.19 | 729 | 4.82 | |
| wzorzec - ZnPc | DMF | 0.20* | 10 | 0.56** | 668 | 5.62*** | |
| | DMSO | 0.17* | 4 | 0.67** | 670 | 5.43**** | |

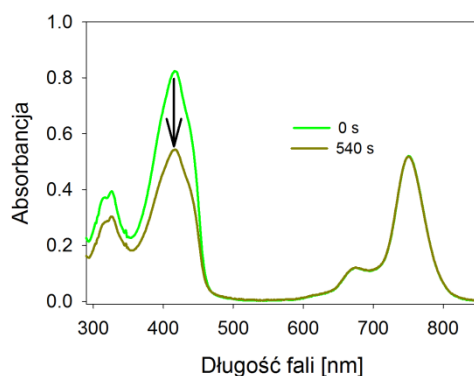
Tab. 1. Wydajność kwantowa fluorescencji, fotodegradacji oraz generowania tlenu singletowego porfirynoidów; *[103]; **[104]; ***[105]; ****[106]

Rozkład fotochemiczny porfirazyn podobnie jak ftalocyjanin, zachodził zgodnie z mechanizmem fotowysbielenia. Ekspozycja na światło widzialne porfirazyn zawierających jon magnezu(II) w centrum koordynacyjnym (**H.6.1-H.6.7**), powodowała obniżenie intensywności pasm absorpcji, bez jednoczesnego wykształcania pasm dodatkowych. Najbardziej stabilne spośród badanych porfirazyn były pochodne z podstawnikami 2,5-difenylopirolilowymi **H.6.3** ($\Phi_P=0,99 \cdot 10^{-4}$) i 2,3,5-trifenylopirolilowymi **H.6.6** ($\Phi_P=0,26 \cdot 10^{-4}$). Z drugiej strony, najbardziej podatną na rozkład była porfirazyna magnezu(II) z podstawnikami 2,5-di(4-chlorofenylo)pirolilowymi **H.6.7**.

3. Generowanie tlenu singletowego

W terapii fotodynamicznej bardzo istotnym procesem jest generowanie tlenu singletowego przez fotouczulacz [107,108]. Dla skutecznego leczenia wymagana jest interakcja fotouczulacza, światła i tlenu cząsteczkowego w miejscu (tkance) docelowym. Tlen singletowy, jako wysoce reaktywny czynnik niszczy komponenty komórki prowadząc do jej śmierci [109].

Pierwszą badaną grupą generatorów tlenu singletowego były ftalocyjaniny, które w zależności od jonu metalu skoordynowanego w centrum makrocykla oraz podstawników peryferyjnych, charakteryzowały się zróżnicowaną wydajnością. Wydajność kwantową dla pochodnej **H.1.1** wyznaczono metodą pośrednią z zastosowaniem 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF), jako wygaszacza chemicznego. Natomiast dla **H.2.1-H.2.2** metodą bezpośrednią, polegającą na pomiarze fosforescencji generowanego tlenu singletowego ($\lambda=1270$ nm); uzyskany sygnał jest proporcjonalny do stężenia $^1\text{O}_2$. Zmiany widm absorpcji mieszaniny DPBF oraz ftalocyjaniny **H.1.1**, rejestrowanych podczas naświetlania zaprezentowano na Ryc. 12.

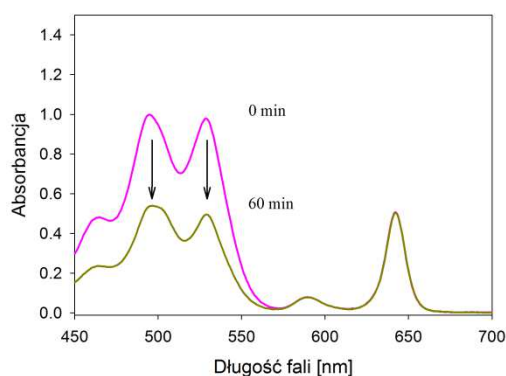


Ryc. 12. Generowanie tlenu singletowego przez ftalocyjaninę **H.1.1** w roztworze DMSO, w obecności DPBF jako wygaszacza chemicznego

Ftalocyjanina cynku(II) z podstawnikami 2-propoksyłowymi **H.1.1**, wytwarzała tlen singletowy z wydajnością $\Phi_{\Delta}=0,18$, natomiast ftalocyjanina magnezu(II) posiadająca identyczne podstawniki (**H.2.1**), charakteryzowała się wartością $\Phi_{\Delta}=0,04$. Odnotowane różnice powiązano z obecnością jonu cynku(II) w centrum makrocykla, ponieważ wzrost wydajności kwantowej po wbudowaniu do makrocykla jonu/atomu o dużej masie atomowej, znany jest jako efekt ciężkiego atomu [21]. Natomiast obecność podstawników 2-propoksyłowych w strukturze ftalocyjaniny, skutkowało obniżeniem wydajności w porównaniu ze wzorcem – niepodstawioną ftalocyjaniną cynku(II) (Tab. 1). Odnotowano, że zastąpienie podstawników 2-propoksyłowych (**H.2.1**) benzyloksyłowymi (**H.2.2**), powoduje

wzrost wydajności kwantowej, odpowiednio z $\Phi_{\Delta}=0,04$ do $\Phi_{\Delta}=0,14$. Natomiast rozbudowa podstawników benzyloksylowych (**H.2.2**, $\Phi_{\Delta}=0,14$) do 3,5-bis(benzyloksy)benzyloksylowych (**H.2.3**, $\Phi_{\Delta}=0,13$), znacząco nie zmieniła wydajności. Przyczyną braku proporcjonalnej korelacji pomiędzy „wielkością podstawnika”, a wartością Φ_{Δ} są zawady przestrzenne. Analogiczne tendencje odnotowano dla porfirazyn (badanych poza Osiągnięciem, pkt. **II A7**), zawierających podstawniki dendrymeryczne, tj. 3,5-bis(3,5-dimetoksybenzyloksy)benzyloksylowe [110–112].

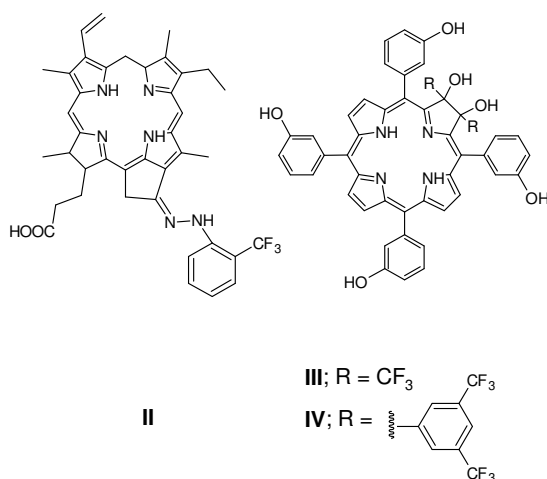
Najszerzej opisaną grupą fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej są porfiryny, które charakteryzują się absorpcją światła czerwonego na bardzo niskim poziomie. Najbardziej popularny, pierwszy tego typu preparat dopuszczony do użytku – Photofrin®, jest mieszaniną ok. 50 różnych pochodnych hematoporfiryny, a jego skład nie jest dokładnie określony, co niewątpliwie jest istotną wadą. Jednocześnie jest przyczyną różnic w uzyskiwanych efektach leczniczych, w zależności od partii leku. Wobec powyższego istniała i ciągle istnieje konieczność poszukiwania nowych fotouczulaczy. Odpowiednimi potencjalnymi kandydatami do zastosowań w PDT/PACT wydały się być chloryny, które w porównaniu do porfiryn charakteryzują się większą absorpcją światła z zakresu 600-800 nm [24,109,113]. Ponadto, chloryny okazały się wydajnymi generatorami tlenu singletowego po wzbudzeniu światłem czerwonym [114].



Ryc.13. Widma UV-Vis chloryny **H.5.2** podczas pomiaru wydajności generowania tlenu singletowego z wykorzystaniem rubrenu jako chemicznego wygaszacza

Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego dla chloryn **H.4.1** i **H.4.2** oraz **H.5.1-H.5.4**, wyznaczono z wykorzystaniem rubrenu jako wygaszacza chemicznego (Ryc. 13). Jak już wspomniano wcześniej – w badaniach nowych fotouczulaczy – związkiem wzorcowym względem którego ocenia się zdolność generowania, jest niepodstawiona ftalocyjanina cynku(II). Spośród ocenianych trzech grup porfirynoidów – zdecydowanie najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla chloryn. Stwierdzono, że wszystkie oceniane związki

(**H.4.1**, **H.4.2** oraz **H.5.1-H.5.4**) generowały tlen z wydajnością na poziomie wzorca, a w wielu przypadkach znacznie wyższą. Wysoka wydajność generowania tlenu singletowego umożliwia zmniejszenie dawki fotouczulacza, przy czym nie odnotowuje się zmniejszenia efektu leczniczego. Ponadto zastosowanie mniejszej dawki wiąże się ze słabiej nasilonymi działaniami ubocznymi, co stanowi niewątpliwą zaletę. W zestawieniu z fotouczulaczem zatwierdzonym do użytku klinicznego – Foscan® ($\Phi_{\Delta}=0,68$) [115] i chloryną będącą w badaniach klinicznych Ce6 ($\Phi_{\Delta}=0,63$) [115], zdecydowanie najkorzystniejszą zdolnością generowania tlenu charakteryzowała się chloryna **H.5.4** ($\Phi_{\Delta}=0,86$). Natomiast porównanie wartości Φ_{Δ} dla chloryn **H.5.1-H.5.4**, pozwoliło zauważyć, że wydajność kwantowa wzrasta z liczbą elektronoakceptorowych atomów fluoru w cząsteczce (Tab. 1). Podobną prawidłowość można zaobserwować w badaniach przedstawionych przez Tang i wsp., którzy analizowali porfiryny z podstawnikami fluorofenyłowymi [116]. Znaczenie obecności grup o właściwościach elektronoakceptorowych na generowanie tlenu, zaobserwowano porównując wydajność kwantową chloryny **H.5.4**, posiadającej elektronobiorczą grupę nitrową oraz opisaną w piśmiennictwie, analogicznej chloryny **I** (bez grupy nitrowej) Ryc. 8. Wymienione związki generują tlen ze zróżnicowaną wydajnością, odpowiednio $\Phi_{\Delta}=0,86$ oraz $\Phi_{\Delta}=0,41$ [93]. Ocena generowania tlenu przez izomeryczne chloryny **H.5.2** i **H.5.3**, wskazała, że na wydajność wpływa nie tylko liczba atomów fluoru, ale także położenie w pierścieniu fenyłowym, albowiem uzyskano $\Phi_{\Delta}=0,63$ dla izomeru orto oraz $\Phi_{\Delta}=0,59$ dla para. Dobrą wydajność kwantową obserwowano również w przypadku chloryny posiadającej podstawniki 3,5-di(trifluorometylo)fenylowe **H.4.2** ($\Phi_{\Delta}=0,69$) oraz z podstawnikami 4-(trifluorometylo)fenylowymi **H.4.1** ($\Phi_{\Delta}=0,50$). Porfirynoidy zawierające w strukturze cząsteczki atomy fluoru, były przedmiotem badań wielu autorów, m.in. Cheng i wsp., którzy oceniając pochodne chlorofilu także wskazywali, że związki zawierające grupę (trifluorometylo)fenylową połączoną z pierścieniem makrocyclicznym (**II**, Ryc. 12), generują tlen singletowy z dobrą wydajnością [117]. Z kolei Aicher i wsp. badali pochodne Foscanu® z podstawnikami trifluorometyłowymi, przyłączonymi bezpośrednio do pierścienia chloryny. Ten zespół autorów stwierdził, że wprowadzenie do cząsteczki makrocykla dwóch grup trifluorometylowych (**III**, Ryc. 14), nie wpływa na wydajność. Ale już podstawienie w tym samym położeniu pierścienia makrocyclicznego dwóch grup 3,5-di(trifluorometylo)fenylowych (**IV**, Ryc. 14), skutkuje 50% wzrostem generowania tlenu [118].



