

dr n. farm. Andrzej Marcin Bugaj

dr n. farm. Andrzej M. Bugaj
specjalista farmacji klinicznej
14025921

A. M. Bugaj

WYBRANE ASPEKTY FOTOCHEMIOTERAPII DOŚWIADCZALNEJ

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIONY CENTRALNEJ KOMISJI DO SPRAW STOPNI I TYTUŁÓW
W CELU UZYSKANIA STOPNIA NAUKOWEGO
DOKTORA HABILITOWANEGO NAUK MEDYCZNYCH**

Poznań, 2018

1. Imię i Nazwisko: Andrzej Marcin Bugaj

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- Dyplom magistra farmacji z wyróżnieniem – uzyskany w dniu 21 października 1988 na podstawie pracy magisterskiej „Fotochemiczne i fotofizyczne właściwości tiokumaryny w roztworach niewodnych”, wykonanej w Zakładzie Fotochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotor: Prof. dr Jan Wojtczak.
- Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych – uzyskany w dniu 21 listopada 1994 na podstawie rozprawy doktorskiej „Kinetyka i mechanizm fotodegradacji azatiopryny”, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Barbara Marciniak.
- Dyplom specjalisty II stopnia z zakresu farmacji klinicznej, uzyskany w dniu 24 listopada 2002, na podstawie egzaminu złożonego w ramach Studium Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Opiekun naukowy specjalizacji: dr n. farm. Marek Chuchracki.
- Dyplom specjalisty I stopnia z zakresu analityki farmaceutycznej, uzyskany w dniu 21 listopada 1993, na podstawie egzaminu złożonego w ramach Studium Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Opiekun naukowy specjalizacji: Prof. dr hab. n. farm. Barbara Marciniak.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 1) Poznań, Wyższa Szkoła Zdrowia, Urody i Edukacji:
1.09.2011 do chwili obecnej
Wykładowca, Wydział Kosmetologii, studia II stopnia.
- 2) Warszawa, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego
Poznań, Studium Kształcenia Podyplomowego UMP
2010-2014
Opiekun naukowy Specjalizacji w Dziedzinie Farmacji Klinicznej dla absolwentów Wydziałów Farmaceutycznych Akademii i Uniwersytetów Medycznych z całej Polski.
- 3) Nantes (Francja), Laboratoire de Photobiologie des Cancers, Département Laser,
Centre Hospitalier Universitaire „Nord Laënnec”, Université de Nantes:
1.01-31.05.2006
„Maître de conférence invité”.

- 4) Poznań, Uniwersytet Medyczny (dawniej Akademia Medyczna)
im. Karola Marcinkowskiego:
1.02.1996-30.09.2005
Adiunkt, Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji,
Wydział Farmaceutyczny.
- 1.01.1995-31.01.1996
Asystent, Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji,
Wydział Farmaceutyczny.
- 1.02.-31.12.1995
Asystent, Zakład Informatyki i Statystyki Medycznej, Wydział Lekarski II.
- 1.10.1989-31.12.1993
Studia Doktoranckie, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej,
Wydział Farmaceutyczny.
- 1.10.1988-30.09.1989
Asystent, Pracownia Matematyki, Katedra i Zakład Toksykologii,
Wydział Farmaceutyczny.

4. Wskazanie osiągnięcia będącego podstawą wniosku habilitacyjnego

a) tytuł osiągnięcia naukowego będącego podstawę wniosku habilitacyjnego:

Wybrane aspekty fotochemioterapii doświadczalnej

b) Publikacje stanowiące osiągnięcie będące podstawą wniosku habilitacyjnego:

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą wniosku habilitacyjnego, jest spójny tematycznie cykl czterech anglojęzycznych publikacji, opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Dla każdej pracy podano współczynnik oddziaływania czasopisma (Impact Factor) oraz punktację MNiSW.

- 1) A.M. Bugaj. Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10: 1097–1109. **IF = 2,584; MNiSW = 27,0.**
Wkład własny: koncepcja pracy, zaplanowanie badań, zbieranie piśmiennictwa, wykonanie badań, analiza danych, przygotowanie manuskryptu, korespondencja z edytorem, korekta pracy.
Mój udział procentowy wynosi 100%.
- 2) A. Kawczyk-Krupka, A.M. Bugaj, W. Latos, K. Zaremba, K. Wawrzyniec, M. Kucharzewski, A. Sieroń. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment – the state of the art in preclinical research. *Photodiagn Photodyn Ther* 2016; 13: 158–174. **IF = 2,219; MNiSW = 25,0.**
Wkład własny: współudział w zbieraniu piśmiennictwa, wykonaniu badań, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, korekcie pracy.
Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- 3) A. Kawczyk-Krupka, A.M. Bugaj, W. Latos, K. Wawrzyniec, P. Oleś, A. Mertas, Z. Czuba, W. Król, K. Sieroń-Stołtny, A. Sieroń. ALA-mediated photodynamic effect on apoptosis induction and secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and of monocyte chemotactic protein (MCP-1) by colon cancer cells in normoxia and in hypoxia-like conditions in vitro. *Photodiagn Photodyn Ther* 2015; 12: 27-35. **IF = 2,014; MNiSW=20,0.**

Wkład własny: współudział w interpretacji wyników, zbieraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- 4) A. Bugaj, M. Kwitniewski, V. Iani, A. Juzeniene, P. Juzenas, L.W. Ma, J. Moan. Photodynamic therapy with di-L-arginine protoporphyrinate on WiDr human colon adenocarcinoma xenografts in athymic nude mice. *Photodiagn Photodyn Ther* 2007; 4: 237-241. **MNiSW = 3,0.**

Wkład własny: koncepcja pracy, zaplanowanie badań, zbieranie piśmiennictwa, współudział w wykonaniu badań i analizie danych, analiza statystyczna, przygotowanie manuskryptu, korespondencja z edytorem, korekta pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 90%

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wstęp.

Światło jest istotne dla życia wielu organizmów roślinnych i zwierzęcych. Wiele procesów życiowych, począwszy od wegetacji roślin poprzez procesy widzenia i opalania skóry po rytm okołodobowy jest uzależniona od działania światła [1-3]. Lecznicze działanie światła na organizm człowieka znane było już w starożytnych Indiach, Chinach i Egipcie, a grecki historyk Herodot (ok.484-ok.426 p.n.e.) jako pierwszy opisał pozytywny wpływ promieni słonecznych na wytrzymałość kości [4-8]. Na początku XIX w. polski lekarz, chemik i biolog Jędrzej Śniadecki zwrócił uwagę na korzystne działanie światła słonecznego w leczeniu krzywicy [5, 6], zaś na początku wieku XX duński uczony Niels Finsen otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za prace nad wykorzystaniem fototerapii w leczeniu gruźlicy skóry [5, 6]. Z drugiej strony, od dawna znane były choroby indukowane działaniem światła [7-11], takie jak fotostarzenie [12], fotodermatozy [13, 14], a także nowotwory skóry [7, 11, 15]. Również jednym z objawów porfirii skórnych jest nadwrażliwość na światło [16-21].

Wzrost świadomości związku pomiędzy działaniem światła a zdrowiem sprawia, że procesy te budzą coraz większe zainteresowanie przedstawicieli nauk medycznych. Jednym z kierunków badań w tym zakresie jest wpływ oddziaływań promieni elektromagnetycznych z cząsteczkami substancji chemicznych na żywy organizm. Wpływ ten może być zarówno negatywny, czego wyrazem mogą być niepożądane działania fototoksyczne i fotoalergiczne licznych substancji egzo- i endogennych [22-25], jak i pozytywny, polegający na swego rodzaju „kontrolowanym fotouczulaniu” za pomocą substancji fotouczulających (fotosensybilizatorów), których cząsteczki jednocześnie wykazują zwiększone powinowactwo do tkanek objętych stanem chorobowym. Takie „kontrolowane fotouczulanie” stanowi podstawę intensywnie rozwijającej się dziedziny leczenia, jaką jest fotochemioterapia [4, 26, 27].

Korzenie fotochemioterapii również sięgają starożytnych Indii i Egiptu, gdzie naświetlanie promieniami słońca w połączeniu z podawaniem preparatów z roślin zawierających substancje uczulające komórki skóry na działanie promieni UV stosowano w leczeniu bielactwa [4-6]. Istotą tej metody leczniczej jest specyficzne działanie wzbudzonego światłem cząsteczek substancji uczulających (fotosensybilizatorów) na ściśle określone struktury komórkowe lub procesy biologiczne, które prowadzi do zahamowania lub spowolnienia rozwoju choroby [4, 27].

W piśmiennictwie utrwalił się podział fotochemioterapii na terapię fotodynamiczną (*photodynamic therapy* – PDT), związaną z wytwarzaniem w tkankach objętych stanem chorobowym reaktywnych form tlenu (RFT), w wyniku oddziaływań fotofizycznych między światłem widzialnym a fotosensybilizatorem [27-29], oraz na terapię PUVA (*Psoralen + UV-A*), połączoną z reakcjami fotoaddycji pochodnych furanokumaryny (psoralenów) do biomolekuł komórkowych pod wpływem promieni UV-A ($\lambda=320-400\text{nm}$) [30, 31]. Podział ten, stanowiący odbicie dawniejszej (lata 70-te XX w.) wiedzy na temat mechanizmów fotochemioterapii, opiera się na odróżnieniu metody opartej na procesach fotofizycznych zależnych od tlenu (PDT) od metody wykorzystującej reakcje fotochemiczne od tlenu niezależne (PUVA) [32]. W istocie jednak furanokumaryny poddane działaniu promieni UV-A mogą również indukować powstawanie RFT [30, 33, 34], zaś barwniki stosowane w PDT mogą także ulegać niezależnym od tlenu reakcjom fotochemicznym [35-37] oraz wykazywać działanie fotouczulające nie tylko pod wpływem światła widzialnego, lecz także promieniowania UV lub IR [38].

Istotną cechą odróżniającą metodę PUVA od PDT jest przyłączanie cząsteczek pochodnych furanokumaryny do cząsteczki DNA jądra komórkowego, co może prowadzić do działania mutagennego i kancerogennego, tym samym ograniczając stosowanie metody PUVA w leczeniu chorób nowotworowych [31], podczas gdy w przypadku PDT cel działania fotosensybilizatorów stanowią przede wszystkim mitochondria [39, 40], jakkolwiek niektóre z tych barwników mogą również oddziaływać na jądra komórkowe [41, 42]. Poza tym metoda PUVA pozbawiona jest selektywności wobec tkanek objętych procesem chorobotwórczym, obserwowanej w przypadku PDT [32]. Dlatego PDT znalazła zastosowanie w leczeniu wielu chorób nowotworowych jak również nienowotworowych, takich jak endometrioza, rogowacenie słoneczne czy starcze zwyrodnienie plamki żółtej. Od ponad 40 lat praktykowane jest również stosowanie PDT w leczeniu zakażeń bakteryjnych i grzybiczych [43].

Już od powstania metody PDT istotny problem stanowił dobór odpowiedniego fotosensybilizatora [6, 44]. Idealny fotosensybilizator powinien [6, 45]:

- 1) być substancją jednorodną chemicznie, łatwo odtwarzalną na drodze syntezy;
- 2) pochłaniać promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widma warunkującym działanie terapeutyczne;
- 3) być wydajnym aktywatorem tlenu singletowego i/lub wolnych rodników;
- 4) dobrze rozpuszczać się w płynach ustrojowych;
- 5) selektywnie gromadzić się w tkankach objętych procesem chorobowym, a po zakończeniu działania szybko wydaląć się z ustroju.