Ryc. 14. Struktury chemiczne chloryn z grupami trifluorometylowymi [117–119]

Ocenie zdolności generowania tlenu singletowego poddano również grupę porfirazyn **H.6.1-H.6.8** i stwierdzono, że najlepszym generatorem jest związek **H.6.8** [83], który stanowi kompleks cynku(II) z porfirazyną podstawioną czterema grupami dimetyloaminowymi oraz czterema 2,5-dimetylopirolilowymi. Analizując wyniki zaprezentowane w Tab. 1 można zauważyć, że podstawniki w ugrupowaniu pirolilowym porfirazyn nie odgrywają znaczącej roli w produkcji tlenu singletowego. Podobnie jak w przypadku ftalocyjanin, porównując wydajność kwantową porfirazyny cynku(II) **H.6.8** ($\Phi_{\Delta}=0,25$) oraz porfirazyny magnezu(II) **H.6.1** ($\Phi_{\Delta}=0,14$), obserwowano efekt ciężkiego atomu. Natomiast porównanie dwóch izomerycznych porfirazyn, niesymetrycznej **H.6.7** oraz symetrycznej **H.6.4**, pozwala wnioskować, jakie znaczenie ma redukcja symetrii cząsteczki na zdolność generowania tlenu – Ryc. 6. Związek posiadający naprzemiennie położone podstawniki **H.6.4**, generuje tlen z wydajnością $\Phi_{\Delta}=0,15$, a w przypadku porfirazyny z nienaprzemiennym usytuowaniem podstawników **H.6.7**, wydajność zdecydowanie maleje do wartości $\Phi_{\Delta}=0,04$. Należy podkreślić małą wydajność kwantową Φ_{Δ} porfirazyny **H.6.5** z rozbudowanymi podstawnikami 2,5-di(bifenyl-4-ilo)-pirolilowymi, które tworzą zawadę przestrzenną znacząco utrudniającą dostęp tlenu cząsteczkowego do pierścienia makrocyklicznego. Wiadomo, iż tworzenie tlenu singletowego wymaga interakcji tlen molekularny-pierścień makrocykliczny [23].

4. Aktywność biologiczna badanych makrocykli

Aktywność przeciwbakteryjna względem *Enterococcus faecalis*

Ocenie aktywności przeciwbakteryjnej względem *Enterococcus faecalis* poddano wszystkie porfirynoidy. Jednocześnie z powodu słabej rozpuszczalności w środowisku

wodnym, w badaniach *in vitro* zastosowano formulację liposomalną. Ze względu na elastyczność i zdolność do penetracji kanalików zębinowych najlepszymi liposomami wydawały się być inwazyjne, opisane wcześniej przez Dragicevic-Curic i wsp. [56] oraz Ossmann i wsp. [57]. Inwazyjne składają się z fosfolipidów, etanolu (3,3%) oraz terpenów (np. citralu) [120]. Jednak przeprowadzone badania wstępne wykazały, że „puste” inwazyjne zawierające jako składnik terpenowy citral lub cytronelal, wykazują aktywność bez naświetlania względem *E. faecalis*, co nie jest zgodne z założeniami terapii fotodynamicznej. Wobec powyższego w badaniach zastosowano nieaktywne mikrobiologicznie liposomy modyfikowane etanolem, rezygnując z komponenty terpenowej. Etanol jako składnik liposomów, zapewnia nośnikowi lipidowemu zwiększoną elastyczność oraz umożliwia efektywniejszą penetrację błon komórkowych [121].

Z danych literaturowych wynika, że jedną z niedogodności terapii fotodynamicznej jest ból odczuwany przez pacjenta podczas naświetlania miejsc chorobowo zmienionych [109]. Apalla i wsp. stwierdzili, że pacjenci odczuwają tylko minimalny dyskomfort, jeżeli do wzbudzenia fotouczulacza stosowane jest światło o natężeniu poniżej 25 mW/cm² [122]. Wobec powyższego wszystkie fotouczulacze były oceniane po wzbudzeniu promieniowaniem o natężeniu <22 mW/cm², a całkowita dawka światła była równa 30 J/cm². Aktywność fotouczulaczy testowano z wykorzystaniem trzech stężeń, tj. 100, 10 i 1 µmol/l. Otrzymane wyniki odnoszono do norm rekomendowanych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) dla związków przeciwbakteryjnych. Wg FDA uważa się, że związek posiada właściwości przeciwbakteryjne, jeżeli hamuje wzrost bakterii o 3 log CFU [96]. W interpretacji wyników, związkami referencyjnymi dla ocenianych porfirynoidów, były chloryna e6 (Ce6), której rozpuszczalne w wodzie modyfikacje są na etapie badań klinicznych (leczenie nowotworów) oraz błękit metylenowy (MB) zatwierdzony do użytku klinicznego (sterylizacja jednostek krwi). De Annunzio i wsp. oceniali względem *E. faecalis* aktywność Ce6 oraz MB testując różne dawki fotosensybilizatora oraz promieniowania. Wyznaczono, że dla Ce6 o stężeniu 126 µmol/l po aktywacji światłem w dawce 30 J/cm², redukcja wzrostu *E. faecalis* wynosi 0,47 log, podczas gdy po zwiększeniu dawki promieniowania do 45 J/cm², uzyskano wartość redukcji CFU równą 10,20 log. Natomiast MB zastosowany w stężeniu 156 µmol/l i wzbudzony dawką 30 J/cm² światła, powoduje redukcję wzrostu *E. faecalis* na poziomie 0,11 log. Aby uzyskać wysoki stopień redukcji wzrostu bakterii (9,98 log) należy użyć MB w dawce 312 µmol/l i wzbudzić go promieniowaniem 90 J/cm² [123].

Spośród badanych ftalocyjanin, związki **H.1.1**, **H.2.1** i **H.2.2** stosowane nawet w stężeniu mniejszym od wzorca (100 $\mu\text{mol/l}$), przewyższyły jego aktywność względem *E. faecalis*. W przypadku ftalocyjaniny **H.1.1** odnotowano redukcję żywych komórek bakterii o 5,7 log CFU, czyli prawie dwukrotnie więcej od normy ustalonej przez FDA. Analogiczna ftalocyjanina magnezu(II) **H.2.1** redukowała wzrost badanych bakterii o 3,61 log. Wydajniejszą inaktywację *E. faecalis* przez **H.1.1** można powiązać z jej wydajniejszym generowaniem tlenu singletowego w porównaniu z analogiczną pochodną magnezu(II) **H.2.1** (Tab. 1). Ważnym czynnikiem wpływającym na potencjał inaktywacji bakterii przez określony związek, jest struktura cząsteczki. Zaobserwowano bowiem, że ftalocyjanina magnezu(II) z podstawnikami 2-propoksyłowymi **H.2.1**, inaktywuje *E. faecalis* intensywniej pomimo, że generuje tlen z mniejszą wydajnością ($\Phi_{\Delta}=0,04$), w porównaniu z ftalocyjaniną magnezu(II) z podstawnikami benzyloksyłowymi **H.2.2** ($\Phi_{\Delta}=0,14$). Stwierdzono, że przyczyną opisanych zależności jest rozbudowane peryferium związku **H.2.2**, a dodatkowe potwierdzenie stanowi zupełny brak aktywności biologicznej ftalocyjaniny magnezu(II) **H.2.3**, posiadającej najbardziej rozbudowane podstawniki, tj. 3,5-bis(benzyloksy)benzyloksylove, pomimo generowania tlenu singletowego z dobrą wydajnością $\Phi_{\Delta}=0,13$. Natomiast dla ftalocyjanin **H.3.1** oraz **H.3.2** odnotowano wysoką redukcję wzrostu badanych bakterii o odpowiednio 5.02 oraz 3.71 log CFU – Tab. 2.

Natomiast bardzo wysoką zdolność do fotoinaktywacji *E. faecalis* obserwowano w grupie chloryn, a uzyskane wartości redukcji wzrostu bakterii, znacznie przekroczyły wymagania wg FDA. Największy potencjał w fotoinaktywacji wykazały demetalowane chloryny z podstawnikami fenyłowymi i fluorofenyłowymi **H.5.1-H.5.4**. Zastosowane w stężeniu ponad 100-krotnie mniejszym niż zatwierdzony do użytku klinicznego MB i będąca w badaniach klinicznych Ce6, powodowały redukcję wzrostu badanych bakterii 50 razy silniej (Tab. 2). W ostatnich latach Ossmann i wsp. badali aktywność zarejestrowanego fotouczulacza Foscan® inkorporowanego do inwazomów, względem *E. faecalis* w kanałach zębowych. Stwierdzili redukcję wzrostu bakterii o 3,6 log, przy zastosowaniu stężenia 50 $\mu\text{mol/l}$ i dawce światła 100 J/cm^2 [57]. Natomiast oceniane chloryny **H.5.1-H.5.4** wykazywały aktywność na poziomie 5 log, ale w stężeniu nawet 50-krotnie niższym. Ponadto należy podkreślić, że wyniki na tym poziomie uzyskano wzbudzając chloryny, ponad 3-krotnie niższą dawką promieniowania, tj. 30 J/cm^2 (w porównaniu do dawki stosowanej w aktywacji Foscanu®).

| logarytmiczny współczynnik redukcji wzrostu bakterii [log] | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-----------|-----------------|---|------|
| Związek | | 100 µmol/l | 10 µmol/l | 1 µmol/l | Analiza Microtox Hamowanie wzrostu <i>Vibrio fischeri</i> [%] | |
| Ftalocyjaniny | H.1.1 | faza jasna | 5.70 | - | - | 5.3 |
| | | faza ciemna | 0.00 | - | - | |
| | H.2.1 | faza jasna | 3.61 | 2.66 | - | 10.9 |
| | | faza ciemna | -0.02 | 0.00 | - | |
| | H.2.2 | faza jasna | 2.99 | 2.75 | - | -6.9 |
| | | faza ciemna | 0.02 | 0.11 | - | |
| | H.2.3 | faza jasna | -0.11 | -0.03 | - | - |
| | | faza ciemna | -0.08 | -0.09 | - | |
| | H.3.1 | faza jasna | 4.72 | 5.02 | - | 9.9 |
| | | faza ciemna | 0.08 | 0.01 | - | |
| H.3.2 | faza jasna | 6.02 | 3.71 | - | 33.62 | |
| | faza ciemna | 0 | -0.03 | - | | |
| Chloryny | H.4.1 | faza jasna | - | 4.05 | 2.26 | b.a |
| | | faza ciemna | - | -0.01 | 0.04 | |
| | H.4.2 | faza jasna | - | >5.44 | 4.84 | b.a |
| | | faza ciemna | - | 0.11 | 0.08 | |
| | H.5.1 | faza jasna | - | >5.44 | >5.44 | 22.4 |
| | | faza ciemna | - | n.a. | 0.08 | |
| | H.5.2 | faza jasna | - | >5.44 | >5.44 | 3.9 |
| | | faza ciemna | - | 0.04 | 0.10 | |
| | H.5.3 | faza jasna | - | >5.44 | >5.44 | 3.5 |
| | | faza ciemna | - | 0.03 | 0.04 | |
| H.5.4 | faza jasna | - | 4.33 | 5.44 | -3.3 | |
| | faza ciemna | - | 0.06 | 0.03 | | |
| Porfirazyny | H.6.1 | faza jasna | b.a. | b.a. | b.a. | - |
| | | faza ciemna | b.a. | b.a. | b.a. | |
| | H.6.8 | faza jasna | 5.52 | 1.07 | 0.16 | 4.2 |
| | | faza ciemna | 0.18 | -0.02 | -0.06 | |
| puste liposomy | faza jasna | b.a. | b.a. | brak aktywności | | |
| | faza ciemna | b.a. | | | | |

Tab. 2. Wartości log redukcji wzrostu *E. faecalis* oraz wartość [%] zahamowania wzrostu *V. fischeri* w analizie Microtox

Również grupa chloryn z podstawnikami trifluorometylofenylowymi wykazywała wysoką aktywność fotodynamiczną. Między innymi, pochodna z podstawnikami 3,5-di(trifluorometylo)fenylowymi **H.4.2**, powodowała 40 razy silniejszą redukcję wzrostu *E. faecalis*, w stężeniu 100-krotnie mniejszym tj. 1 µmol/l, w porównaniu do Ce6 i MB.