Zarówno sam fotosensybilizator, jak i produkty jego metabolizmu nie powinny w trakcie leczenia ani też po jego zakończeniu wywoływać odczynów toksycznych, fototoksycznych ani też istotnych klinicznie działań niepożądanych, takich jak zakrzepy,

drgawki, zawały serca, a zwłaszcza mutageneza i kancerogeneza, gdyż byłoby to równoznaczne z indukowaniem nowych nowotworów w trakcie leczenia innych [46]. Fotosensybilizator powinien być również tani i łatwo dostępny, z możliwością stosowania w warunkach ambulatoryjnych, co znacznie obniża koszty leczenia. Stosowanie sensybilizatora powinno podnosić jakość życia pacjenta [46]. Powyższe wymagania są bardzo wysokie, trudno zatem znaleźć substancję spełniającą wszystkie wyżej wymienione kryteria, co nieuchronnie skłania do rozwiązań kompromisowych.

Najstarszą grupą fotosensybilizatorów stosowanych w PDT są porfiryny, związki szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, uczestniczące w kluczowych dla życia procesach biologicznych, takich jak fotosynteza czy transport tlenu z krwią [47-49]. Wśród istotnych zalet porfiryn jako fotosensybilizatorów PDT należy wymienić ich stabilność chemiczną, niską toksyczność oraz zdolność do intensywnego pochłaniania światła widzialnego i wysoką wydajność tworzenia tlenu singletowego [50].

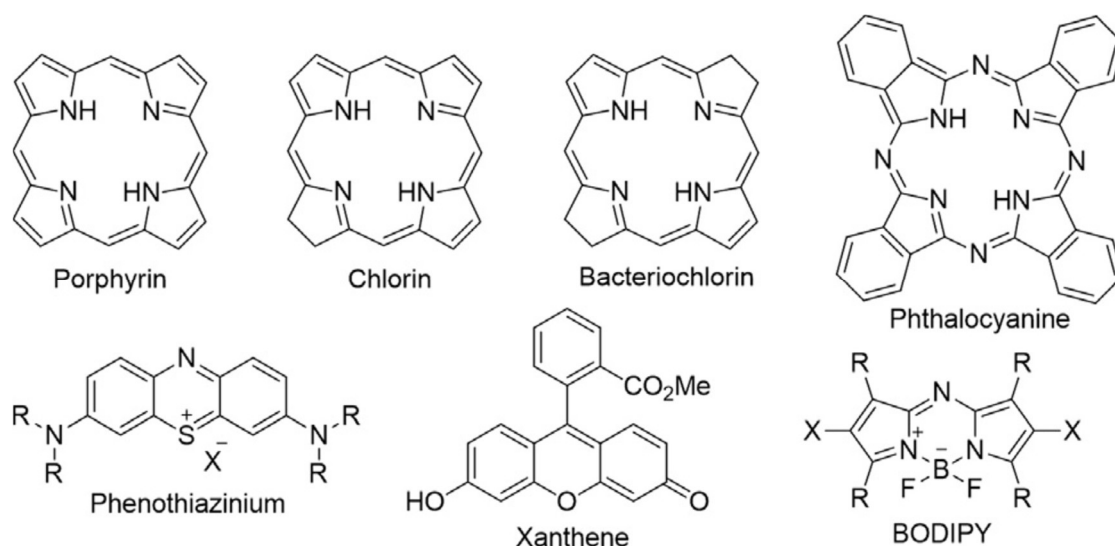
Lipofilowa natura cząsteczek związków porfirynowych sprzyja ich powinowactwu do błon komórkowych [51, 52], z drugiej jednak strony utrudnia przenikanie tych cząsteczek do hydrofilowego środowiska wewnątrzkomórkowego, gdzie znajdują się organelle stanowiące cel ich działania [53]. Ponadto lipofilowość związków porfirynowych utrudnia ich rozpuszczanie w wodzie i transport w ustroju wraz z krwią [28].

Cząsteczki związków porfirynowych intensywnie pochłaniają światło w zakresie widzialnym ($\lambda=400-750\text{nm}$), co umożliwia ich wzbudzenie za pomocą światła widzialnego, penetrującego tkanki głębiej niż promienie UV ($\lambda=100-400\text{nm}$), a jednocześnie wykazującego znacznie słabsze działanie kancerogenne [54]. W widmie absorpcji tych związków wyróżnia się pasmo Soreta, którego maksimum zawiera się w przedziale 405-409 nm i pasma Q, których maksima leżą przy długościach fal 505–510, 540–545, 580–584 oraz 630–635 nm [55-57]. Ze wzrostem hydrofobowości związków porfirynowych ich pasma absorpcji w roztworach ulegają przesunięciu w kierunku fal dłuższych [58]. Wzbudzenie pasma Soreta za pomocą światła niebieskiego pozwala na bardziej wydajne generowanie tlenu singletowego niż wzbudzenie światłem czerwonym pasm Q, których intensywność jest 10-20 razy mniejsza, jednakże z uwagi na ograniczoną penetrację tkanek przez światło niebieskie (do 1-2 mm) metodą tą można leczyć tylko płytkie zmiany chorobowe [59], podczas gdy za pomocą światła czerwonego, penetrującego tkanki na głębokość 4-5 mm, możliwe jest leczenie zmian położonych znacznie głębiej [60-63]. Porfiryny wykazują działanie fotodynamiczne także po wzbudzeniu promieniami UV-A [39], co może prowadzić do niepożądanych odczynów fototoksycznych i fotoalergicznym. Wydajność tworzenia tlenu singletowego przez porfiryny w roztworach, micelach i liposomach zawiera się w przedziale 0,5-0,9 [64-68]. Agregacja cząsteczek fotosensybilizatorów powoduje spadek tej wydajności do ok. 0,3 [67]. Jednakże naświetlanie porfiryn promieniami UV-A prowadzi także do wytwarzania nadtlenu wodoru (H_2O_2), przy czym wydajność powstawania tego związku maleje w szeregu: uroporfirynogen > koproporfirynogen > PPIX [39, 69, 70].

Wśród sensybilizatorów porfirynowych Photofrin[®] (sól sodowa porfimeru) jako pierwszy uzyskał atest Food and Drug Administration w USA. Jest on obecnie dopuszczony do stosowania w wielu krajach, m. in. w Japonii, USA, Kanadzie, Australii i Unii Europejskiej. W Polsce lek ten został dopuszczony do użytku w lecznictwie zamkniętym [28, 71].

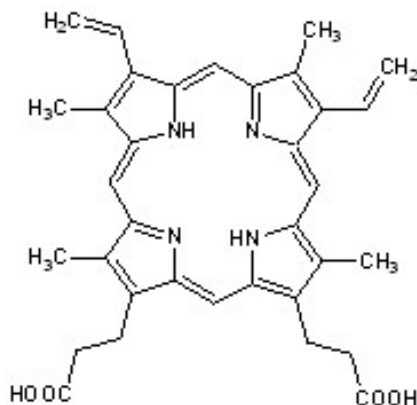
Jako fotosensybilizator Photofrin[®] obarczony jest jednak licznymi wadami. Lek ten stanowi niejednorodną, trudno odtwarzalną chemicznie mieszaninę pochodnych porfiry, której skład i właściwości mogą się zmieniać w trakcie przechowywania, wskutek czego musi on być przechowywany w specjalnych warunkach (w temperaturze -21°C). Ponadto Photofrin[®] gromadzi się w znacznych ilościach i przez dłuższy czas w komórkach skóry, stwarzając ryzyko przebarwień i odczynów alergicznych, z ustroju zaś wydala się wolno (jego czas połowicznej eliminacji z organizmu człowieka wynosi 21,5 dnia), co stanowi ryzyko późnych odczynów fototoksycznych oraz fotoalergiczych [28, 39, 44, 72]. Stosunkowo mała długość fali promieniowania wzbudzającego oraz niewielki współczynnik absorpcji molowej w maksimum absorpcji ($\epsilon = 1,17 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) również ograniczają skuteczność Photofrinu, zwłaszcza w przypadku guzów głębiej położonych [73]. Sytuacja taka skłoniła do podjęcia badań nad usunięciem niedogodności stwarzanych przez Photofrin[®] podczas stosowania go w metodzie PDT, a tym samym nad zwiększeniem skuteczności tej metody. Jest to związane również z poszukiwaniem nowych sensybilizatorów, o korzystniejszych od Photofrinu[®] właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych [73-75]. W ciągu ostatnich dziesięcioleci otrzymano i przebadano w tym zakresie wiele związków chemicznych, takich jak metaloporfiry (Lutrin[®] i Lutex[®]), prekursory protoporfiryny IX (Metvix[®], Hexvix[®], Levulan[®]), porficyny, chloryny (Foscan[®]), bakteriochloryny (Tookad[®]), purpuryny (Purlytin[®]), ftalocyjaniny (Pc4), fenotiazyny (błękit metylenowy i toluidynowy), cyjaniny (merocyjanina 540), dipirometyny (BODIPY), hiperycyny i ksanteny (róz bengalski) [73].

Struktury chemiczne wybranych fotosensybilizatorów o działaniu przeciwnowotworowym przedstawia Rys. 1.



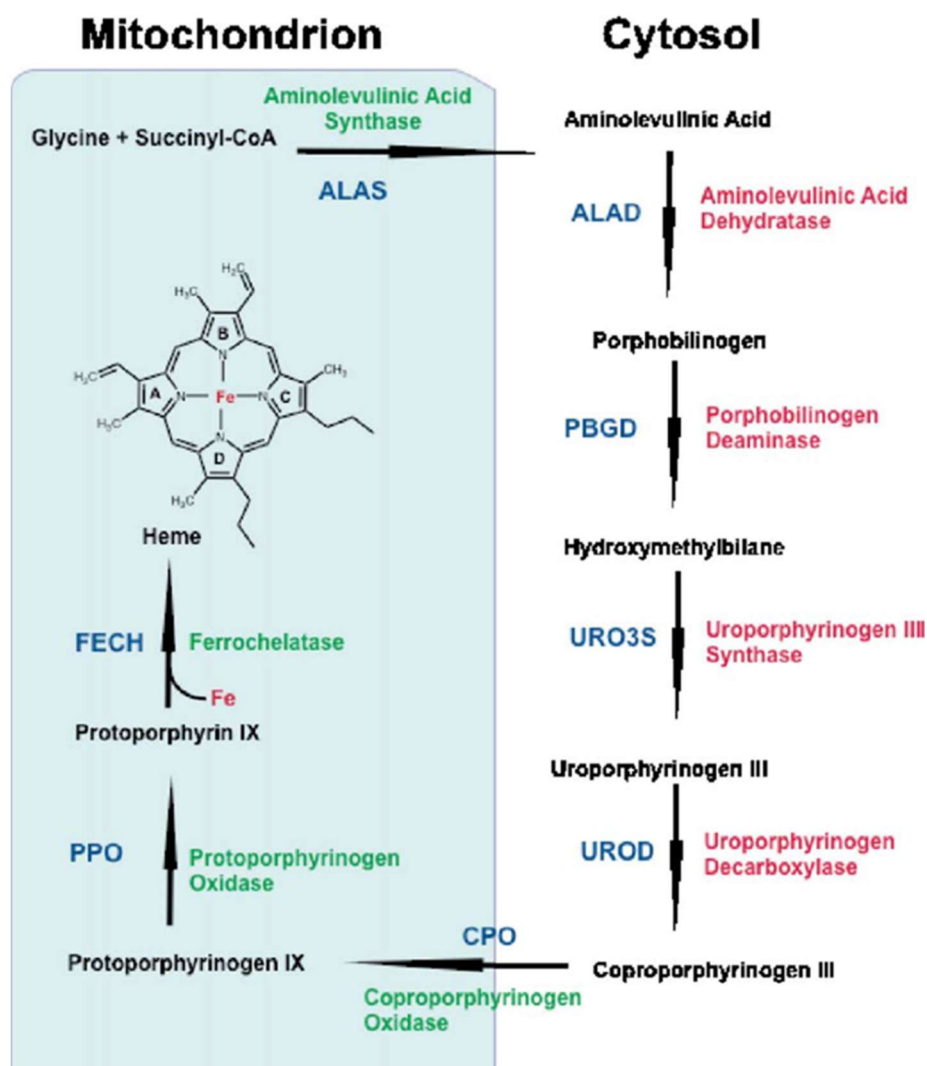
Rys. 1. Struktury chemiczne wybranych fotosensybilizatorów o działaniu przeciwnowotworowym [73].

Wśród naturalnych pochodnych porfiryny stosowanych jako fotosensybilizatory w PDT szczególne miejsce zajmuje protoporfiryna IX (PPIX), będąca substancją macierzystą dla wielu związków pełniących w organizmach zwierzęcych istotne role fizjologiczne [76-78].



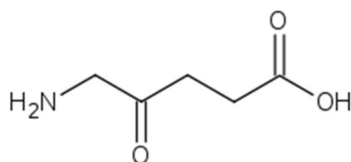
Rys. 2. Protoporfiryna IX – struktura chemiczna [79].

Protoporfiryna IX (Rys. 2) jest prekursorem biologicznie ważnych grup prostetycznych, stanowiącymi składniki hemoglobiny i mioglobiny, białek odpowiedzialnych za transport i dystrybucję tlenu w organizmie, jak również enzymów z nadrodziny cytochromu P₄₅₀, (CYP) uczestniczących m. in. w procesach detoksykacji organizmu oraz biosyntezy hormonów steroidowych i cytokin regulujących ciśnienie krwi [80, 81]. Protoporfiryna IX selektywnie kumuluje się w niektórych tkankach nowotworowych, takich jak nowotwory jelita grubego, gdzie jej stężenie osiąga wartości sześciokrotnie wyższe niż w zdrowych komórkach tego narządu. Gromadzi się ona głównie w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, hamując rozwój angiogenezy guzów, oraz w śluzówce narządów wewnętrznych, omijając tkankę mięśniową, co zmniejsza ryzyko wystąpienia perforacji. Istotnym czynnikiem wpływającym na kumulację PPIX w komórkach nowotworowych jest pH środowiska. Powinowactwo PPIX do błon komórkowych maleje ze wzrostem liczby zdysocjowanych grup karboksylowych. W środowisku o pH fizjologicznym obie grupy -COOH w cząsteczce PPIX są zdysocjowane, jednak w środowisku o pH $\approx 5,2$, charakterystycznym dla przestrzeni zewnątrzkomórkowej tkanki nowotworowej, dysocjacja ulega cofnięciu, co sprzyja przenikaniu cząsteczek PPIX przez błony komórkowe. Z kolei wewnątrz komórek nowotworowych, gdzie pH wynosi zazwyczaj ok. 6,9, PPIX występuje głównie w postaci mono- i dianionu, w wyniku czego powinowactwo jej cząsteczek do błon komórkowych zmniejsza się, utrudniając tym cząsteczkom wydostanie się na zewnątrz komórki [51, 52].



Rys. 3. Szlak biosyntezy hemu. Kolorem zielonym oznaczono enzymy mitochondrialne, kolorem czerwonym – enzymy cytoplazmatyczne [82].

W komórkach zwierzęcych PPIX powstaje w przedostatnim etapie wewnątrzkomórkowej biosyntezy hemu (Rys. 3), poprzez szereg przemian biochemicznych, które można podzielić na następujące etapy: synteza pierścieni pirolowych, kondensacja tych pierścieni do układu tetrapiolowego, modyfikacja łańcuchów bocznych z wytworzeniem protoporfirynogenu IX, utlenienie go do PPIX oraz włączenie do pierścienia PPIX kationu Fe^{2+} prowadzące ostatecznie do powstania hemu [83-85]. Zaburzenia metabolizmu hemu mogą prowadzić do rozwoju chorób zwanych porfiriami, których objawem w większości przypadków jest występowanie odczynów fototoksycznych wskutek nadmiernego kumulowania związków porfiryńowych w tkance skórnej; objawy takie występują w większości rodzajów porfirii, z wyjątkiem porfirii ostrej przerywanej oraz porfirii wywołanej niedoborem dehydratazy kwasu 5-aminolewulinowego [16-20, 82]. β -karoten jako zmiatacz tlenu singletowego łagodzi objawy porfirii erytropoetycznej (*erythropoetic porphyria*, EP), której rozwój związany jest z fotosensybilizującym działaniem PPIX, nie wykazuje natomiast działania łagodzącego wobec objawów późnej porfirii skórnej, (*porphyria cutanea tarda*, PCT), związanej z wytwarzaniem nadtlenu wodoru pod wpływem fototoksycznego działania uroporfiryny [69, 70].

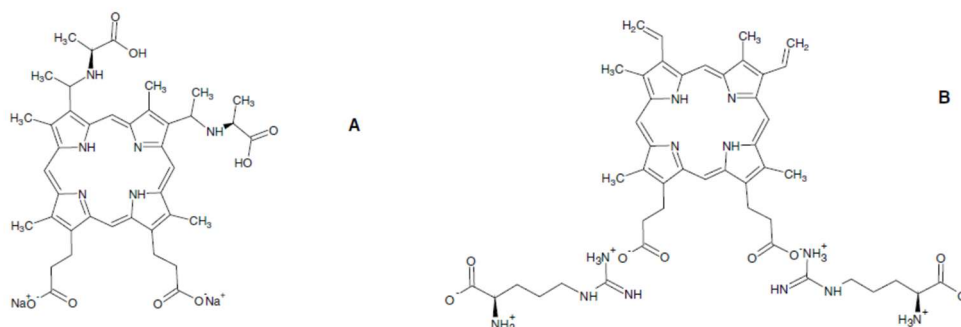


Rys. 4. Kwas 5-aminolewulinowy (ALA) – struktura chemiczna [85].

Procesem inicjującym biosyntezę PPIX jest synteza kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) (Rys. 4). Podobny efekt można osiągnąć wprowadzając do organizmu egzogeny ALA i w ten sposób indukując powstawanie PPIX *in situ*, co pozwala na ominięcie trudności występujących często przy sporządzaniu i dawkowaniu wodnych roztworów pochodnych porfiryny, które zazwyczaj trudno rozpuszczają się w wodzie [86]. Protoporfiryna IX indukowana za pomocą ALA występuje w komórkach głównie w postaci monomeru, nie ulegając agregacji [87], dzięki czemu łatwo kumuluje się w mitochondriach [53], wykazuje dużą wydajność tworzenia tlenu singletowego [88] i ulega szybkiej eliminacji z ustroju [89]. Połowiczny czas eliminacji PPIX po podaniu ALA wynosi 8 h, a po upływie 48 h nie stwierdza się obecności tej substancji w ustroju, co zmniejsza ryzyko wystąpienia późnych odczynów fototoksycznych lub fotoalergiczych [89]. Zarówno miejscowe jak i ogólnoustrojowe stosowanie ALA lub jego estrów jest nieskomplikowane i nie wywołuje szczególnie uciążliwych objawów niepożądanych [60, 74, 89]. Wykorzystanie ALA jako prekursora PPIX stało się podstawą ALA-PDT, znajdującej obecnie szerokie zastosowanie kliniczne [89, 90].

Sugeruje się, że skuteczny farmakologicznie fotosensybilizator powinien wykazywać zarówno właściwości hydrofobowe, co ułatwiałoby przenikanie tych fotosensybilizatorów przez domeny lipidowe błon komórkowych, jak i hydrofilowe, co umożliwiałoby podawanie tych leków w roztworach wodnych, ułatwiał transport z krwią oraz zwiększało powinowactwo do receptorów białkowych na powierzchni komórek docelowych [72, 73, 91]. Wiązanie cząsteczek fotosensybilizatorów z receptorami błon komórkowych może znacząco zwiększać powinowactwo tych fotosensybilizatorów do tkanek objętych procesami chorobowymi [91]. Poszukiwanie nowych sensybilizatorów powinno zatem zmierzać w kierunku otrzymywania związków amfifilowych.

Wychodząc z tego założenia, grupa badaczy z Wydziału Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie zsyntetyzowała interesującą grupę sensybilizatorów będących aminokwasowymi pochodnymi PPIX [28, 44, 92, 93] (Rys. 5).



Rys. 5. Aminokwasowe pochodne protoporfiryny IX A- podstawione cząsteczkami aminokwasów w pierścieniu porfiryńowym, B – z przyłączonymi cząsteczkami aminokwasów w łańcuchach bocznych [116, 117].

Podstawienie grup winylowych w pozycji 2 i 4 pierścienia porfiryнового cząsteczkami endogennych aminokwasów (Rys. 5A) powoduje zwiększenie powinowactwa cząsteczek sensybilizatora do receptorów komórek nowotworowych, zaś przyłączenie cząsteczek argininy do grup karboksylowych w łańcuchach bocznych cząsteczki PPIX (Rys. 5B) zwiększa jej hydrofilowość, a tym samym rozpuszczalność w wodzie [92, 93]. Przeprowadzone badania wskazują jednak na mniejsze powinowactwo pochodnych aminokwasowych do izolowanych obwodowych receptorów benzodiazepinowych w porównaniu z macierzystą PPIX, zarówno nienaświetlonych [94, 95], jak i po naświetleniu światłem niebieskim o $\lambda = 390\text{nm}$ [96]. Z drugiej strony, pochodne zawierające grupy winylowe podstawione resztami aminokwasowymi po naświetleniu światłem czerwonym o $\lambda = 634\text{nm}$ silniej pobudzają układ odpornościowy u myszy niż pochodne niepodstawione [97]. Aminokwasowe pochodne protoporfiryny IX wykazują aktywność fotodynamiczną wobec komórek glejaka, nerwiaka zarodkowego, raka piersi i jelit [98-100].