Spośród badanych porfirazyn, najwyższą aktywność względem *E. faecalis* wykazywała porfirazyna cynku(II) z podstawnikami 2,5-dimetylopirolilowymi **H.6.8**. Przy zastosowaniu stężenia 100 µmol/l i ekspozycji na dawkę promieniowania 30 J/cm² odnotowano aktywność przeciwbakteryjną >5,5 log. Otrzymana wartość wskazuje na ok. 50-krotnie większy potencjał inaktywacji *E. faecalis*, w porównaniu do fotouczulaczy przyjętych za wzorcowe (MB i Ce6). Dla analogicznych porfirazyn zawierających podstawniki 2,5-dimetylopirolilowe – **H.6.1** oraz **H.6.8**, które różnią się skoordynowanym jonem metalu (odpowiednio

magnezu(II) oraz cynku(II)), zaobserwowano znaczące różnice w fotodynamicznej inaktywacji badanych bakterii. Stwierdzono, że związek **H.6.8** powodował redukcję wzrostu bakterii o >5,5 log, podczas gdy **H.6.1** tylko o 0,3 log (Tab. 2). Zdecydowanie najkorzystniejszą aktywność **H.6.8** można uzasadnić wydajniejszym generowaniem tlenu singletowego, w porównaniu do pozostałych ocenianych porfirazyn (Tab. 1).

Dodatkowo niektóre spośród badanych fotouczulaczy testowano względem innych gatunków bakterii. Chloryny w stężeniu 1 $\mu\text{mol/l}$, aktywowane dawką światła 30 J/cm^2 , badano również względem *Staphylococcus aureus* i odnotowano współczynnik redukcji wzrostu log większy od 3 dla **H.4.2** (4,09 log), **H.5.1** (3,93 log), **H.4.1** (3,27 log) **H.5.2** (3,08 log). W przypadku pochodnych **H.5.3** oraz **H.5.4** zaobserwowano redukcję wzrostu bakterii odpowiednio na poziomie 2,75 log oraz 2,71 log. Testom poddano również bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzyby *Candida albicans* oraz *Trichophyton mentagrophytes* względem których nie obserwowano znaczącej aktywności.

Toksyczność badanych makrocykli

Rozszerzeniem badań biologicznych było przeprowadzenie testu screeningowego systemem Microtox®, który umożliwia ocenę toksyczności ciemnej. Test 81.9% Microtox® jest oparty na właściwościach bioluminescencyjnych bakterii *Vibrio fischeri*, które pod wpływem ekspozycji na czynnik toksyczny wymierają tracąc zdolność świecenia [124–126].

Vibrio fischeri poddano działaniu wszystkich badanych makrocykli – **H.1.1-H.6.8** (faza ciemna), które zastosowano w stężeniach analogicznych jakiego użyto przeciw *E. faecalis*. Większość makrocykli charakteryzowała się brakiem lub niską toksycznością. Brak aktywności w fazie ciemnej jest korzystną właściwością, dzięki której metoda fotodynamiczna jest wysoce selektywna – można „włączyć” światłem proces leczniczy tylko w miejscu chorobowo zmienionym [108].

Ciekawe zjawisko odnotowano dla ftalocyjaniny magnezu(II) z podstawnikami benzyloksylowymi **H.2.2** oraz dla demetalowanej chloryny **H.5.4** z podstawnikami pentafluorofenyłowymi, które powodowały nasilenie bioluminescencji. Efekt ten przypisano zjawisku hormezy. Zjawisko hormezy jest specyficzną formą stymulacji wzrostu organizmów po ekspozycji na niskie dawki ksenobiotyków [127].

Badania systemem Microtox® obejmowały także koniugaty ftalocyjaniny cynku(II) i terpenów (**H.3.1** i **H.3.2**). Terpeny stanowią dużą grupę biologicznie ważnych związków organicznych, które w środowisku naturalnym są produkowane przez rośliny, jak np.

karotenoidy oraz witamina A [128,129]. Pochodna **H.3.1** jest koniugatem ftalocyjaniny i tymolu, który występuje w warunkach naturalnych w tymianku [130]. Natomiast makrocykl **H.3.2** stanowi połączenie ftalocyjaniny z cząsteczkami karwakrolu, który wchodzi w skład olejków eterycznych oregano i tymianku [131]. Zarówno tymol, jak i karwakrol, wykazują silne właściwości przeciwbakteryjne, dlatego związki te są brane pod uwagę w zwalczaniu antybiotykoopornych szczepów bakterii, włączając także szczepy MRSA [132]. Jednakże na temat biologicznych właściwości karwakrolu istnieje w piśmiennictwie wiele sprzecznych doniesień [133]. Na przykład, w ostatnich latach badano koniugaty sulfametoksazolu z monocyklicznymi terpenami, takimi jak tymol i eugenol. Odnotowano synergistyczne działanie terpeny i sulfonamidu względem lekoopornych bakterii [130,134–136]. Karwakrol został sklasyfikowany przez FDA jako bezpieczny, jednak w piśmiennictwie można znaleźć doniesienia na temat cytotoksyczności karwakrolu względem niektórych komórek np. komórek wątroby HepG2 i jelita Caco-2 [137]. Jednocześnie w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach nie odnotowano genotoksyczności, ani uszkodzeń DNA w tkankach [138] oraz nie obserwowano działania klastogennego [139]. Z drugiej strony, odkryto ciekawe biologiczne właściwości karwakrolu, w tym działanie neuroprotektoryjne, które analizowano pod kątem zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [140]. Liczne eksperymenty z udziałem karwakrolu wskazują, że karwakrol wykazuje również działanie lecznicze względem zwłóknienia wątroby [141].

W przeprowadzonych badaniach systemem Microtox® stwierdzono, że spośród badanych porfirynoidów, koniugat ftalocyjaniny cynku(II) z karwakrolem **H.3.2**, charakteryzuje się największym stopniem inaktywacji *V. fischeri* (33,6%, Tab. 2). Dla porównania przeprowadzono ocenę toksyczności karwakrolu *in substantia* i stwierdzono zahamowanie wzrostu bakterii o 73,9%. Należy podkreślić, że potencjał przeciwbakteryjny w fazie ciemnej karwakrolu po skoniugowaniu z makrocyklem maleje, a jednocześnie związek aktywowany światłem zachowuje wysoką aktywność względem *E. faecalis*.

Współpraca

1. **Synteza porfirazyn (H.6) i ftalocyjanin (H.1, H.2, H.3)** – Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – dr Sebastian Lijewski, mgr Adam Tillo, dr Wojciech Szczołko, dr Tomasz Koczorowski, prof. dr hab. Tomasz Gośliński

2. **Synteza chloryn** (H.4, H.5) – Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk w Łodzi – mgr Justyna Śniechowska, prof. dr hab. Marek J. Potrzebowski
3. **Pomiary generowania tlenu singletowego metodą bezpośrednią** (H.2) – Pracownia Fotochemii Stosowanej, Wydział Chemii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza – dr Mateusz Gierszewski, prof. dr hab. Marek Sikorski
4. **Aktywność fotodynamiczna względem *E. faecalis*** (H.1, H.2, H.3, H.4, H.5, H.6) – Katedra i Zakład Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – dr Jolanta Długaszewska, prof. dr hab. Marzena Gajęcka
5. **Protonowanie i czasowo-rozdzielcze badania fluorescencji** (H.1) – Instytut Fizyki Eksperymentalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski – dr Piotr Kasprzycki, dr hab. Piotr Fita
6. **Badania technikami X-ray** (H.1) – Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu – prof. Maria Gdaniec oraz Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – dr hab. Ewa Tykarska

II. Podsumowanie

Bakterie *Enterococcus faecalis* są główną przyczyną infekcji miazgi zęba, które jako fakultatywne anaeroby mogą przetrwać warunki niesprzyjające namnażaniu, zwłaszcza jeśli umiejscowią się w kanalikach zębinowych. *E. faecalis* wykazuje oporność względem wielu antybiotyków m.in. β -laktamów (cefalosporyn), klindamycyny, tetracyklin, makrolidów, glikopeptydów. Potencjalnym narzędziem do eradykacji tego rodzaju bakterii, jest fotodynamiczna terapia antymikrobiologiczna (PACT).

Celem przedstawionego Osiągnięcia naukowego, było zdefiniowanie przydatności nowych fotouczulaczy z grupy porfirynoidów, potencjalnie użytecznych w leczeniu infekcji jamy ustnej bakteriami *E. faecalis*. Związki o największym potencjale zostały wyselekcjonowane spośród 18 porfirynoidów, w tym ftalocyjanin, chloryn i porfirazyn na podstawie analizy fotochemicznej oraz aktywności fotodynamicznej *in vitro*.

Przeprowadzono kompleksową ocenę właściwości fotodynamicznych czterech ftalocyjanin magnezu(II) i cynku(II), podstawionych w pozycjach nieperyferyjnych grupami 2-propoksyłowymi, benzyloksyłowymi bis(benzyloksy)benzyloksyłowymi, 5-metylo-2-(propan-2-ylo)fenoksyłowymi oraz 2-metylo-5-(propan-2-ylo)fenoksyłowymi.

Kolejną grupę stanowiło sześć demetalowanych chloryn, zawierających w pozycjach *mezo* podstawniki fenyłowe, fluorofenyłowe i trifluorometylofenyłowe. Na ostatnią grupę badanych związków składało się osiem porfirazyn magnezu(II) oraz cynku(II), zawierających w peryferium podstawniki dimetyloaminowe, 2,5-dimetylopirolilowe, 2-fenylo-5-metylopirolilowe, 2,5-difenylopirolilowe, 2,5-di(4'-chlorofenylo)pirolilowe, 2,5-di(bifenyl-4-ilo)pirolilowe oraz 2,3,5-trifenylopirolilowe.

W ocenie właściwości absorpcyjnych uwzględniono położenie oraz intensywność dwóch charakterystycznych dla grupy porfirynoidów pasm, tj. Soreta oraz Q, wyznaczono położenie maksimum absorpcji oraz wartości współczynników molowych. Korzystny dla PDT/PACT profil widma UV-Vis, posiadały ftalocyjaniny **H.1.1**, **H.2.1-H.2.3**, **H.3.1**, **H.3.2** wykazujące intensywną absorpcję promieniowania w paśmie Q oraz znacznie mniej intensywną w paśmie Soreta. Chloryny w porównaniu z ftalocyjaninami charakteryzowały się mniej intensywną absorpcją w czerwonym zakresie promieniowania, a w przypadku porfirazyn odnotowano oba pasma o dużej intensywności.

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie wydajności kwantowych fluorescencji, wartości niezbędnych dla potencjalnego zastosowania porfirynoidów w antybakteryjnej diagnostyce fotodynamicznej. Z danych literaturowych wynika, że jednym z kierunków rozwoju PACT jest właśnie diagnostyka infekcji bakteryjnych, z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji fotouczulaczy. Zarejestrowane widma wzbudzenia stanowiły lustrzane odbicia elektronowych widm absorpcji, co wskazuje, że geometria wzbudzonych związków nie różni się znacząco od geometrii cząsteczek w stanie podstawowym. W grupie ftalocyjanin stwierdzono, że intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do rozmiarów peryferium ftalocyjaniny. Największą wydajność kwantową fluorescencji na poziomie $\Phi_{FL}=0,17$, wykazywała ftalocyjanina **H.2.3** posiadająca najbardziej rozbudowane podstawniki, tj. 3,5-bis(benzyloksy)benzyloksylowe. W grupie chloryn badano cząsteczki zawierające zróżnicowaną liczbę atomów fluoru. W przypadku chloryn **H.5.1-H.5.4** z podstawnikami fenyłowymi i fluorofenyłowymi zaobserwowano, że elektronoakceptorowe atomy fluoru wpływały na obniżenie wydajności kwantowej fluorescencji. Na przykład, chloryna **H.5.1** nieposiadająca w cząsteczce atomów fluoru wykazywała $\Phi_{FL}=0,19$, podczas gdy **H.5.4** z dwudziestoma atomami posiadała $\Phi_{FL}=0,15$. Dla porfirazyn (**H.6.1-H.6.8**) odnotowano zjawisko emisji dualnej, widma charakteryzowały się dwoma pasmami emisji w zakresie UV-Vis. Pierwsze pasmo pojawiało się w czerwonym zakresie widma i było rezultatem transformacji stanu wzbudzonego S_1 , do stanu podstawowego S_0 . Drugie przypisane przejściom cząsteczki ze stanu S_2 do S_0 , występowało w niebieskim zakresie promieniowania.

Emisję dualną porfirazyn można uzyskać wzbudzając związek światłem UV, natomiast wzbudzenie światłem czerwonym powoduje wyemitowanie tylko pasma długofalowego.

Jednym z istotnych parametrów określających przydatność fotouczulaczy jest fotostabilność, której znajomość ma kluczowe znaczenie dla zoptymalizowania dozymetrii w badaniach biologicznych (czas naświetlania, natężenie i dawka promieniowania). Badane porfirazyny i ftalocyjaniny w czasie naświetlania ulegały fotowybieleniu, tworzyły się niskocząsteczkowe bezbarwne związki. Chloryny w przeciwieństwie do porfirazyn i ftalocyjanin, eksponowane na światło widzialne, ulegały fotodegradacji wg mechanizmu fototransformacji, z wytworzeniem makrocyklicznych produktów rozkładu i jednoczesną zmianą barwy.

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie wydajności generowania tlenu singletowego, którego tworzenie jest istotnym procesem dla powodzenia leczenia wg protokołu PACT. Tlen singletowy, jako wysoce reaktywny czynnik, niszczy komponenty komórki prowadząc do jej śmierci. Generowanie tlenu singletowego wyznaczono metodą pośrednią, wykorzystując jako wzorzec niepodstawioną ftalocyjaninę cynku(II) lub bezpośrednio przez pomiar fosforescencji przy $\lambda=1270$ nm (**H.2.1-H.2.3**). Jako chemiczne wygaszacze stosowano 1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF) lub rubren. Pierwszą badaną grupą były ftalocyjaniny, które w zależności od rodzaju jonu skoordynowanego w centrum makrocykla oraz podstawników peryferyjnych, generowały tlen osiągając maksymalną wartość $\Phi_{\Delta}=0,18$. Odnotowano, że zastąpienie podstawników 2-propoksyloowych (**H.2.1**) benzyloksyloowymi (**H.2.2**), powoduje wzrost wydajności kwantowej. Natomiast dalsza rozbudowa podstawników benzyloksyloowych do 3,5-bis(benzyloksy)benzyloksyloowych (**H.2.3**, $\Phi_{\Delta}=0,13$), nie wpływa istotnie na wydajność. Przyczyną braku proporcjonalnej korelacji pomiędzy „wielkością podstawnika”, a wartością Φ_{Δ} są zawady przestrzenne.

Spośród ocenianych trzech grup porfirynoidów – zdecydowanie najbardziej obiecujące wyniki generowania tlenu uzyskano dla chloryn. Wszystkie oceniane związki (**H.4.1**, **H.4.2** oraz **H.5.1-H.5.4**) generowały tlen z wydajnością na poziomie wzorca, a w wielu przypadkach zdecydowanie wyższą. Jest to bardzo korzystna właściwość ponieważ wysoka wydajność generowania tlenu, umożliwia zmniejszenie dawki fotouczulacza, przy zachowaniu efektu leczniczego na tym samym poziomie. Związek **H.5.4** wykazywał zdecydowanie najkorzystniejszą zdolność generowania tlenu $\Phi_{\Delta}=0,86$, zarówno spośród badanych chloryn, jak i w porównaniu z Foscanem – fotouczulaczem także z grupy chloryn, stosowanym już w praktyce klinicznej. Ponadto, zaobserwowano zwiększenie wydajności kwantowej ze wzrostem liczby elektronoakceptorowych atomów fluoru w cząsteczce.

Okazało się, że znaczenie ma również położenie atomów fluoru w pierścieniu fenylowym ponieważ cząsteczki izomeryczne **H.5.2** i **H.5.3**, posiadają zróżnicowaną wydajność, odpowiednio $\Phi_{\Delta}=0,63$ (pozycja *orto*) i $\Phi_{\Delta}=0,59$ (pozycja *meta*). Korelację pomiędzy wydajnością generowania tlenu obserwowano również w przypadku cząsteczek, zawierających odpowiednio cztery (**H.4.1**, $\Phi_{\Delta}=0,50$) oraz osiem podstawników (trifluorometylo)fenylowych (**H.4.2**, $\Phi_{\Delta}=0,69$).

Ocenie zdolności generowania tlenu singletowego poddano również grupę porfirazyn **H.6.1-H.6.8**, a najlepszym generatorem okazał się kompleks cynku(II) z porfirazyną podstawioną czterema grupami dimetyloaminowymi oraz czterema 2,5-dimetylopirolilowymi (**H.6.8**). Podobnie jak w przypadku ftalocyjanin, porównując wydajność kwantową porfirazyny cynku(II) **H.6.8** ($\Phi_{\Delta}=0,25$) oraz porfirazyny magnezu(II) **H.6.1** ($\Phi_{\Delta}=0,14$), obserwowano efekt ciężkiego atomu. Natomiast redukcja symetrii cząsteczki powoduje obniżenie wydajności, dla izomerycznych porfirazyn **H.6.4** i **H.6.7** z naprzemiennym i nienaprzemiennym usytuowaniem podstawników, uzyskano odpowiednio wartości $\Phi_{\Delta}=0,15$ oraz $\Phi_{\Delta}=0,04$. Małą wydajnością kwantową charakteryzowała się porfirazyna **H.6.5** z podstawnikami 2,5-di(bifenyl-4-ilo)-pirolilowymi ponieważ rozbudowane grupy bifenylopirolilowe tworzą zawadę przestrzenną, która znacząco utrudnia dostęp tlenu cząsteczkowego do pierścienia makrocyklicznego.

Wszystkie porfirynoidy poddano ocenie aktywności przeciwbakteryjnej względem *Enterococcus faecalis*. Jednocześnie z powodu słabej rozpuszczalności w środowisku wodnym, w badaniach *in vitro* zastosowano liposomy modyfikowane etanolem, nieaktywne mikrobiologicznie. Porfirynoidy inkorporowane do modyfikowanych liposomów wzbudzano światłem w dawce 30 J/cm^2 . Aktywność fotouczulaczy testowano z wykorzystaniem trzech stężeń, tj. 100, 10 i 1 $\mu\text{mol/l}$, a otrzymane wyniki odnoszono do norm rekomendowanych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) dla związków przeciwbakteryjnych. Wg FDA przyjmuje się, że związek posiada właściwości przeciwbakteryjne, jeżeli hamuje wzrost bakterii o 3 log CFU. W interpretacji wyników, związkami referencyjnymi dla ocenianych porfirynoidów były chloryna e6 (Ce6) oraz błękit metylenowy (MB).

Spośród badanych ftalocyjanin, związki **H.1.1**, **H.2.1** i **H.2.2** zastosowane w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$ (mniejszym od wzorca), wykazywały wysoką aktywność względem *E. faecalis*, spełniały wymagania stawiane przez FDA i charakteryzowały się dużo większą aktywnością od Ce6 i MB. Na przykład, w przypadku ftalocyjaniny cynku(II) z podstawnikami

2-propoksyłowymi **H.1.1**, odnotowano redukcję żywych komórek bakterii o 5,7 log CFU, czyli prawie dwukrotnie większą od ustalonej normy. Analogiczna ftalocyjanina magnezu(II) **H.2.1**, redukowała wzrost bakterii o 3,61 log. Ważną obserwacją jest wyraźne zmniejszanie aktywności przeciwbakteryjnej wraz z rozbudową peryferium ftalocyjanin (**H.1.1-H.2.2**), aż do całkowitego braku aktywności w przypadku ftalocyjaniny magnezu(II) (**H.2.3**), z podstawnikami 3,5-bis(benzylloksy)benzylloksylowymi, pomimo generowania tlenu singletowego z wydajnością 0,13. Natomiast pochodna **H.3.1** oraz **H.3.2** już w stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$ spełniały wymogi FDA dla związków przeciwbakteryjnych.

Bardzo wysoką zdolność do fotoinaktywacji *E. faecalis* obserwowano w grupie chloryn, a uzyskane wartości redukcji wzrostu bakterii znacznie przekroczyły wymagania wg FDA. Największy potencjał wykazywały demetalowane chloryny z podstawnikami fenyłowymi i fluorofenyłowymi **H.5.1-H.5.4**. Zastosowane w stężeniu ponad 100-krotnie mniejszym niż Ce6 i MB, powodowały redukcję wzrostu badanych bakterii 50 razy silniej. Także w przypadku zastosowania chloryny z podstawnikami trifluorometylofenyłowymi (**H.4.1** oraz **H.4.2**) w stężeniu 10-krotnie mniejszym, uzyskano wysoką aktywność fotodynamiczną, znacznie przewyższającą wymagania, tj. log 4,05 i >5,44. Pochodna z podstawnikami 3,5-di(trifluorometylo)fenyłowymi (**H.4.2**) już przy stężeniu 100-krotnie mniejszym niż wzorce tj. 1 $\mu\text{mol/l}$, powodowała 40 razy silniejszą redukcję wzrostu *E. faecalis*, a jej większą aktywność przeciwbakteryjną można powiązać z wydajnością generowania tlenu singletowego.

Potencjał inaktywacji chloryn w stężeniu 1 $\mu\text{mol/l}$ badano również względem *Staphylococcus aureus*; współczynnik redukcji wzrostu większy od log 3 odnotowano dla **H.4.2** (4,09), **H.5.1** (3,93), **H.4.1** (3,27) **H.5.2** (3,08).

W grupie porfirazyn wysoką aktywność względem *E. faecalis* wykazywała porfirazyna cynku(II) z podstawnikami 2,5-dimetylopirolilowymi **H.6.8**, która także najkorzystniej generowała tlen singletowy. Przy zastosowaniu stężenia 100 $\mu\text{mol/l}$ i po ekspozycji na promieniowanie 30 J/cm^2 , odnotowano aktywność przeciwbakteryjną >5,5 log.

Rozszerzeniem badań biologicznych było przeprowadzenie testu screeningowego systemem Microtox®, który umożliwia ocenę toksyczności ciemnej. Test 81.9% Microtox® jest oparty na właściwościach bioluminescencyjnych bakterii *Vibrio fischeri*, które pod wpływem ekspozycji na czynnik toksyczny wymierają tracąc zdolność bioluminescencji. *Vibrio fischeri* poddano działaniu badanych makrocycli (faza ciemna), które zastosowano w stężeniach analogicznych, jakie użyto przeciw *E. faecalis*. Otrzymane wyniki wskazują na

niską toksyczność w fazie ciemnej większości badanych makrocykli. Jest to korzystna właściwość, ponieważ zwiększa selektywność metody i pozwala na wykorzystanie procesu fotodynamicznego tylko w miejscach chorobowo zmienionych.

Ciekawe zjawisko odnotowano dla ftalocyjaniny magnezu(II) z podstawnikami benzyloksylowymi **H.2.2** oraz dla demetalowanej chloryny **H.5.4** posiadającej podstawniki pentafluorofenyłowe, które powodowały nasilenie bioluminescencji, co przypisano zjawisku hormezy. Zjawisko hormezy jest specyficzną formą stymulacji wzrostu organizmów, po ekspozycji na niskie dawki ksenobiotyków.