Zgodnie z danymi GLOBOCAN 2018, rak jelita grubego (*colorectal cancer*, CRC) jest trzecim pod względem częstości występowania rodzajem nowotworów u mężczyzn (10,9% wszystkich przypadków) i drugim u kobiet (odpowiednio 9,5%) w skali światowej [101]. Globalnie stanowi on również przyczynę 9,2% wszystkich przypadków śmierci spowodowanych chorobami nowotworowymi, co wśród nowotworów stawia go na drugim miejscu [101]. Jak wynika z danych z roku 2011, u około 20-25% chorych na raka jelita grubego stwierdzano przerzuty podczas diagnozy nowotworu, zaś u 50-60% pacjentów występowały przerzuty w dalszych etapach rozwoju choroby [102]. Wprowadzenie nowych leków i metod leczenia uczyniło leczenie raka jelita grubego bardziej skutecznym [103-105], jednakże wzrost oporności komórek nowotworowych względem chemioterapeutyków i leków biologicznych, jak również niespecyficzna toksyczność tych leków do komórek zdrowych, pociągnęły za sobą konieczność poszukiwań nowych metod leczenia CRC [106-108]. Jedną z tych metod jest fotochemioterapia. Do zalet tej metody w porównaniu z tradycyjną chemioterapią należą większa selektywność wobec tkanek nowotworowych, brak oporności krzyżowej, co umożliwia stosowanie tej metody w przypadku nawracających nowotworów, szeroki zakres terapeutycznych dawek światła i fotosensybilizatorów, pozwalający na wielokrotne stosowanie tej metody wobec tego samego nowotworu, oraz bardzo dobry efekt kosmetyczny [109-112].

Większość publikacji dotyczących badań nad PDT skupia się na syntezie nowych fotosensybilizatorów i ich bezpośrednim działaniu („działa - nie działa”) wobec komórek nowotworowych, natomiast zagadnienia dostępności biologicznej tych substancji oraz ich przemian na poziomie molekularnym i komórkowym omawiane są w tych pracach w mniejszym stopniu. Wskazana jest również konieczność zmiany paradygmatu PDT, który powinien uwzględniać heterogeniczny charakter nowotworu oraz jego dynamiczną zmienność wynikającą z oddziaływania z tkankami otaczającymi [43]. Zagadnienia te stanowią w znacznej mierze przedmiot przedstawionego cyklu publikacji.

Cel badawczy.

Celem badawczym przedstawionego cyklu habilitacyjnego było wyznaczenie wpływu wybranych parametrów molekularnych i farmakologicznych fotosensybilizatorów na wyniki doświadczalnej fotochemioterapii, a w szczególności:

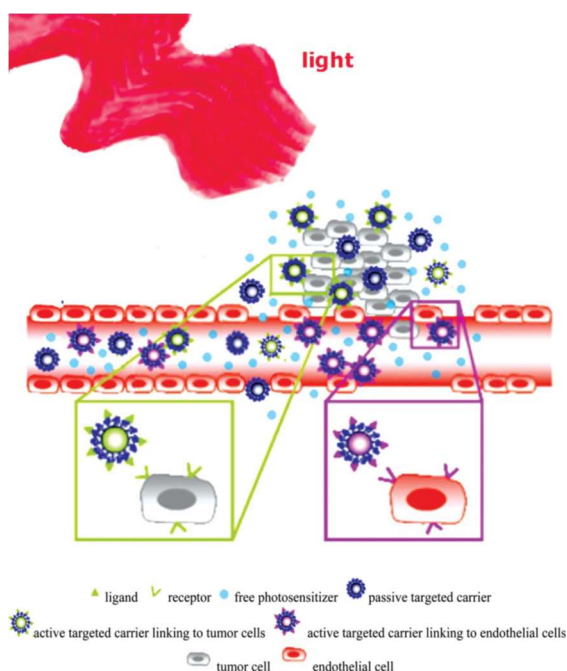
- 1) usystematyzowanie metod doświadczalnej, przedklinicznej fotochemioterapii raka jelita grubego, w zależności od rodzaju i mechanizmu działania sensybilizatora, protokołu użytej metody oraz modelu doświadczalnego.
- 2) usystematyzowanie metod celowanej fotochemioterapii chorób nowotworowych, wraz z wysunięciem postulatów nowego paradygmatu fotochemioterapii, opartego na koncepcji nowotworu jako heterogenicznej struktury komórkowej podlegającej dynamicznym zmianom pod wpływem czynników otoczenia.
- 3) zbadanie wpływu doświadczalnej ALA-PDT na produkcję czynnika zahamowania migracji makrofagów (macrophage migration inhibitory factor-MIF) oraz białka chemotaktycznego dla monocytów 1 (monocyte chemotactic protein-1) w dwóch liniach komórek raka jelita grubego o różnym stopniu złośliwości, w warunkach normoksji oraz w warunkach zbliżonych do hipoksji (CoCl₂).
- 4) zbadanie właściwości farmakokinetycznych protoporfirynianu argininy w skórze myszy oraz działania fotodynamicznego względem guzów jelit przeszczepionych na skórę myszy, po podaniu dożylnym w dawce 10 mg/kg i naświetleniu światłem czerwonym po upływie 24 i 72 h od chwili podania fotosensybilizatora;

Wyniki badań.

- 1) A.M. Bugaj. Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10: 1097–1109. IF = 2,584; MNiSW = 27,0.

W niniejszym artykule omówiłem aktualnie rozwijane strategie celowanej fotochemioterapii, jednej nowych strategii leczenia nowotworów, pozwalającej na ominięcie trudności stwarzanych przez konwencjonalną chemioterapię, takich jak oporność komórek nowotworowych wobec chemioterapeutyku lub toksyczność tego leku względem komórek zdrowych. Przeanalizowałem ponad 100 artykułów zawartych w bazach danych NCBI, Excerpta Medica i Chemical Abstracts. Słowa kluczowe stanowiły: „targeted therapy”, „photodynamic therapy”, „photosensitizer(s)”, „passive targeting”, „active targeting”, „nanotechnologies”, „nanoparticles”, „cellular cancer models”.

Strategie celowanej fotochemioterapii można podzielić na (Rys. 6):



Rys. 6. Strategie celowanej PDT. W strategii „pasywnej” fotosensybilizator wolny lub związany z nośnikiem nie zawierającym ligandów selektywnie dociera do tkanki nowotworowej wskutek zwiększonej przepuszczalności naczyń otaczających tę tkankę (efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji). Wyposażenie fotosensybilizatora lub jego nośnika w odpowiednie ligandy wiążące się z receptorami na powierzchni komórek mięsistych nowotworu lub komórek nabłonkowych jego naczyń stanowi istotę strategii „aktywnej” (wg [113] i [114]).

- pasywne, wykorzystujące fizykochemiczne właściwości fotosensybilizatorów oraz patofizjologiczne cechy tkanek objętych procesami nowotworowymi (efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji – *enhanced permeability and retention*, EPR) do selektywnego gromadzenia się w tych tkankach;
- aktywne, w którym fotosensybilizator jest zaopatrzony w ligandy wiążące się na zasadzie rozpoznania molekularnego z określonymi receptorami w tkance docelowej co zwiększa jego powinowactwo do tej tkanki;

- „aktywowalne” („*activatable*”), gdzie nieaktywny fotobiologicznie sensybilizator dopiero w tkance docelowej, pod wpływem czynników środowiska lub reakcji enzymatycznych, ulega przemianie do formy aktywnej, przejawiającej działanie fotodynamiczne.

W fotochemioterapii pasywnej szerokie zastosowanie znalazły nanomateriały, takie jak naturalnego pochodzenia polimer chitosan, usprawniający transport ALA do komórek raka jelita grubego [115], czy bio-niedegradowalny syntetyczny polimer organiczny będący pochodną N-(2-hydroxypropylo)metakrylamidu (HPMA), ułatwiający transport do tych komórek fotosensybilizatorów chlorynowych [116].

Z kolei w przypadku fotochemioterapii aktywnej, należy wyróżnić strategię „wycelowanej w komórki” i „wycelowanej w naczynia”, co daje możliwość uzyskania w ramach pierwszej z tych strategii działania antyangiogennego poprzez związanie cząsteczek fotosensybilizatorów z takimi ligandami jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor – VEGF). Z innych ligandów dostępnych do stosowania w celowanej fotochemioterapii „aktywnej”, należy wymienić peptydy sygnału lokalizacji jądrowej (*nuclear localization signal* – NLS) [117] oraz aptamery – nukleotydy o ściśle określonej trójwymiarowej strukturze, które odznaczają się wysoką specyficznością do peptydowych sygnatur O-glikanowych występujących na powierzchni komórek raka jelita grubego HT-29, nieobecnych natomiast na powierzchni normalnych komórek nabłonkowych [118].

W fotochemioterapii „aktywowalnej”, istotne nadzieje roją wszystkim „molekularne latarnie morskie” (*molecular beacons*) złożone z cząsteczki fotosensybilizatora i wygaszacza połączonych specyficznym dla danej choroby łańcuchem białkowym lub nukleotydowym, utrzymującym fotosensybilizator w bliskości wygaszacza, wskutek czego pierwszy z nich jest wygaszany. W wyniku oddziaływania tego łącznika z cząsteczką w miejscu działania następuje oddzielenie wygaszacza od fotosensybilizatora, a tym samym jego aktywację w ściśle określonym miejscu działania [119].

Spośród innych innowacyjnych koncepcji celowanej fotochemioterapii należy wymienić wielofunkcyjną nanoplatformę zawierającą ziarna Fe_3O_4 co umożliwia jej „nawigację” w ustroju za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego, jak również stosowanie fotochemioterapii w skojarzeniu z hipertermią [120].

Istnieje ponadto konieczność wprowadzenia nowego paradygmatu PDT nowotworów, opartego na zrewidowanym modelu nowotworu, uwzględniającym jego heterogenność, specyficzną strukturę anatomiczną oraz dynamiczną zmienność morfologiczną i fizjologiczną składników tkanki nowotworowej wskutek ciągłego oddziaływania między sobą oraz z tkankami otaczającymi nowotwór [121, 122].

- 2) A. Kawczyk-Krupka, A.M. Bugaj, W. Latos, K. Zaremba, K. Wawrzyniec, M. Kucharzewski, A. Sieroń. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment – the state of the art in preclinical research. *Photodiagn Photodyn Ther* 2016; 13: 158–174. **IF = 2,219; MNiSW = 25,0.**

W niniejszym artykule dokonano przeglądu badań przedklinicznych dotyczących działania fotochemioterapii (terapii fotodynamicznej, PDT) wobec komórek raka jelita grubego (colorectal cancer – CRC) in vitro oraz na modelach zwierzęcych. Przeanalizowano ponad 100 artykułów zawartych w bazach danych NCBI, Excerpta Medica i Chemical Abstracts. Słowa kluczowe stanowiły: „colorectal cancer”, „photodynamic therapy”, „photosensitizer(s)”, „in vitro”, „cell culture(s)”, „in vivo”, „animal experiment(s)”.

Table 1
Photodynamic therapy of colorectal cancer—preclinical studies in vitro.