Najbardziej istotne osiągnięcia

1. Przeprowadzono kompleksową ocenę właściwości fotochemicznych osiemnastu nowych porfirynoidów z grupy ftalocyjanin, chloryn i porfirazyn
2. Wskazano związki posiadające najkorzystniejsze parametry, wymagane od potencjalnych fotosensybilizatorów stosowanych w antybakteryjnej terapii i diagnostyce fotodynamicznej (PACT):
 - (i) demetalowana chloryna z czterema podstawnikami fenyłowymi **H.5.1** – największa wydajność kwantowa emisji
 - (ii) demetalowana chloryna z czterema podstawnikami pentafluorofenyłowymi **H.5.4** (najlepsza zdolność generowania tlenu singletowego)
 - (iii) ftalocyjanina magnezu(II) z ośmioma podstawnikami bis(benzyloksy)benzyloksylowymi w pozycjach nieperyferyjnych – **H.2.3** (największa fotostabilność)
3. Wykazano, że największy potencjał w leczeniu infekcji jamy ustnej bakteriami *Enterococcus faecalis*, posiadają inkorporowane do modyfikowanych liposomów demetalowane chloryny z czterema podstawnikami fenyłowymi, difluorofenyłowymi oraz pentafluorofenyłowymi – **H.5.1-H.5.4**
4. Stwierdzono, że najkorzystniejsze właściwości dla endodoncji ze względu na najskuteczniejszą fotoinaktywację *Enterococcus faecalis*, a także generowanie tlenu singletowego z najlepszą wydajnością kwantową - posiada chloryna **H.5.4**

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Jestem absolwentem Liceum Ogólnokształcącego im. Janka z Czarnkowa w Czarnkowie. Zainteresowanie chemią przejawiałem już w szkole średniej, wielokrotnie z dobrymi rezultatami brałem udział w Konkursach i Olimpiadach Chemicznych (Laureat Ogólnopolskiego Konkursu Chemicznego organizowanego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Konkursu Chemicznego organizowanego przez Wydział Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu). Po zdaniu matury rozpocząłem studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej/obecnie Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pomimo, że mogłem podjąć studia bez egzaminu wstępnego na Wydziale Chemii UMK lub UAM. Studia ukończyłem z wynikiem bardzo dobry w 2007 roku, wykonaniem pracy magisterskiej pt. „Synteza pochodnych amidowych antrachinonów i ich analogów pochodnych nafto[2,3-b]tiofen-4,9-dionu, potencjalnych inhibitorów telomerazy” w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych. Celem pracy było otrzymanie nowych związków zdolnych do hamowania telomerazy poprzez stabilizację G-kwartetu, struktury tworzącej się z jednoniciowego końca telomerów. Struktura ta blokuje działanie telomerazy, enzymu odpowiedzialnego za nieśmiertelność komórek nowotworowych. W ramach pracy magisterskiej otrzymano osiem nowych pochodnych amidowych antrachinonu, potencjalnych inhibitorów telomerazy (zał. 4 pkt. II D 5, 6). W roku 2006, będąc jeszcze studentem IV roku kierunku Farmacja, rozpocząłem studia na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Studia na drugim kierunku ukończyłem wykonaniem pracy inżynierskiej pt. „Interakcje lek – żywność” (zał. 4 pkt. II D 3). W roku 2008 odbyłem 6-miesięczny obowiązkowy staż apteczny w aptece ”Na Garbarach” w Poznaniu. Następnie, pracowałem w aptece ogólnodostępnej na stanowisku magister farmacji. W 2009 roku rozpocząłem pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na stanowisku asystenta i włączyłem się w realizowaną wówczas tematykę badawczą Zespołu, dotyczącą fotodegradacji substancji leczniczych i gotowych postaci leków. Szczególnym obiektem mojego zainteresowania były substancje lecznicze z grupy inhibitorów 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA). Przeprowadzone badania, w których współuczestniczyłem dotyczyły oceny trwałości fotochemicznej pitawastatyny, fluwastatyny, lowastatyny, simwastatyny, glenwastatyny oraz atorwastatyny wg zaleceń I wersji Dokumentu ICH

(International Conference on Harmonization) [142]. W Dokumencie ICH znajdują się opisy zunifikowanych procedur testowania fotostabilności, wskazania dotyczące zalecanych źródeł światła, komór, warunków podczas naświetlania oraz protokoły badania różnych formułacji. W przypadku glenwastatyny wyizolowano produkty fotorozkładu z wykorzystaniem semipreparatywnej HPLC, a następnie badano techniką MS. Stwierdzono, że łańcuch heptenowy zostaje utleniony, a dalsza cyklizacja prowadzi do powstania dwóch stereoizomerów zawierających trzy skondensowane pierścienie. Natomiast w odniesieniu do pitawastatyny udowodniono powstanie sześciu produktów, w tym dwóch głównych, a mianowicie 6-cyklopropylo-10-fluoro-7,8-dihydrobenzo[*k*]fenantrydiny (PP3) oraz 6-cyklopropylo-10-fluorobenzo[*k*]fenantrydiny (PP4) – tetracyklicznych produktów powstałych na skutek fotocyklizacji bocznego łańcucha. Cytotoksyczność pitawastatyny i produktów fotorozpadu zbadano na ludzkich keratynocytach NCTC-2544 i wykazano, że wszystkie trzy związki wykazują efekty fototoksyczne. Badania przeprowadzone cytometrem przepływowym wykazały, że pitawastatyna oraz PP4 powodują głównie nekrozę badanych komórek (NCTC-2544). Trzecim zagadnieniem, które analizowałem, była funkcjonalizacja wielościennych nanorurek węglowych oraz próby ich związania z pitawastatyną. Odnotowano zwiększoną fotostabilność pitawastatyny po naniesieniu na nanorurki węglowe (zał. 4 pkt. **II A 20, 22, 24**).

W tym okresie, pozostając w dalszym ciągu w kręgu zainteresowań fotochemii, swoje naukowe badania skupiłem na zagadnieniach związanych z terapią fotodynamiczną, ze szczególnym uwzględnieniem związków stosowanych jako fotosensybilizatory. Efektem studiowania i analizy piśmiennictwa był cykl 3 prac o charakterze poglądowym, które dotyczyły procedury przeprowadzania, stosowanych leków oraz perspektyw rozwoju PDT. Szczegółowo zostały przedyskutowane zagadnienia dotyczące porfiryn, chloryn, teksafiryn, ftalocyjanin, terapii śródmiąższowej i nośników fotouczulaczy (zał. 4 pkt. **II D 1, 2, 4**). Jednocześnie rozpocząłem badania eksperymentalne dotyczące oceny właściwości fizykochemicznych i fotochemicznych porfirynoidów z grupy porfirazyn i ftalocyjanin, które stanowiły temat mojej rozprawy doktorskiej pt. „Ocena fotochemiczna porfirazyn i ftalocyjanin z podstawnikami heterocyklicznymi i alkoksyłowymi o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej”. Szczegółowym obiektem badań były pochodne ftalocyjanin i porfirazyn, dla których przeprowadziłem kompleksową ocenę właściwości fotofizycznych i fotodynamicznych. Badania aktywności biologicznej prowadziłem na liniach komórkowych HeLa, CEM oraz SK-MEL-5, w fazie jasnej oraz w ciemnej. Najbardziej aktywny związek tj. ftalocyjanina cynku(II) charakteryzowała się $IC_{50}=500$ nmol/l względem

CEM, 72 nmol/l względem HeLa oraz 81 nmol/l względem SK-MEL-5. Porfirazyna cynku(II) efektywnie po naświetleniu inaktywowała wirusy: opryszczki typu 1 i 2, ospy, pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej. Ftalocyjanina miedzi(II) po naświetleniu skutecznie inaktywowała wirusa: Sindbis, opryszczki typu 1, paragrypy, Punta Toro, Grypy typu A podtypu H1N1 i H3N2 oraz Grypy typu B (zał. 4 pkt. **II A 8, 13, 18, 19, 21**).

Podczas realizacji doktoratu nawiązałem współpracę z dr hab. Piotrem Fitą z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie w roku 2012 odbyłem tygodniowy staż podczas, którego zapoznałem się z zagadnieniami pomiarów absorpcji przejściowej i zaników fluorescencji. Jeden z etapów mojego doktoratu dotyczył zagadnienia fotoinaktywacji wirusów. W celu szerszego zapoznania się z tym tematem, w roku 2013 nawiązałem kontakt z prof. Janem Balzarinim z Katholieke Universiteit Leuven, Rega Institute, gdzie odbyłem 2-tygodniowy staż naukowy. Podczas pobytu w Laboratorium prof. J. Balzariniego, zapoznałem się z zagadnieniami metodyki prowadzenia badań aktywności przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych porfirynoidów.

Pracę doktorską obroniłem z wyróżnieniem w lutym 2015 roku, uzyskując jednocześnie nominację Rady Wydziału Farmaceutycznego do finału Konkursu „Lider Nauk Farmaceutycznych”.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były częściowo realizowane w ramach projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, których byłem współwykonawcą:

1. „Koniugaty porfirazynowo-nitroimidazolowe, jako fotosensybilizatory dla terapii fotofotodynamicznej”, nr N401 067 238
2. „Modyfikowane porfirynoidy o potencjalnym zastosowaniu w terapii oraz diagnostyce chorób nowotworowych i infekcji wirusem grypy”, nr N404 069440

Ponadto byłem stypendystą:

1. Trzykrotnie – „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, w latach 2012-2014
2. Programu „Etiuda 1” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki 2013/08/T/NZ7/00242

W okresie przed doktoratem prowadziłem zajęcia (ćwiczenia i seminaria) z przedmiotu „Chemia ogólna” ze studentami kierunku Kosmetologia, „Chemia analityczna ilościowa” oraz „Chemia instrumentalna” na kierunku Farmacja. Pełniłem także funkcję opiekuna czterech prac magisterskich.

Za cykl oryginalnych publikacji naukowych dotyczących syntezy i oceny właściwości fotochemicznych fotouczulaczy z grupy porfirynoidów, otrzymałem 3-krotnie Zespołową Naukową Nagrodę Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – za rok 2012, 2013 i 2014.

W latach 2009-2014 tj. przed obroną pracy doktorskiej, opublikowałem jako współautor **8 prac oryginalnych**, 5 prac przeglądowych oraz jedną pracę o charakterze popularno-naukowym. Brałem czynny udział w 16 konferencjach, zjazdach i sympozjach naukowych, w tym 2 zagranicznych oraz 14 krajowych. Za prezentację pracy na I Międzynarodowej Konferencji Naukowej – Oxygenalia 2012 pt. "Tlen pierwiastkiem życia" otrzymałem wyróżnienie.

Pełniłem również funkcję recenzenta 2 manuskryptów dla czasopisma Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry – 2012 rok.

5.2. Osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałem i rozwijałem tematykę badawczą dotyczącą oceny fotochemicznej fotosensybilizatorów. W celu poszerzenia wiedzy i rozwinięcia warsztatu badawczego, odbyłem 2 staże naukowe w Universidad Autonoma de Madrid w Hiszpanii, pierwszy 4-miesięczny w roku 2015 oraz miesięczny w 2016 roku. W laboratorium kierowanym przez prof. Tomasa Torresa zajmowałem się syntezą i charakterystyką nowych pochodnych ftalocyjanin cynku(II), zawierających jako podstawniki peryferyjne grupy N-metylo-3-oksy-5-perylenopirydylowe oraz ferrocenowe.

W tym okresie moje szczególne zainteresowania naukowe, poza opisanymi jako Osiągnięcie habilitacyjne, skupiały się na trzech głównych dziedzinach: (1) teranostyczne liposomy dla terapii i diagnostyki, (2) ocena właściwości fotochemicznych dendrymerycznych porfirazyn, (3) badania protonowania porfirazyn i ftalocyjanin.

5.2.1. Teranostyczne liposomy dla terapii i diagnostyki

Głównym celem badań, w których współuczestniczyłem/uczestniczę było otrzymanie nowych liposomów GdLip oraz ich charakterystyka. Nośniki zawierające jony Gd(III) wykazujące właściwości paramagnetyczne mogą być użyteczne w obrazowaniu MRI, dostarczając do miejsc docelowych makrocycle ftalocyjaninowe [143,144]. W badaniach wykorzystano niepodstawioną ftalocyjaninę cynku(II), jako modelowy związek. Otrzymane liposomy GdLip z inkorporowanym fotouczulaczem były charakteryzowane z wykorzystaniem kilku metod: określono średnicę, potencjał zeta, wydajność inkorporowania oraz stabilność. Następnie

liposomy GdLip poddano badaniom fotochemicznym oraz określono zdolność emisji sygnału rezonansu magnetycznego. Zakłada się, że wyniki zaproponowanych badań umożliwią określenie wpływu składu lipidowego liposomów, rozmiaru liposomów, wydajności inkorporacji na sygnał rezonansu magnetycznego (MR), na właściwości kontrastowe jonów Gd(III) oraz aktywność fotodynamiczną inkorporowanego fotouczulacza. Liposomy GdLip dostarczają chelat Gd(III) – czynnik diagnostyczny, umożliwiając diagnozowanie nowotworów metodą MR i jednocześnie czynnik terapeutyczny – fotouczulacz, który selektywnie naświetlony produkuje tlen singletowy, prowadząc do śmierci komórek nowotworowych. Badania fizykochemiczne nowych liposomów obejmują określenie ich wielkości metodą NTA (analiza śledzenia nanocząstek), wyznaczenie temperatury przejść fazowych metodą DSC oraz ocenę zdolności generowania tlenu singletowego. Następnie, przeprowadzone zostaną pomiary relaksacji w polu magnetycznym o dwóch różnych częstotliwościach 9.4 T (400 MHz) oraz 0.39 T (16.5 MHz). Określona zostanie również cytotoksyczność oraz aktywność fotodynamiczna względem komórek nowotworowych (HeLa) oraz prawidłowych. Dotychczasowe wyniki wskazały wyraźnie wyższą wydajność kwantową generowania tlenu singletowego, po inkorporowaniu ZnPc do GdLip złożonych z lipidów niepegylowanych, zawierających L- α -fosfatydyloglicerol w porównaniu do nośników z lipidami kationowymi i/lub pegylowanymi (zał. 4 pkt. II A 4).

5.2.2. Ocena właściwości fotochemicznych dendrymerycznych porfirazyn

Jako współwykonawca uczestniczyłem w badaniach dotyczących systematycznej możliwości rozbudowy peryferium porfirazyn, głównie siarkowych oraz azotowych. Efektem prac było otrzymanie rozgałęzionych struktur dendrymerycznych, składających się ze zdefiniowanych i powtarzających się wielokrotnie wielofunkcyjnych jednostek (merów). Uzyskano nowe porfirazyny i tribenzoporfirazyny funkcjonalizowane ugrupowaniami izoftaloksyalkilowymi, benzyłowymi (dendrony typu Frecheta G0 i G1), 4-metoksyfenyłowymi, 4-benzoksyfenyłowymi, 3,5-dibenzoksyfenyłowymi, butoksyłowymi. Zbadano właściwości przeciwnowotworowe czterech najbardziej obiecujących tribenzoporfirazyn siarkowych, pod kątem fotosensybilizacji w terapii fotodynamicznej. Z uzyskanych danych wynika, iż związki te wykazują bardzo wysoką – nanomolową aktywność fotodynamiczną zarówno w postaci wolnej, jak i po wbudowaniu w liposomy. Przeprowadzono szczegółową analizę absorpcyjno-emisyjną i charakterystykę fotofizyczną. Badania właściwości emisyjnych polegały na analizie przebiegu rejestrowanych widm, a także wyznaczeniu wydajności kwantowych fluorescencji. Oceniono także tendencję do

agregacji w DMF lub w DMSO. Wykonano ocenę oddziaływań wybranych nowych porfirazyn z tetratiafulwalenem, chlorkiem gadolinu oraz substancją czynną farmaceutycznie – nifedypiną. Analizę przeprowadzono wykorzystując metodę Joba, czyli metodę zmian ciągłych. Proces kompleksowania zaobserwowano tylko w przypadku porfirazyny magnezowej z podstawnikami 3,5-dihydroksymetylofenoksybutylosulfanyłowymi oraz tetratiafulwalenu. Przeprowadzono ocenę zdolności generowania tlenu singletowego oraz trwałości fotochemicznej, a najlepszymi parametrami charakteryzowała się modyfikowana tribenzoporfirazyna z podstawnikami izoftaloksyalkilowymi oraz 3,5-dihydroksymetylofenoksybutylosulfanyłowymi.

Dla czterech dendrymerycznych porfirazyn posiadających peryferyjne ugrupowania izoftaloksyalkiloosulfanyłowe przeprowadzono badania właściwości elektrochemicznych. Pomiar przy użyciu woltamperometrii cyklicznej wykazały dobrą odwracalność elektrochemiczną badanych związków. Porfirazyna kobaltowa, ze względu na występowanie przemian redoks spowodowanych obecnością aktywnego jonu centralnego, może znaleźć potencjalne zastosowanie jako katalizator przeniesienia ładunku w reakcjach utleniania–redukcji. Natomiast porfirazyna z podstawnikami izoftalobutoksyłowymi i jonem Co(II) została poddana badaniom elektrokatalitycznym na elektrodzie modyfikowanej nanorurkami węglowymi. Oceniono reakcję utlenienia hydrazyny w obecności katalizatora porfirynoidowego z jonami Co(II) (zał. 4 pkt. II A 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15).

5.2.3. Badania protonowania porfirazyn i ftalocyjanin

Zakres badań dotyczył protonowania oraz agregacji dwóch metaloftalocyjanin (cynku i magnezu) z nieperyferyjnymi podstawnikami 1,4,7-trioksanonyłowymi. Oba związki łatwo ulegały protonowaniu w rozpuszczalnikach organicznych, a jon metalu w centrum makrocykla silnie wpływał na przebieg procesu. Odnotowano, że pochodna magnezowa tworzy formy *cis*-protonowane natomiast pochodna cynkowa – *trans*. Dodatkowo dla ftalocyjanin podstawionych nieperyferyjnie grupami *n*-butyloksyłowymi stwierdzono, że tworzenie protonowanych form *cis*, jest powszechnym zjawiskiem dla magnezowych ftalocyjanin alkoksyłowych. Wykazano ponadto, że tworzenie formy *cis* następuje w dużo niższych stężeniach jonów wodorowych niż w przypadku formy *trans*. Badania agregacji wykazały, że ftalocyjaniny trioksanonyłowe z inkorporowanym jonem magnezu, łatwiej tworzą fluoryzujące agregaty typu *H* w rozpuszczalnikach niekoordynujących w porównaniu z pochodnymi cynkowymi. Powstawanie agregatów typu *J* jest blokowane przez tworzenie

wewnątrzcząsteczkowych wiązań koordynacyjnych pomiędzy atomami tlenu podstawników, a jonem metalu w centrum makrocykla (zał. 4 pkt. **II A 6**).

Po uzyskaniu stopnia doktora do chwili obecnej – jestem współautorem **27 prac oryginalnych, 3 przeglądowych** oraz 29 komunikatów zjazdowych (w tym 1 wystąpienie ustne), prezentowanych na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. Na XI International School-Conference of Young Scientists on Chemistry of Porphyrins and their Analogues, Ivanovo, zostałem nagrodzony za najlepiej przedstawioną prezentację ustną – 2017 rok.

W tym okresie pełniłem funkcję kierownika jednego projektu badawczego finansowanego przez NCN (Theranostic GdLip: Bifunkcjonalne liposomy jako nośniki jonów gadolinu i fotouczulaczy ftalocyjaninowych o potencjalnym zastosowaniu w obrazowaniu MR i terapii fotodynamicznej, 2012/07/N/NZ7/04325), natomiast w trzech projektach byłem wykonawcą (2016/21/B/NZ9/00783; 2016/21/D/NZ7/01607; 2012/05/E/NZ7/01204).

W latach 2017-2019 wykonałem 7 recenzji manuskryptów dla indeksowanych czasopism naukowych (Molecules, Biomolecules, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Materials Chemistry C).

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałem zajęcia ze studentami kierunku Farmacja, Kosmetologia, Analityka medyczna (ćwiczenia i seminaria). Uczestniczyłem w zajęciach fakultatywnych „Środki diagnostyczne i metody obrazowania” na kierunku Farmacja. Ponadto prowadziłem/prowadzę różne formy zajęć na nowym kierunku – Analityka kryminalistyczna i sądowa. Dla tego kierunku opracowałem program nauczania, sylabusu i prowadziłem zajęcia z przedmiotu „Toksyczność związków nieorganicznych”. Biorę również udział w realizacji zajęć dydaktycznych w ramach pracowni specjalistycznej dla studentów V roku na kierunku Farmacja.

Dotychczas uczestniczyłem w realizacji 8 prac magisterskich, w tym 2 razy w funkcji kierownika, a 6 razy opiekuna, wykonywanych w macierzystej Katedrze (lata 2010-2018).

Praca magisterska zrealizowana pod moją opieką i kierownictwem przez studenta Daniela Zientala, została wykonana w ramach programu Erasmus we współpracy z prof. Tomasem Torresem i prof. Salome Rodriguez-Morgade z Departamento Chimica Organica, Universidad Autonoma de Madrid (rok 2018 rok). Ponadto autor jednej pracy magisterskiej został laureatem I miejsca 54. Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich (2018 rok). Byłem recenzentem 6 prac magisterskich wykonanych na kierunku Farmacja, 2 prac licencjackich na kierunku Kosmetologia oraz jednej na kierunku Biotechnologia. Recenzowałem także prace

magisterskie na potrzeby Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich, Wydziału Farmaceutycznego UMP.

W macierzystej Katedrze założyłem oraz jestem opiekunem Studenckiego Koła Naukowego „Fotochemia Związków Makrocyklicznych”. Członkowie Koła uczestniczą w konferencjach i zjazdach naukowych i dwukrotnie zdobyli I miejsce na Ogólnopolskim Konkursie Prac Naukowych, Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji – rok 2017 i 2018.

W ramach upowszechniania nauki prowadziłem wykłady dla uczniów LO im. Księżnej Elżbiety w Szczecinku oraz dla uczniów LO im. Janka z Czarnkowa w Czarnkowie. Od kilku lat biorę czynny udział w organizacji Festiwalu Nauki i Sztuki, prezentując pokazy chemiczne dla uczniów szkół średnich.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora za działalność naukową otrzymałem Indywidualną Nagrodę Naukową Rektora UMP (rok 2016), dwie Zespołowe Nagrody Naukowe Rektora UMP (rok 2015, 2017). W roku 2017 otrzymałem Zespołową Nagrodę Rektora za Osiągnięcia Organizacyjne.

6. Oferta naukowa Habilitanta

Dynamiczny wzrost oporności mikroorganizmów na wiele typów antybiotyków wymusza poszukiwanie nowych niekonwencjonalnych metod leczenia infekcji. Obserwuje się wzrost występowania infekcji opornych na antybiotyki bakterii takich jak *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, oraz *P. aeruginosa*. Jednocześnie systematycznie wzrasta zachorowalność na choroby nowotworowe. Z tego względu, ciągle aktualne jest poszukiwanie nowych i doskonalenie już istniejących metod leczenia, np. terapii fotodynamicznej. O powodzeniu terapii decyduje efektywne wzbudzenie fotouczulacza światłem, jednak z uwagi na fakt, iż światło w ograniczonym stopniu penetruje tkanki PDT posiada pewne ograniczenia.

Wobec powyższego planuję prowadzenie badań nad wprowadzeniem do terapii fotodynamicznej nowego czynnika wzbudzającego fotouczulacz, a mianowicie ultradźwięków. Wiadomo, że ultradźwięki o wysokiej intensywności indukują dysocjację i tworzenie rodników oraz wzbudzenie molekuł. Opisane zjawisko stanowi podstawę sonochemii – zajmującej się procesami inicjowanymi przez ultradźwięki. Początkowo uważano, że efekt sonodynamiczny jest analogiczny do efektu fotodynamicznego, a energia jest przekazywana z uczulacza na tlen cząsteczkowy. Kolejne eksperymenty pokazały, że sonodynamiczny efekt terapeutyczny wykazuje mechanizm złożony. Formy pośrednie tworzące się w czasie procesu nie zostały dotąd zidentyfikowane. W związku z tym, celem

moich badań będzie ustalenie zależności pomiędzy aktywnością biologiczną względem bakterii i komórek nowotworowych a strukturą uczulacza, intensywnością, częstotliwością ultradźwięków. Zakładam, że rozszerzenie wiedzy na temat terapii sonodynamicznej umożliwi jej rozwój i wprowadzenie do użytku klinicznego.