Cell line(s)	Photosensitizer(s)	Radiation	Reference
HT-29	Photofrin®, 2.5–10 mg/l	585 nm, 2.7 J/cm ²	Hanlon et al. [28]
CT-26	HMME, different dilutions	630 nm, 5 J/cm ²	He et al. [29]
LS513, LS1034	Photofrin®, 25 mg/l	650 nm, 21–105 mJ/cm ²	Fisher et al. [31]
HCT-116	PPIX, 25 and 50 µM	λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 580 nm	Sznarkowska et al. [30]
HCT-116	PPIX, 0.5–10 mg/l	Red light, 2 J/cm ²	Zawacka-Pankau et al. [33]
CT-26	PPIX, 1 mg/l	633 nm, 1 and 5 J/cm ²	Wei et al. [35]
LoVo	Photofrin®, 30 mg/l	632.8 nm, 3–6 J/cm ²	Kulbacka et al. [73]
DHD-K12	Photofrin®, 0.5 mg/l	10–50 J/cm ²	Rousset et al. [38]
HCT-116	BPD, 50 µg/l		
HCT-116	Newly synthesized porphyrin and chlorin derivatives, Photofrin®	400–700 nm, 39.6 mJ/(cm ² nm)	Banfi et al. [36]
LoVo, LoVoDX	0.5–10000 µg/l CoTPPS, MnTMPyCl ₂ , 6 and 12 µM	435 and 530 nm, 10 mW/cm ²	Kulbacka et al. [74]
HCT-116	Newly synthesized phenyl porphyrin derivatives, m-THPC, 500–1000 µg/l	White light, 20 mW/cm ²	Gariboldi et al. [37]
Colo-201	m-THPC, 0.125–1 mg/l	500 nm, 1–18 J/cm ²	Leung et al. [45]
HT-29	m-THPC, 1 mg/l	405 and 413 nm (blue light), 2.3 mW/cm ²	Melnikova et al. [46]
HCT-116	m-THPC, 0.1 mg/l	652 nm, 0.125–1 J/cm ²	Schwarz et al. [47]
C-26	Ce6, 0.5 mg/l	662 nm, 3–12 J/cm ²	Li et al. [48]
Colo-205	Chlorin p6, 10 µM	White light, 9.6 W/m ²	Sharma et al. [49]
HCT-116	ATX-S10Na(II), 20 mg/l	670 nm, 5 J/cm ²	Mitsunaga et al. [50]
HCT-116 cells	DH-II-24, 5 mg/l	Red light (λ > 630 nm) 1.45 mW/cm ²	Lim et al. [98]
HT-29, HCT-116	H ₂ TFPC-SGLc, Talaporfin, 1 µM	633 nm, 16 J/cm ²	Tanaka et al. [100]
HT-29	Pheophorbide a, 0–2 µM	630 nm, 2 J/cm ²	Xu et al. [51]
HCT-116	Pyropheophorbide a methyl ester, 2 µM	Red light (λ > 600 nm), 160 W m ²	Matroule et al. [52]
HCT-116	Pyropheophorbide a methyl ester, 6 µM	Red light (λ > 600 nm), 32–96 kJ/m ²	Matroule et al. [53]
HCT-116	Aminopyropheophorbide, 2 µM	Red light (λ > 600 nm), 160 W/m ²	Matroule et al. [52]
CaCo-2, HT-29, SW-480	100 mg/l ¹⁴ C ALA induced PPIX	Radioactivity measurement	Krieg et al. [39]
WiDr	0.1–1 mM ALA induced PPIX	λ_{ex} = 407 nm, λ_{em} = 606 nm	Juzeniene et al. [40]
WiDr	2 mM ALA induced PPIX	White light, 32.4 kJ/m ²	Gederaas et al. [41]
SW-480	ALA induced PPIX 40 mg/l	532 nm, 12 mW	Zheng et al. [42]
CaCo-2, HT-29, SW-480	0.012–0.6 mM ALA esters induced PPIX	λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 670 nm	Brunner et al. [43]
SW480, SW620	500, 1000 and 1500 mM ALA induced PPIX	Incoherent light (I = 600–720 nm) 10, 30 and 60 J/cm ²	Kawczyk-Krupka et al. [44]
HCT-116	Pc4, 300 nM	Red light, 200 mJ/cm ²	Chiu et al. [55]
HT-29	Si(IV) Pc derivatives, 0.01–1 µM	Red light (λ > 640 nm), 48 J/cm ²	Lo et al. [56]
CaCo-2	GaPcCl ₄ , 100 mg/l	661 nm, 8.5 J/cm ²	Maduray and Odhay [57]
DLD-1	ZnPcS ₄ , 10–40 µM	680 nm, 5 J/cm ²	Manoto et al. [58]
DLD-1	ZnPcS ₄ max, 20 mM	680 nm, 5 J/cm ²	Sekhejane et al. [59]
C-26	Hypericin, 1–4 µM	550, 590 nm, 0.1–2.5 J/cm ²	Blank et al. [60]
HT-29	Hypericin, 20–60 nM	12 J/cm ² , 11 + 1 J/cm ²	Sačková et al. [61]
HT-29	Hypericin, 100–500 nM	λ = 530–620 nm, 2.7 J/cm ²	Mikeš et al. [62]
HT-29	Hypericin, 60 nM	λ = 530–620 nm, 1, 12, 1 + 11 J/cm ²	Kuliková et al. [63]
HT-29	Hypericin, 0.04–0.1 µM	λ = 530–620 nm, 4.4 J/cm ²	Kleban et al. [64]
HT-29	Hypericin, 100–250 nM	λ = 530–620 nm, 4.4 J/cm ²	Kleban et al. [65]
HT-29	Hypericin, 100 nM	λ = 530–620 nm, 3.15 J/cm ²	Jendželovský et al. [66]
HT-29	Hypericin, 25–75 nM	λ = 530–620 nm, 3.15 J/cm ²	Mikeš et al. [67]
HT-29	Hypericin, 1–400 nM	λ = 530–620 nm, 4.4–10 J/cm ²	Mikeš et al. [68]
CCL-220.1	Calphostin C, 37.5–150 nM	λ = 580–620 nm, 0.4 J/cm ²	Olivo and Ali-Seyed [69]
CX-1	Rhodamine and cyanine dyes, 0.01–1 µM	680–720 nm 100–175 J/cm ²	Oseroff et al. [70]
HT-29	Indocyanine green, 100–500 µM	805 nm, 30 J/cm ²	Bäumler et al. [71]
HT-29	Photofrin®, 2.5–15 mg/l	585 nm, 2.7, 5.4 and 8.1 kJ/m ²	Singh et al. [72]
HT-29	AlPcS ₄ , 5–60 mg/l	585 nm, 2.7, 5.4 and 8.1 kJ/m ²	Shen et al. [76]
HT-29	Nile Blue A, 0.25–4 mg/l	400–440 nm, 15 J/cm ²	
SW-480	TCPP-loaded PLGA nanoparticles, 1 µM	λ_{ex} = 405 nm λ_{em} = 635 nm	Hu et al. [77]
CaCo-2	ALA-loaded chitosan, 0.1–2 mg/ml	630 nm, 4 mW/cm ²	Yang et al. [78]
HCT-116	PPIX loaded silica nanoparticles, 5 µM	650–670 nm, 7 J/cm ²	Simon et al. [79]
HT-29	SN-38 micelles, 0.001–1000 mg/l		Peng et al. [81]

Table 1 (Continued)

Cell line(s)	Photosensitizer(s)	Radiation	Reference
LoVo	Pyropheophorbide-a and verteporfin conjugates with scFvs, 0.25–100 µM	680 nm, 13.4 J/cm ²	Bhatti et al. [83]
LoVo	0.01–2.5 mg/l	676 nm, 50 J/cm ²	Carcenac et al. [112]
HT-29	Ce6 conjugates with murine monoclonal antibody	666 nm, 3 J/cm ²	Del Governatore et al. [84]
HT-29	DNA aptamers with Ce6, 0.1–100000 nM	664 nm, 12 J/cm ²	Ferreira et al. [86]
WiDr	TPPS _{2a} , 0.1 mg/l	435 nm 13.5 mW/cm ²	Weyergang et al. [85]
WiDr	TPCS _{2a} , 0.35 mg/l (PCI)	435 nm, 0.36–2.16 J/cm ²	Bostad et al. [87]

Badania in vitro na hodowlach komórkowych (Tabela 1) umożliwiały poznanie mechanizmu działania fotosensybilizatorów na komórki CRC na poziomie molekularnym i komórkowym. Modele in vitro pozwalały na uproszczenie badanego układu komórkowego w stosunku do organizmu żywego, dzięki czemu badacze mogli skupić się tylko na niektórych jego komponentach i oddziaływaniach pomiędzy nimi, co jest istotne w badaniach działania fotochemioterapii na komórki nowotworowe, z uwagi na złożony charakter tych procesów. Ważną zaletą badań in vitro jest możliwość wykonywania badań bezpośrednio na komórkach ludzkich, wyniki ich nie wymagają zatem translacji z organizmu zwierzęcego na człowieka. Zasadniczą niedogodność tych badań stanowi natomiast możliwość nadinterpretacji uzyskanych wyników poprzez ich ekstrapolację na nowotwór jako całość, gdy tymczasem należy sobie zdawać sprawę z heterogeniczności i dynamicznej zmienności fizjologii tkanki nowotworowej, spowodowanej jej ciągłym oddziaływaniem z tkankami otoczenia.

Table 2
Photodynamic therapy of colorectal cancer—preclinical animal research.

Animal model	Photosensitizer	Radiation	References
Male athymic nude mice bearing HT-29 tumor cells	Photofrin® and liposomal pheophorbide a, 30 mg/kg i.p.	636 and 665 nm, 100 J/cm ²	Hajri et al. [102]
Nude mice bearing HT-29 tumor cells	Photofrin® 30 mg/kg i.p.	red light, 75 and 150 J/cm ²	Lantz et al. [90]
BALB/c mice, bearing Colo-26 tumor cells	Photofrin®, 15 mg/kg i.p.	630 and 510 nm, 40 and 70 J/cm ²	Abulafi et al. [91]
Female BALB/c-nu/nu athymic nude mice bearing WiDr tumor cells	PPArg ₂ , 2 and 10 mg/kg i.v.	632 nm, 150 J/cm ²	Bugaj et al. [93]
Female BALB/nude mice, bearing HCT-116 cells	DH-II-24, 1 mg/kg i.v.	Red light (λ > 630 nm) 154 J/cm ²	Lim et al. [98]
Female Balb c/mice bearing C-26 tumor cells	Lu-Tex, 10 mg/kg i.p. ALA, 200 mg/kg i.p. Ce6, 5 mg/kg i.p. Photofrin®, 10 mg/kg i.p.	600–800 nm, 90–240 J/cm ²	Kostenich et al. [94]
Rats	ALSPC, 5 mg/kg i.v.	675 nm, 50 mW	Barr et al. [109]
Rats	ALSPC, 5 mg/kg i.v.	675 nm, 50 mW	Barr et al. [111]
Normal and DMH induced tumor bearing male Wistar rats	ALSPC, 5 mg/kg i.v.	675 nm, 50 mW	Barr et al. [110]
Normal Wistar rats	ALA, 25–400 mg/kg i.v.	630 nm, 10–200 J per animal	Messmann et al. [95]
Normal female Wistar rats	ALA, 200 mg/kg i.v. 40, 200 and 400 mg/kg p.o.	λ _{ex} = 400 nm λ _{em} = 635 nm	Loh et al. [96]
Female BALB/c mice bearing C-26 tumor cells	Photofrin®, 10 mg/kg i.p. ALA 200 mg/kg i.p. Ce6, 5 mg/kg i.p.	600–800 nm, 120–300 J/cm ²	Orenstein et al. [101]
Female C57BL/6NCR bearing Colo-38 tumor cells	NPe6, 5 mg/kg i.v.	664 nm, 61 J/cm ²	Webber et al. [97]
Male BALB/cByj mice bearing C-26 tumor cells	Ce6, 2.25 mg/kg i.v.	662 nm, 100 J/cm ²	Li et al. [119]
Male Wag/Rij rats bearing CC531 tumor cells	m-THPC, 0.1 and 0.3 mg/kg i.v.	652 nm, 15 J to each tumor	Rovers et al. [115]
Female BALB/c, BALB/nude and NOD/scid mice bearing CT-26 tumor cells	WST11, 9 mg/kg i.v.	755 nm, 30 J/cm ²	Preise et al. [119]
Female nu/nu- athymic mice xenografted with SW-480 tumor cells	Pc4, 1 mg/kg i.v.	670 nm, 150 J/cm ²	Whitacre et al. [107]
BALB/c mice bearing CT26 cancer cells	AlPcS ₄ 2 mg/kg i.v.	White light (Versa-light device)	Kashtan et al. [17]
DMH induced tumor bearing male Wistar rats	ALSPC, 5 mg/kg i.v.	λ _{ex} = 610 nm λ _{em} = 675 nm	Tralau et al. [108]
Swiss nude mice xenografted with T-380 tumor cells	¹²⁵ I-MAb-(AlPcS ₄ A ₁) _n , and ¹³¹ I-MAb-(AlPcS ₄ A ₁) _n , 10 µg/0.3 g of tumor, i.v.	Radioactivity measurement	Carcenac et al. [112]
Female nude mice NMRI nu-nu xenografted with G-3 colon tumor cells	0.1 ml of 0.01–1% methylene blue, injection into the tumor	662 nm, 100 and 200 J/cm ²	Orth et al. [114]
Female BALB/c Slc-nu/nu nude mice xenografted with HT-29 and HCT-116 tumor cells	H ₂ TFPC-SGlc, Talaporfin, 6.25 µM/kg i.v.	633 nm, 37.5 J/cm ²	Tanaka et al. [100]
Female Swiss nude mice xenografted with HT-29 tumor cells	Ce6 immunoconjugates, and Ce6, 0.25 mg/kg i.v.	λ _{ex} = 400 nm λ _{em} = 580–720 nm	Hamblin et al. [116]
Normal and xenografted with HT-29 tumor cells female Swiss nude mice	Ce6 immunoconjugates, and Ce6, 0.25 mg/kg i.v.	666 nm, 28–286 J/cm of diffuser	Del Governatore et al. [84]
Female BALB/c mice xenografted with CT-26 tumor cells	ATX-S10 Na(II), 5 mg/kg i.v.	670 nm, 150 J/cm ²	Saji et al. [120]
B6D2F ₁ and Balb/c mice, xenografted with C-26 tumor cells	Photofrin®, 15 mg/kg i.p.	630 nm, 150 J/cm ²	Goląb et al. [121]