7. Piśmiennictwo

- [1] K. O’Riordan, O.E. Akilov, T. Hasan, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2 (2005) 247–262.
- [2] G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti, G. Roncucci, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 468–481.
- [3] P.W. Taylor, P.D. Stapleton, J.P. Luzio, *Drug Discov. Today* 7 (2002) 1086–1091.
- [4] E. Alves, M.A. Faustino, M.G. Neves, A. Cunha, J. Tome, A. Almeida, *Future Med. Chem.* 6 (2014) 141–164.
- [5] L.B. Rice, *J. Infect. Dis.* 197 (2008) 1079–1081.
- [6] E.D. Brown, G.D. Wright, *Nature* 529 (2016) 336–343.
- [7] G.D. Wright, A.D. Sutherland, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 260–267.
- [8] M. Wainwright, T. Maisch, S. Nonell, K. Plaetzer, A. Almeida, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, *Lancet Infect. Dis.* 17 (2017) e49–e55.
- [9] K. Bush, M.G.P. Page, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 44 (2017) 113–132.
- [10] C.M.B. Carvalho, A.T.P.C. Gomes, S.C.D. Fernandes, A.C.B. Prata, M.A. Almeida, M.A. Cunha, J.P.C. Tomé, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, Z. Lin, J.P. Rainho, J. Rocha, *J. Photochem. Photobiol. B* 88 (2007) 112–118.
- [11] T. Dai, Y.-Y. Huang, M.R. Hamblin, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 6 (2009) 170–188.
- [12] T.G. St. Denis, T. Dai, L. Izikson, C. Astrakas, R.R. Anderson, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, *Virulence* 2 (2011) 509–520.
- [13] D.M.A. Vera, M.H. Haynes, A.R. Ball, T. Dai, C. Astrakas, M.J. Kelso, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 499–511.
- [14] (2013).
- [15] A. Spaeth, A. Graeler, T. Maisch, K. Plaetzer, *Eur. J. Med. Chem.* (2017).
- [16] L. Ryskova, V. Buchta, R. Slezak, *Open Life Sci.* 5 (2010) 400–406.
- [17] L. Sobotta, P. Skupin – Mrugalska, J. Mielcarek, T. Goslinski, J. Balzarini, *Mini-Rev. Med. Chem.* 15 (2015) 1–1.
- [18] J.Y. Nagata, N. Hioka, E. Kimura, V.R. Batistela, R.S.S. Terada, A.X. Graciano, M.L. Baesso, M.F. Hayacibara, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 9 (2012) 122–131.
- [19] S. Ishikawa, K. Suzuki, E. Fukuda, K. Arihara, Y. Yamamoto, T. Mukai, M. Itoh, *FEBS Lett.* 584 (2010) 770–774.
- [20] Y. Su, J. Sun, S. Rao, Y. Cai, Y. Yang, *J. Photochem. Photobiol. B* 103 (2011) 29–34.
- [21] K. Ishii, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 1556–1568.
- [22] N.A. Kuznetsova, O.L. Kaliya, *J. Porphyr. Phthalocyanines* 16 (2012) 705–712.
- [23] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev.* 233 (2002) 351–371.
- [24] M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R.K. Pandey, *Chem Soc Rev* 40 (2011) 340–362.
- [25] J.P. Celli, B.Q. Spring, I. Rizvi, C.L. Evans, K.S. Samkoe, S. Verma, B.W. Pogue, T. Hasan, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2795–2838.
- [26] P. Skupin-Mrugalska, L. Sobotta, M. Kucinska, M. Murias, J. Mielcarek, N. Duzgunes, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 4059–4073.
- [27] M. Tim, *J. Photochem. Photobiol. B* 150 (2015) 2–10.

- [28] A. Martinez De Pinillos Bayona, P. Mroz, C. Thunshelle, M.R. Hamblin, *Chem. Biol. Drug Des.* 89 (2017) 192–206.
- [29] R.M. Jones, Q. Wang, J.H. Lamb, B.D. Djelal, R. Bonnett, C.K. Lim, *J. Chromatogr. A* 722 (1996) 257–265.
- [30] R. Kilger, M. Maier, R.-M. Szeimies, W. Bäumlner, *Chem. Phys. Lett.* 343 (2001) 543–548.
- [31] D. Manoil, A. Filieri, J. Schrenzel, S. Bouillaguet, *J. Photochem. Photobiol. B* 162 (2016) 258–265.
- [32] S.P. Tseng, L.J. Teng, C.T. Chen, T.H. Lo, W.C. Hung, H.J. Chen, P.R. Hsueh, J.C. Tsai, *Lasers Surg. Med.* 41 (2009) 391–397.
- [33] V. Kussovski, V. Mantareva, I. Angelov, P. Orozova, D. WÄ¶hrle, G. Schnurpfeil, E. Borisova, L. Avramov, *FEMS Microbiol. Lett.* 294 (2009) 133–140.
- [34] N.S. Soukos, M. Wilson, T. Burns, P.M. Speight, *Lasers Surg. Med.* 18 (1996) 253–259.
- [35] B. Zeina, J. Greenman, D. Corry, W.M. Purcell, *Br. J. Dermatol.* 146 (2002) 568–573.
- [36] B. Zeina, J. Greenman, D. Corry, W.M. Purcell, *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 229–232.
- [37] A.K. Haylett, T.H. Ward, J.V. Moore, *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 337–341.
- [38] G.B. Kharkwal, S.K. Sharma, Y.-Y. Huang, T. Dai, M.R. Hamblin, *Lasers Surg. Med.* 43 (2011) 755–767.
- [39] S.S. Choi, H.K. Lee, H.S. Chae, *J. Photochem. Photobiol. B* 101 (2010) 206–209.
- [40] A.J. Lembo, R.A. Ganz, S. Sheth, D. Cave, C. Kelly, P. Levin, P.T. Kazlas, P.C. Baldwin, W.R. Lindmark, J.R. McGrath, M.R. Hamblin, *Lasers Surg. Med.* 41 (2009) 337–344.
- [41] C.H. Wilder-Smith, P. Wilder-Smith, P. Grosjean, H. van den Bergh, A. Woodtli, P. Monnier, G. Dorta, F. Meister, G. Wagnières, *Lasers Surg. Med.* 31 (2002) 18–22.
- [42] B.W. Sigusch, M. Engelbrecht, A. Völpel, A. Holletschke, W. Pfister, J. Schütze, *J. Periodontol.* 81 (2010) 975–981.
- [43] R.R. de Oliveira, H.O. Schwartz-Filho, A.B. Novaes, G.P. Garlet, R. Freitas de Souza, M. Taba, S.L. Scombatti de Souza, F.J. Ribeiro, *J. Periodontol.* 80 (2009) 98–105.
- [44] H. Gursoy, C. Ozcakir-Tomruk, J. Tanalp, S. Yılmaz, *Clin. Oral Investig.* 17 (2013) 1113–1125.
- [45] R. Ng, F. Singh, D.A. Papamanou, X. Song, C. Patel, C. Holewa, N. Patel, V. Klepac-Ceraj, C.R. Fontana, R. Kent, T.C. Pagonis, P.P. Stashenko, N.S. Soukos, *J. Endod.* 37 (2011) 217–222.
- [46] A.S. Garcez, S.C. Nuñez, M.R. Hamblin, H. Suzuki, M.S. Ribeiro, *J. Endod.* 36 (2010) 1463–1466.
- [47] R.E. Walton, M. Torabinejad, *Endodontics Principles and Practice*, Saunders Elsevier, St. Louis, 2008.
- [48] Z. Lim, J. Cheng, T. Lim, E. Teo, J. Wong, S. George, A. Kishen, *Aust. Dent. J.* 54 (2009) 108–114.
- [49] I.B. Jurič, V. Plečko, D.G. Pandurić, I. Anić, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11 (2014) 549–555.
- [50] J.F. Siqueira, A.G. Machado, R.M. Silveira, H.P. Lopes, M. de Uzeda, *Int. Endod. J.* 30 (1997) 279–282.
- [51] E. Berutti, R. Marini, A. Angeretti, *J. Endod.* 23 (1997) 725–727.
- [52] L.B. Peters, P.R. Wesselink, J.F. Buijs, A.J. Van Winkelhoff, *J. Endod.* 27 (2001) 76–81.
- [53] I. Portenier, T.M. Waltimo, M. Haapasalo, *Endod. Top.* 6 (2003) 135–159.
- [54] B. Athanassiadis, P. Abbott, L. Walsh, *Aust. Dent. J.* 52 (2007) S64–S82.
- [55] K. Fisher, C. Phillips, *Microbiology* 155 (2009) 1749–1757.

- [56] N. Dragicevic-Curic, D. Scheglmann, V. Albrecht, A. Fahr, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 70 (2009) 198–206.
- [57] A. Ossmann, S. Kranz, G. Andre, A. Völpel, V. Albrecht, A. Fahr, B.W. Sigusch, *Clin. Oral Investig.* 19 (2015) 373–384.
- [58] P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, T. Gośliński, J. Mielcarek, K. Konopka, N. Düzgüneş, *Drug Discov. Today* 18 (n.d.) 776–784.
- [59] D. Verma, A. Fahr, *J. Controlled Release* 97 (2004) 55–66.
- [60] I. Yoon, J.Z. Li, Y.K. Shim, *Clin. Endosc.* 46 (2013) 7.
- [61] J.-H. Park, Y.-H. Moon, I.-S. Bang, Y.-C. Kim, S.-A. Kim, S.-G. Ahn, J.-H. Yoon, *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 705–710.
- [62] A. Ormond, H.S. Freeman, *Materials* 6 (2013) 817–840.
- [63] M.O. Senge, J.C. Brandt, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 1240–1296.
- [64] B.H. Song, D.H. Lee, B.C. Kim, S.H. Ku, E.J. Park, I.H. Kwon, K.H. Kim, K.J. Kim, *J. Am. Acad. Dermatol.* 71 (2014) 764–771.
- [65] S. Ferro, F. Ricchelli, G. Mancini, G. Tognon, G. Jori, *J. Photochem. Photobiol. B* 83 (2006) 98–104.
- [66] A. Pfitzner, B. Sigusch, V. Albrecht, E. Glockmann, *J Periodontol* 75 (2004) 1343–9.
- [67] B. Sigusch, A. Pfitzner, V. Albrecht, E. Glockmann, *J Periodontol* 76 (2005).
- [68] S. Kranz, A. Guellmar, A. Volpel, B. Gitter, V. Albrecht, B. Sigusch, *Lasers Surg. Med.* 43 (2011) 241–8.
- [69] K. Yang, B. Gitter, R. Rüger, G.D. Wieland, M. Chen, X. Liu, V. Albrecht, A. Fahr, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1593.
- [70] K. Yang, B. Gitter, R. Rüger, V. Albrecht, G.D. Wieland, A. Fahr, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 548–556.
- [71] L. Kalhotka, Z. Hrdinova, R. Korinkova, J. Prichastalova, M. Konecna, L. Kubac, J. Lev, (2012).
- [72] L.B. Josefsen, R.W. Boyle, *Theranostics* 2 (2012) 916–966.
- [73] D. Mondal, S. Bera, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014) 033002.
- [74] L. Ryskova, V. Buchta, M. Karaskova, J. Rakusan, J. Cerny, R. Slezak, *Open Life Sci.* 8 (2013) 168–177.
- [75] Ü. İsci, M. Beyreis, N. Tortik, S.Z. Topal, M. Glueck, V. Ahsen, F. Dumoulin, T. Kiesslich, K. Plaetzer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 13 (2016) 40–47.
- [76] M. Merchat, J.D. Spikes, G. Bertoloni, G. Jori, *J. Photochem. Photobiol. B* 35 (1996) 149–157.
- [77] M.-R. Ke, J.M. Eastel, K.L.K. Ngai, Y.-Y. Cheung, P.K.S. Chan, M. Hui, D.K.P. Ng, P.-C. Lo, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 278–283.
- [78] J.P.F. Longo, S.C. Leal, A.R. Simioni, M. de Fátima Menezes Almeida-Santos, A.C. Tedesco, R.B. Azevedo, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 575–584.
- [79] Z. Chen, S. Zhou, J. Chen, L. Li, P. Hu, S. Chen, M. Huang, *J. Lumin.* 152 (2014) 103–107.
- [80] G.B. Rodrigues, F.L. Primo, A.C. Tedesco, G.U.L. Braga, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 440–447.
- [81] R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C.J. Childs, C.H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 27–42.
- [82] J.F. Lovell, T.W.B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2839–2857.
- [83] L. Sobotta, P. Fita, W. Szczolko, M. Wrotynski, M. Wierzchowski, T. Goslinski, J. Mielcarek, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 269 (2013) 9–16.
- [84] E. Fazio, J. Jaramillo-García, G. de la Torre, T. Torres, *Org. Lett.* 16 (2014) 4706–4709.
- [85] N. Nombona, E. Antunes, T. Nyokong, *Dyes Pigments* 86 (2010) 68–73.

- [86] L. Sobotta, M. Wierzchowski, M. Mierzwicki, Z. Gdaniec, J. Mielcarek, L. Persoons, T. Goslinski, J. Balzarini, *J. Inorg. Biochem.* 155 (2016) 76–81.
- [87] T. Goslinski, T. Osmalek, K. Konopka, M. Wierzchowski, P. Fita, J. Mielcarek, *Polyhedron* 30 (2011) 1538–1546.
- [88] M. Wierzchowski, L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Kruk, W. Jusiak, M. Yee, K. Konopka, N. Düzgüneş, E. Tykarska, M. Gdaniec, J. Mielcarek, T. Goslinski, *J. Inorg. Biochem.* 127 (2013) 62–72.
- [89] L.-J. Zhang, L.-X. Wang, W.-L. Zhang, Y.-J. Yan, Z.-L. Chen, *J. Innov. Opt. Health Sci.* 08 (2015) 1540003.
- [90] K. Aravindu, H.-J. Kim, M. Taniguchi, P.L. Dilbeck, J.R. Diers, D.F. Bocian, D. Holten, J.S. Lindsey, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013) 2089.
- [91] S. Hirohara, M. Obata, H. Alitomo, K. Sharyo, T. Ando, M. Tanihara, S. Yano, *J. Photochem. Photobiol. B* 97 (2009) 22–33.
- [92] A.M.G. Silva, A.C. Tomé, M.G.P.M.S. Neves, A.M.S. Silva, J.A.S. Cavaleiro, *Chem. Commun.* (1999) 1767–1768.
- [93] M.Q. Mesquita, J.C.J.M.D.S. Menezes, M.G.P.M.S. Neves, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, Â. Cunha, A. Almeida, S. Hackbarth, B. Röder, M.A.F. Faustino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 808–812.
- [94] J.-Y. Kim, S. Sahu, Y.-H. Yau, X. Wang, S.G. Shochat, P.H. Nielsen, M.S. Dueholm, D.E. Otzen, J. Lee, M.M.S. Delos Santos, J.K.H. Yam, N.-Y. Kang, S.-J. Park, H. Kwon, T. Seviour, L. Yang, M. Givskov, Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 402–407.
- [95] D.R. Rice, H. Gan, B.D. Smith, *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1271–1281.
- [96] L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek, *Dyes Pigments* 163 (2019) 337–355.
- [97] E.G. Sakellariou, A.G. Montalban, H.G. Meunier, R.B. Ostler, G. Rumbles, A.G. Barrett, B.M. Hoffman, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 136 (2000) 185–187.
- [98] S. Lee, A.J.P. White, D.J. Williams, A.G.M. Barrett, B.M. Hoffman, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 461–465.
- [99] E.R. Trivedi, B.J. Vesper, H. Weitman, B. Ehrenberg, A.G.M. Barrett, J.A. Radosevich, B.M. Hoffman, *Photochem. Photobiol.* 86 (2010) 410–417.
- [100] R. Bonnett, G. Martinez, *Tetrahedron* 57 (2001) 9513–9547.
- [101] C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstain, P. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières, *J. Photochem. Photobiol. B* 45 (1998) 170–178.
- [102] R. Bonnett, G. Martínez, *Org. Lett.* 4 (2002) 2013–2016.
- [103] A. Ogunsipe, M. Durmuş, D. Atilla, A.G. Gürek, V. Ahsen, T. Nyokong, *Synth. Met.* 158 (2008) 839–847.
- [104] A. Ogunsipe, D. Maree, T. Nyokong, *J. Mol. Struct.* 650 (2003) 131–140.
- [105] G.A. Kumar, J. Thomas, N.V. Unnikrishnan, V.P.N. Nampoore, C.P.G. Vallabhan, *J. Porphyr. Phthalocyanines JPP* 05 (2001) 456–459.
- [106] X.-F. Zhang, H.-J. Xu, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (1993) 3347.
- [107] L. Sobotta, M. Wierzchowski, M. Mierzwicki, Z. Gdaniec, J. Mielcarek, L. Persoons, T. Goslinski, J. Balzarini, *J. Inorg. Biochem.* 155 (2016) 76–81.
- [108] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, *CA. Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281.
- [109] R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C.J. Childs, C.H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 27–42.
- [110] A. Tillo, M. Stolarska, M. Kryjewski, L. Popena, L. Sobotta, S. Jurga, J. Mielcarek, T. Goslinski, *Dyes Pigments* 127 (2016) 110–115.

- [111] D.T. Mlynarczyk, S. Lijewski, M. Falkowski, J. Piskorz, W. Szczolko, L. Sobotta, M. Stolarska, L. Popena, S. Jurga, K. Konopka, N. Düzgüneş, J. Mielcarek, T. Goslinski, *ChemPlusChem* 81 (2016) 460–470.
- [112] M. Gierszewski, M. Falkowski, L. Sobotta, M. Stolarska, L. Popena, S. Lijewski, B. Wicher, G. Burdzinski, J. Karolczak, S. Jurga, M. Gdaniec, E. Tykarska, M. Sikorski, J. Mielcarek, T. Goslinski, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 307–308 (2015) 54–67.
- [113] J.F. Lovell, T.W.B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2839–2857.
- [114] M. Pineiro, M.M. Pereira, A. d’A R. Gonsalves, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 138 (2001) 147–157.
- [115] H. Mojzisoava, S. Bonneau, P. Maillard, K. Berg, D. Brault, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 778.
- [116] J. Tang, J.-J. Chen, J. Jing, J.-Z. Chen, H. Lv, Y. Yu, P. Xu, J.-L. Zhang, *Chem Sci* 5 (2014) 558–566.
- [117] J. Cheng, W. Li, G. Tan, Z. Wang, S. Li, Y. Jin, *Biomed. Pharmacother.* 87 (2017) 263–273.
- [118] D. Aicher, S. Gräfe, C.B.W. Stark, A. Wiehe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 5808–5811.
- [119] S.K. Pandey, A.L. Gryshuk, A. Graham, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, M.P. Dobhal, G. Zheng, Z. Ou, R. Zhan, K.M. Kadish, A. Oseroff, S. Ramaprasad, R.K. Pandey, *Tetrahedron* 59 (2003) 10059–10073.
- [120] P. Lakshmi, B. Kalpana, D. Prasanthi, *Syst. Rev. Pharm.* 4 (2013) 26.
- [121] E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, M. Eliaz, *J. Controlled Release* 65 (2000) 403–418.
- [122] Z. Apalla, E. Sotiriou, D. Panagiotidou, I. Lefaki, C. Goussi, D. Ioannides, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 27 (2011) 181–185.
- [123] S.R. de Annunzio, L.M. de Freitas, A.L. Blanco, M.M. da Costa, C.C. Carmona-Vargas, K.T. de Oliveira, C.R. Fontana, *J. Photochem. Photobiol. B* 178 (2018) 545–550.
- [124] V.R. Urbano, M.G. Maniero, M. Pérez-Moya, J.R. Guimarães, *J. Environ. Manage.* 195 (2017) 224–231.
- [125] R. Weltens, K. Deprez, L. Michiels, *Waste Manag.* 34 (2014) 2427–2433.
- [126] T.X.H. Le, T.V. Nguyen, Z. Amadou Yacouba, L. Zoungrana, F. Avril, D.L. Nguyen, E. Petit, J. Mendret, V. Bonniol, M. Bechelany, S. Lacour, G. Lesage, M. Cretin, *Chemosphere* 172 (2017) 1–9.
- [127] E.J. Calabrese, *Homeopathy* 104 (2015) 69–82.
- [128] H.-M. Chiang, J.-J. Yin, Q. Xia, Y. Zhao, P.P. Fu, K.-C. Wen, H. Yu, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 211 (2010) 123–128.
- [129] R.R.A. Hayek, N.S. Araújo, M.A. Gioso, J. Ferreira, C.A. Baptista-Sobrinho, A.M. Yamada, M.S. Ribeiro, *J. Periodontol.* 76 (2005) 1275–1281.
- [130] B. Salehi, A.P. Mishra, I. Shukla, M. Sharifi-Rad, M. del M. Contreras, A. Segura-Carretero, H. Fathi, N.N. Nasrabadi, F. Kobarfard, J. Sharifi-Rad, *Phytother. Res.* 32 (2018) 1688–1706.
- [131] M. Sharifi-Rad, E.M. Varoni, M. Iriti, M. Martorell, W.N. Setzer, M. del Mar Contreras, B. Salehi, A. Soltani-Nejad, S. Rajabi, M. Tajbakhsh, J. Sharifi-Rad, *Phytother. Res.* 32 (2018) 1675–1687.
- [132] M.Y. Memar, P. Raei, N. Alizadeh, M. Akbari Aghdam, H.S. Kafil, *Rev. Med. Microbiol.* 28 (2017) 63–68.
- [133] S. Maisanaba, A.I. Prieto, M. Puerto, D. Gutiérrez-Praena, E. Demir, R. Marcos, A.M. Cameán, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 784–785 (2015) 37–44.

- [134] S.S. Swain, S.K. Paidesetty, R.N. Padhy, *Comput. Methods Programs Biomed.* 140 (2017) 185–194.
- [135] L. Espina, D. Berdejo, P. Alfonso, D. García-Gonzalo, R. Pagán, *Food Control* 82 (2017) 256–265.
- [136] A.F. Pereira Batista, A. Rodrigues dos Santos, A. Fiori da Silva, D.A. Coelho Trevisan, L.H. Ribeiro, P.A. Zanetti Campanerut-Sá, B. Alves de Abreu Filho, M.M. Junior, J.M. Graton Mikcha, *LWT* 100 (2019) 92–98.
- [137] M. Llana-Ruiz-Cabello, D. Gutiérrez-Praena, S. Pichardo, F.J. Moreno, J.M. Bermúdez, S. Aucejo, A.M. Cameán, *Food Chem. Toxicol.* 64 (2014) 281–290.
- [138] M. Llana-Ruiz-Cabello, S. Maisanaba, M. Puerto, A.I. Prieto, S. Pichardo, R. Moyano, J.A. González-Pérez, A.M. Cameán, *Food Chem. Toxicol.* 98 (2016) 240–250.
- [139] Ü. Ündeğer, A. Başaran, G.H. Degen, N. Başaran, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 2037–2043.
- [140] L.M. Dati, H. Ulrich, C.C. Real, Z.P. Feng, H.S. Sun, L.R. Britto, *Neuroscience* 356 (2017) 176–181.
- [141] J. Hussein, M. El-Banna, K.F. Mahmoud, S. Morsy, Y. Abdel Latif, D. Medhat, E. Refaat, A.R. Farrag, S.M. El-Daly, *Biomed. Pharmacother.* 90 (2017) 880–887.
- [142] J. Abraham, in: A. Brouder, C. Tietje (Eds.), *Handb. Transnatl. Econ. Gov. Regimes*, Brill, 2009, pp. 1041–1054.
- [143] A. Derycke, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 17–30.
- [144] J.F. Lovell, P.-C. Lo, *Theranostics* 2 (2012) 815–816.

Lubiz Sobotta

Poznań dnia, 20.03.2019