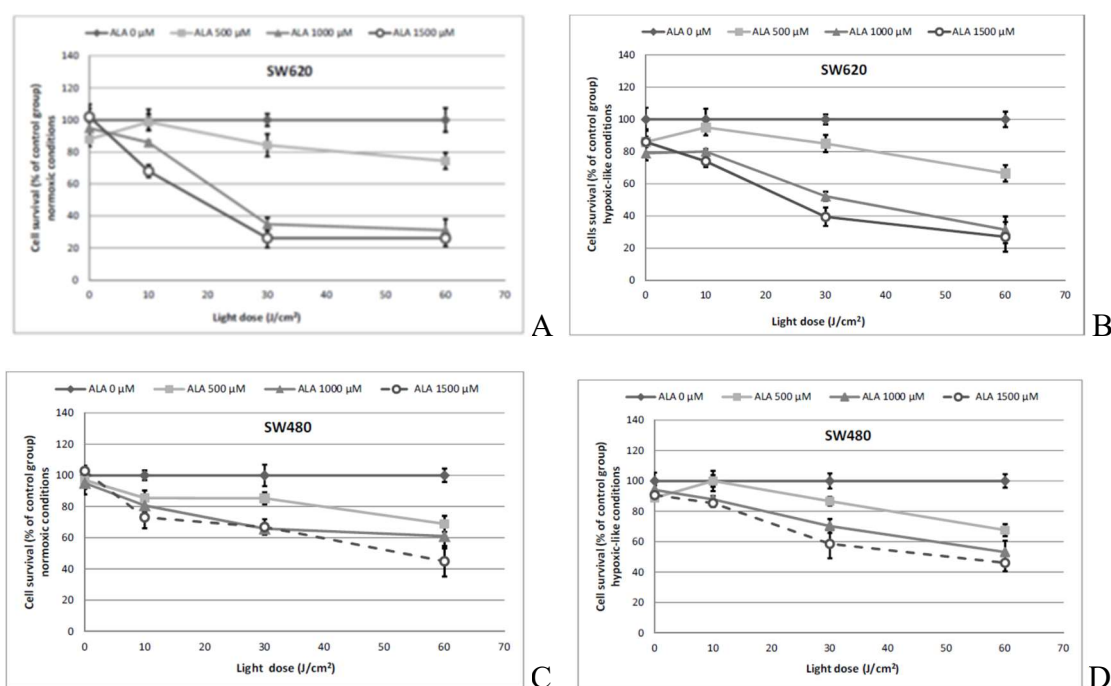
Celem badań na zwierzętach (Tabela 2) było zazwyczaj wyjaśnienie mechanizmu obserwowanego efektu fototoksycznego w skali organizmu żywego, wyznaczenie bezpieczeństwa i skuteczności tej metody oraz translacja uzyskanych wyników na korzyści kliniczne.

Niezależnie od użytego fotosensybilizatora, protokołu i modelu doświadczalnego, obserwowano dobroczynny efekt metody fotodynamicznej wobec CRC, również w przypadku przerzutów do wątroby na modelach zwierzęcych (gryzonie). Stwierdzono także immunomodulacyjne działanie tej metody oraz możliwość jej kojarzenia z immunomodulacyjnymi lekami biologicznymi, co może być użyteczne w celu zmniejszenia dawek fotosensybilizatora i światła oraz zapobiegania nawrotom CRC.

W przypadku badań na zwierzętach istotną kwestią był wybór odpowiedniego modelu doświadczalnego, który jak najściślej imitowałby sytuację u człowieka i umożliwiał przeniesienie uzyskanych wyników badań na warunki kliniczne. Liczne modele zwierzęce wykorzystywane w badaniach tradycyjnych chemioterapeutyków mogą być nieodpowiednie do badań fotosensybilizatorów, z uwagi na występujące podczas działania tych leków złożone współzależności między wieloma czynnikami fizykochemicznymi, morfologicznymi i fizjologicznymi w środowisku guza, takimi jak unaczynienie i dowóz tlenu do tkanki nowotworowej, sygnatury molekularne komórek tej tkanki, a także biodostępność i farmakokinetyka fotosensybilizatorów, które, w odróżnieniu od chemioterapeutyków konwencjonalnych, działają raczej poprzez bezpośrednie katalizowanie wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych, a nie poprzez pobudzanie określonych receptorów komórkowych, choć wiązanie fotosensybilizatorów z odpowiednimi receptorami wykorzystuje się, aby zwiększyć powinowactwo tych związków do tkanek objętych procesem nowotworowym. Z drugiej strony, nawet w przypadku konwencjonalnych chemioterapeutyków, wyniki badań nie zawsze mogą być przenoszone z modeli doświadczalnych na warunki kliniczne, z powodu braku jednolitych wymagań dla badań na zwierzętach. Niemniej jednak, przedkliniczne badania PDT na modelach komórkowych i zwierzęcych mogą być użyteczne w badaniach mechanizmu i skuteczności tej metody jako punkt wyjścia do badań klinicznych.

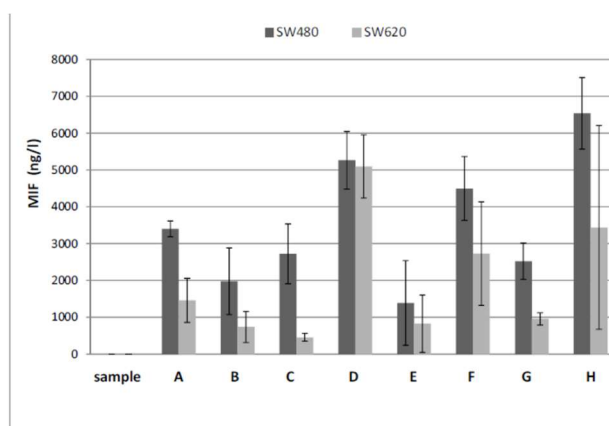
- 3) A. Kawczyk-Krupka, A.M. Bugaj, W. Latos, K. Wawrzyniec, P. Oleś, A. Mertas, Z. Czuba, W. Król, K. Sieroń-Stoły, A. Sieroń. ALA-mediated photodynamic effect on apoptosis induction and secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and of monocyte chemotactic protein (MCP-1) by colon cancer cells in normoxia and in hypoxia-like conditions in vitro. *Photodiagn Photodyn Ther* 2015; 12: 27-35. IF = 2,014; MNiSW=20,0.

Metoda fotodynamiczna wykazuje działanie immunomodulacyjne. Celem badań była ocena wpływu indukowanego przez kwas 5-aminolewulinowy (ALA) efektu fotodynamicznego na produkcję dwóch cytokin stymulujących wzrost guza: czynnika zahamowania migracji makrofagów (*macrophage migration inhibitory factor*, MIF) oraz białka chemotaktycznego dla monocytów 1 (*monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1) w komórkach raka jelita grubego in vitro, w warunkach normoksji oraz w warunkach zbliżonych do hipoksji (w obecności CoCl_2). Do badań użyto dwie linie komórek raka jelita grubego różniące się stopniem złośliwości: SW480 i SW620. Stężenie MCP-1 i MIF mierzono w supernatancie hodowli komórek poddawanych działaniu ALA w stężeniu 500, 1000 i 1500 $\mu\text{mol/l}$ i naświetlaniu niespójnym światłem o zakresie długości fali 600-720 nm, w dawkach energii 10, 30 i 60 J/cm^2 .



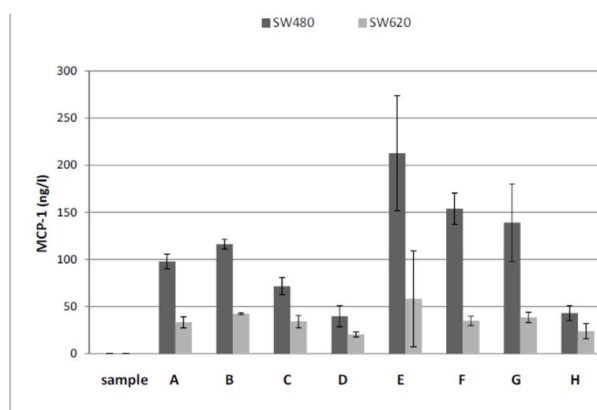
Rys. 7 Przeżywalność komórek linii nowotworowych SW620 (Rys. 7A i 7B) i SW480 (7C i 7D) poddawanych działaniu różnych stężeń ALA (0; 500; 1000 i 1500 $\mu\text{mol/l}$) i różnych dawek energii światła (0; 10; 30 i 60 J/cm^2) w warunkach normoksji (Rys 7A i 7C) i w warunkach zbliżonych do hipoksji (obecność CoCl_2 – Rys. 7B i 7D), wyznaczona za pomocą testu MTT. Wyniki stanowią wartości średnie z 4 niezależnych eksperymentów po 16 prób. Słupki błędów obrazują odchylenia standardowe.

Komórki SW620, o większym stopniu zjadliwości, były bardziej podatne na indukowany przez ALA efekt fotodynamiczny (Rys. 7A) niż komórki SW480 (Rys 7B). W przypadku komórek SW620 efekt ten jednak ulegał częściowemu osłabieniu w warunkach zbliżonych do hipoksji (Rys 7C), podczas gdy dla komórek SW480 podobny wpływ warunków zbliżonych do hipoksji nie został zaobserwowany (Rys 7D).



Rys. 8. Stężenie MIF w supernatancie z hodowli komórek raka jelit linii komórkowych SW480 i SW620. A – warunki normoksji, próba kontrolna, B – warunki normoksji, światło, dawka energii 10 J/cm², C – warunki normoksji, ALA 100 μmol/l, D – warunki normoksji, ALA 100 μmol/l + światło, dawka energii 10 J/cm², E – warunki zbliżone do hipoksji, próba kontrolna, F - warunki zbliżone do hipoksji, światło, dawka energii 10 J/cm², G - warunki zbliżone do hipoksji, ALA 100 μmol/l, H - warunki zbliżone do hipoksji, ALA 100 μmol/l + światło, dawka energii 10 J/cm². Wyniki stanowią wartości średnie z 3 niezależnych eksperymentów po 12 prób. Słupki błędów obrazują odchylenia standardowe.

Pod wpływem fotodynamicznego efektu indukowanego przez ALA stężenie MIF w supernatancie wzrastało (Rys. 8), co jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż cytokina ta stymuluje proliferację nowotworów.



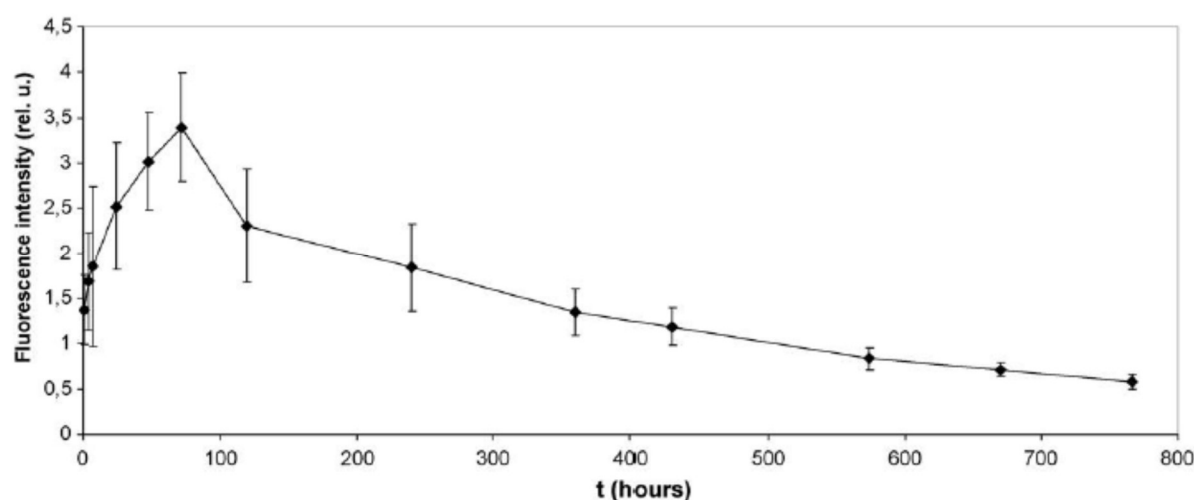
Rys. 9. Stężenie MCP-1 w supernatancie z hodowli komórek raka jelit linii komórkowych SW480 i SW620. A – warunki normoksji, próba kontrolna, B – warunki normoksji światło, dawka energii 10 J/cm², C – warunki normoksji, ALA 100 μmol/l, D – warunki normoksji, ALA 100 μmol/l + światło, dawka energii 10 J/cm², E – warunki zbliżone do hipoksji, próba kontrolna, F - warunki zbliżone do hipoksji, światło, dawka energii 10 J/cm², G - warunki zbliżone do hipoksji, ALA 100 μmol/l, H - warunki zbliżone do hipoksji, ALA 100 μmol/l + światło, dawka energii 10 J/cm². Wyniki stanowią wartości średnie ± odchylenie standardowe z 3 niezależnych eksperymentów po 12 prób. Słupki błędów obrazują odchylenia standardowe.

Z drugiej jednak strony, pod wpływem fotodynamicznego efektu związanego z działaniem ALA, stężenie MCP-1 malało (Rys. 9), co z kolei byłoby korzystne, przyczyniając się do zahamowania wzrostu guzów.

W warunkach zbliżonych do hipoksji, stężenia MIF i MCP-1 w supernatancie nie różniły się w sposób istotny od stężeń tych cytokin w warunkach normoksji.

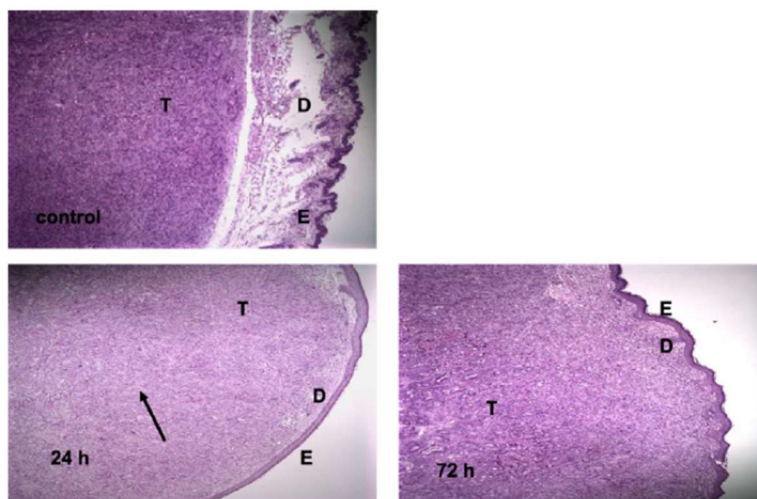
- 3) A. Bugaj, M. Kwitniewski, V. Iani, A. Juzeniene, P. Juzenas, L.W. Ma, J. Moan. Photodynamic therapy with di-L-arginine protoporphyrinate on WiDr human colon adenocarcinoma xenografts in athymic nude mice. *Photodiagn Photodyn Ther* 2007; 4: 237-241. **MNiSW = 3,0.**

Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie farmakokinetyki diargininianu protoporfiryny w skórze myszy oraz zdolności indukowania przez ten związek pod działaniem światła czerwonego ($\lambda = 632\text{nm}$, dawka energii 150J/cm^2) nekrozy guzów jelit przeszczepionych na skórę myszy.



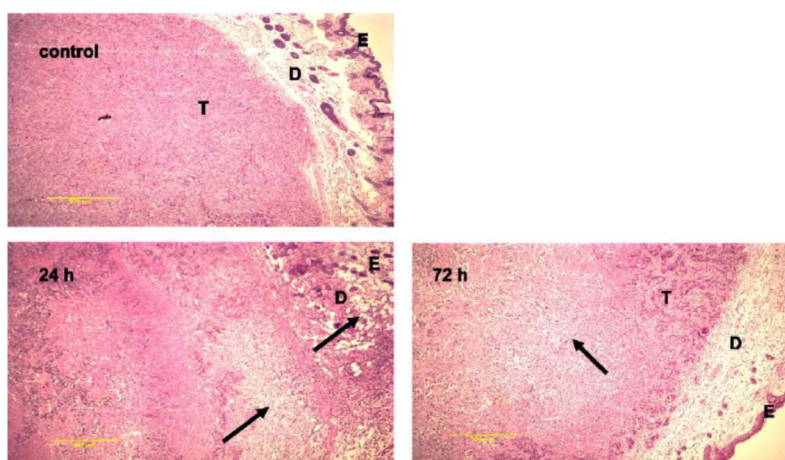
Rys. 10. Kinetyka fluorescencji PPArg₂ w skórze zdrowych myszy po podaniu dożylnym w dawce 10 mg/kg. Natężenie fluorescencji mierzono dla długości fali wzbudzenia 407 nm i długości fali emisji 633 nm (maksimum emisji PPArg₂), po odjęciu autofluorescencji skóry jako tła emisji. Wyniki stanowią wartości średnie z pomiarów wykonanych dla pięciu myszy w trzech różnych miejscach skóry dla każdego zwierzęcia. Słupki błędów obrazują wartości średniego błędu średniej.

Po podaniu PPArg₂ zwierzętom doświadczalnym dożylnie w dawce 2mg/kg w ciągu 16h od chwili podania nie obserwowano istotnych zmian fluorescencji ich skóry, w przypadku dawki dożylnej 10mg/kg rejestrowano natomiast wyraźne widmo emisyjne o maksimum przy długości fali 630nm, którego natężenie początkowo wzrastało, osiągając wartość maksymalną po upływie 72 h od chwili podania fotosensybilizatora, a następnie powoli opadało, sugerując eliminację PPArg₂ ze skóry, jednak jeszcze po upływie 32 dni od chwili podania leku fluorescencja skóry badanych myszy miała większe natężenie niż autofluorescencja tej tkanki, wyznaczona dla zwierząt, którym nie podawano PPArg₂ (Rys. 10). Sugeruje to, że po podaniu dożylnym PPArg₂ może kumulować się w skórze, stwarzając ryzyko odczynów fototoksycznych lub fotoalergiczych.



Rys. 11. Mikrofotografie guzów WiDr poddawanych działaniu światła czerwonego bez podawania PPArg₂ (próba kontrolna) oraz po upływie 24 and 72h od podania PPArg₂ w dawce dożylniej 2mg/kg u myszy. Guzy naświetlano czerwonym światłem lasera ($\lambda = 635 \text{ nm}$, dawka energii 150 J/cm^2). E – naskórek, D – skóra właściwa, T – guz. Strzałkami oznaczono obszary nekrozy).

Badania histologiczne guzów jelit WiDr przeszczepionych na skórę myszy poddanych działaniu światła czerwonego po dożylnym podaniu PPArg₂ w dawce 2mg/kg, wykazały powstawanie nielicznych ognisk nekrozy, jeżeli naświetlanie to było przeprowadzanie 24h po podaniu fotosensybilizatora, podczas gdy w przypadku naświetlania po upływie 72h od podania tego leku nie zaobserwowano powstawania nekrozy (Rys. 11)



Rys. 12. Mikrofotografie guzów WiDr poddawanych działaniu światła czerwonego bez podawania PPArg₂ (próba kontrolna) oraz po upływie 24 and 72 h od podania PPArg₂ w dawce dożylniej 10 mg/kg u myszy. Guzy naświetlano czerwonym światłem lasera ($\lambda = 635\text{nm}$, dawka energii 150J/cm^2). E – naskórek, D – skóra właściwa, T – guz. Strzałkami oznaczono obszary nekrozy).

W przypadku dawki 10mg/kg nekroza była widoczna zarówno przy naświetlaniu po upływie 24 jak i 72h od chwili podania PPArg₂, przy czym w pierwszym z tych przypadków obejmowała zarówno tkankę guza, jak i zdrowego naskórka, który w drugim przypadku pozostawał nienaruszony (Rys. 12). Sugeruje to, że jeśli PPArg₂ jest podawany dożylnie w dawce 10mg/kg, to w celu uniknięcia niepożądanych efektów fototoksycznych lub fotoalergicznym należałoby naświetlać guzy jelit raczej po upływie 72 niż 24h od podania fotosensybilizatora.

Podsumowanie.

W pracach wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego wykazałem, że

- 1) Badania przedkliniczne na modelach komórkowych i zwierzęcych potwierdzają dobroczynne działanie fotochemioterapii wobec komórek raka jelita grubego, dla różnych fotosensybilizatorów, protokołów i modeli doświadczalnych.
- 2) Jedną z metod zwiększania skuteczności fotochemioterapii względem komórek raka jelit jest fotochemioterapia celowana, której techniki można podzielić na:
 - pasywne: wykorzystujące fizykochemiczne właściwości fotosensybilizatorów oraz patofizjologiczne cechy tkanek objętych procesami chorobowymi (efekt przenikalności i retencji);
 - aktywne: wyposażenie fotosensybilizatora w ligandy wiążące się z określonymi receptorami w tkance docelowej na drodze rozpoznania molekularnego;
 - „aktywowalne” („*activatable*”): nieaktywny fotosensybilizator dopiero w tkance docelowej, pod wpływem czynników środowiska lub reakcji enzymatycznych, ulega przemianie do formy aktywnej, przejawiającej działanie fotobiologiczne.
- 3) Niezbędne jest przyjęcie nowego paradygmatu fotochemioterapii nowotworów, uwzględniającego heterogeniczność oraz dynamiczną zmienność struktury i funkcji poszczególnych składników tkanki nowotworowej, wynikającą z ich ciągłego oddziaływania między sobą oraz z tkankami otaczającymi nowotwór.
- 4) Komórki raka jelit linii SW620, o większym stopniu złośliwości, są bardziej podatne na indukowany przez kwas 5-aminolewulinowy (ALA) efekt fotodynamiczny (ALA-PDT) niż komórki linii SW480, efekt ten jednak ulega częściowemu osłabieniu w warunkach zbliżonych do hipoksji, podczas gdy w przypadku komórek SW480 podobny wpływ warunków zbliżonych hipoksji nie jest obserwowany.
- 5) Dla komórek raka jelit SW620 i SW480 w wyniku ALA-PDT stężenie MIF w supernatancie wzrasta, co jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż cytokina ta stymuluje proliferację nowotworów, z drugiej jednak strony poziom MCP-1 maleje, co byłoby korzystne, przyczyniając się do zahamowania wzrostu guzów. Stężenia obu tych cytokin w badanym supernatancie nie zmieniają się w sposób istotny w warunkach zbliżonych do hipoksji w porównaniu z warunkami normoksji.
- 6) Diargininian protoporfiryny, nowej generacji fotosensybilizator rozpuszczalny w wodzie, po dożylnym podaniu myszom w jednorazowej dawce 10 mg/kg osiąga maksymalne stężenie w skórze po upływie 3 dni, jednak jeszcze po upływie 32 dni niewielkie ilości tego sensybilizatora pozostają w skórze, stwarzając ryzyko odczynów fototoksycznych i fotoalergiczych.
- 7) Diargininian protoporfiryny po dożylnym podaniu myszom w jednorazowej dawce 4 i 10 mg/kg powoduje nekrozę śródskórnie przeszczepionych tym zwierzętom guzów jelita naświetlonych światłem czerwonym po upływie 24 lub 72 h od chwili podania, przy czym w drugim z tych przypadków występuje niepożądany efekt fototoksyczny w obrębie naskórka.

Piśmiennictwo.

1. Diffey BL. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18: 68–74.
2. Wainwright M. *Photosensitisers in Biomedicine*. Wiley-Blackwell, Chichester 2009, str. 3-12, 113-145.
3. Björn LO. The nature of light and its interaction with matter. W: *Photobiology. The science of life and light*. Wydanie II. Rozdz. 1. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2008. Red. LO Björn, str. 1-39.
4. Dolphin D. Photomedicine and photodynamic therapy. *Can J Chem* 1994; 72: 1005-1013.
5. Jurkowitsch T, Knobler R. Light treatment in medicine. W: *Photobiology. The science of life and light*. Wydanie II. Rozdz. 22. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2008. Red. LO Björn, str. 577-590.
6. Moan J, Peng Q. An outline history of PDT. W: *Photodynamic therapy*, Rozdz. 1. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003. Red. T. Patrice, str. 3-17.
7. Hockberger PE. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 561–579.
8. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 450–462.
9. Urbach F, Forbes PD, Davies RE, Berger D. Cutaneous photobiology: past, present and future. *J Invest Dermatol* 1976; 67: 209–224.
10. Norval M. The Photobiology of Human Skin. W: *Photobiology. The science of life and light*. Wydanie II. Rozdz. 21. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2008. Red. LO Björn, str. 553-576.
11. Hawk JLM, Young AR, Ferguson J. Cutaneous photobiology. W: *Rook's Textbook of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd. 2010 Wyd. 5., t. 1. rozdz. 29. Red. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C., str. 29.1-29.24.
12. Polefka TG, Meyer TA, Agin PP, Bianchini RJ. Effects of solar radiation on the skin. *J Cosmet Dermatol*, 2012; 11: 134-143.
13. Bylaite M, Grigaitiene J, Lapinskaite GS. Photodermatoses: classification, evaluation and management. *Br J Dermatol* 2009; 161: 61-68.
14. Sharma VK, Sahni K, Wadhvani AR. Photodermatoses in pigmented skin. *Photochem Photobiol Sci* 2013, 12: 65-77.
15. Moan J, Baturaite Z, Porojnicu AC, Dahlback A, Juzeniene A. UVA, UVB and incidence of cutaneous malignant melanoma in Norway and Sweden. *Photochem Photobiol Sci* 2012; 11: 191-198.
16. Sassa S. The porphyrias. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18: 56-67.
17. Junkins-Hopkins JM. Porphyrias. W: *Clinical and pathological aspects of skin diseases in endocrine, metabolic, nutritional and deposition diseases*. Rozdz. 10. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2010. Red. F Rongioletti i BR Smoller, str. 83-90.
18. Frank J. The porphyrias. W: *Therapy of Skin Diseases*, Rozdz. 8.1. Springer Verlag Berlin-Heidelberg 2010. Red. T Krieg i in., str. 469-486.
19. Cappellini MD, Brancaloni V, Graziadei G, Tavazzi D, Di Pierro E. Porphyrias at a glance: diagnosis and treatment. *Intern Emerg Med* 2010; 5 (Suppl 1): S73–S80.
20. Hift RJ. The acute porphyrias. *Eur Gastroenterol Hepatol Rev* 2012; 8: 17–21.
21. Lim HW. Mechanisms of phototoxicity in porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyria. *Immunol Ser* 1989; 46: 671-685.
22. Epstein JH. Phototoxicity and Photoallergy. *Semin Cutan Med Surg* 1999; 18: 274-284.
23. Mang R, Stege H, Krutmann J. Mechanisms of phototoxic and photoallergic reactions. W: *Contact Dermatitis*. Wyd. 5. Rozdz. 8. Springer Verlag, Berlin- Heidelberg 2011. Red. JD Johansen PJ Frosch, J-P Lepoittevin, str. 155-163.
24. Björn LO, Huovinen P. Phototoxicity. W: *Photobiology. The science of life and light*. Wydanie II. Rozdz. 18. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2008. Red. LO Björn, str. 479-502
25. Horio T. Photoallergic reaction. Classification and pathogenesis. *Int J Dermatol* 1984; 23: 376-382.
26. Wainwright M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents*, 2008; 8: 280-291.
27. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992; 55: 145-157.
28. Graczyk A. Fotodynamiczna metoda w zastosowaniach onkologicznych. W: *Fizyka medyczna*, red. Pawlicki G, Pałko T, Golnik N, Gwiazdowska B, Królicki L. Wydawnictwo Akademickie EXIT, Warszawa 2002, str. 471-510.
29. Agostinis P, Berg K, Cengel KA i in. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 250–281.
30. Dall'Acqua F, Vedaldi D, Caffieri S. Principles of psoralen photosensitization. W: *The fundamental bases of phototherapy*, OEMF, Mediolan 1996. Red. H. Hönigsmann, G. Jori, AR. Young, str. 1-16.
31. Young AR. Photochemotherapy and skin cancerogenesis: a critical review. W: *The fundamental bases of phototherapy*, OEMF, Mediolan 1996. Red. H. Hönigsmann, G. Jori, AR. Young, str. 77-88.
32. Dalla Via L, Marciari Magno S. Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1405-1418.

33. Kitamura N, Kohtani S, Nakagaki R. Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev* 2005; 6: 168–185.
34. Potapenko AY. New Trends in photobiology. Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1991; 9: 1-33.
35. Giniūnas L, Rotomskis R, Smilgevičius V i in. Activity of haematoporphyrin derivative photoproduct in photodynamic therapy in vivo. *Lasers Med Sci* 1991; 6: 425-428.
36. Gudgin Dickson EF, Pottier RH. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1995; 29: 91-93.
37. Ma L-W, Bagdonas S, Moan J. The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2001; 60: 108-113.
38. Buchczyk DP, Klotz L-O, Lang K, Fritsch Cl, Sies H. High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA-irradiation. *Carcinogenesis* 2001; 22: 879-883.
39. Kessel D., Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1998; 42: 89-95.
40. Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 49: 71–86.
41. Rosenkranz AA, Jans DA, Sobolev AR. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 452–464.
42. Woods JA, Traynor NJ, Brancalion L, Moseley H. The effect of Photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 105–113.
43. Bugaj AM. Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10: 1097-1109.
44. Graczykowska A, Sobczyńska J. Fotouczulacze stosowane w fotodynamicznej metodzie PDT rozpoznawania i leczenia nowotworów. W: Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów, Red. Graczykowska A, Cz. I. Rozdz. 2. Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999. str. 95-183.
45. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2011; 40: 340-362.
46. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther* 2004; 1: 27–42.
47. Canham GWR. Porphyrins and evolutions. *Canadian Chemical Education* 1972; 8: 5-6.
48. Zhang Y, Lovell JF. Porphyrins as theranostic agents from prehistoric to modern times. *Theranostics* 2012; 2: 905-915.
49. Josefsen LB, Boyle RW. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* 2012; 2: 916-965.
50. Ricchelli F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1995; 29: 109-118.
51. Brault D, Vever-Bizet C, Dellinger M. Fundamental aspects of tumour photochemotherapy: interaction of porphyrins with membrane model systems and cells. *Biochimie* 1986; 68: 913-921.
52. Brault D, Vever-Bizet C, Le Doan T. Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models – evidence for pH effect. *Biochim Biophys Acta* 1986; 857: 238-250.
53. Seidlitz HK, Scheneckenburger H, Stettmaier K. Time-resolved polarization measurements of porphyrin fluorescence in solution and in single cells. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1990; 5: 391-400..
54. Fritsch C, Goertz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol* 1998; 134: 207-214.
55. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:293–302.
56. McCormack MA. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27: 52–62.
57. Palm M, Goldman MP. Aminolevulinic acid: actinic keratosis and photorejuvenation. W: Photodynamic therapy in dermatology. Springer Science+Business Media, LLC, Nowy Jork 2011. Red. MH. Gold, str. 5-29.
58. Ricchelli F, Gobbo S, Jori G, Moreno G, Vinzens F, Salet C. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. *Photochem Photobiol* 1993; 58: 53-58.
59. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J i in. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer* 1997; 79: 2282–2308.
60. Brown SB, Brown EA., Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncol.* 2004; 5: 497-508.
61. Piaquadio DJ, Chen DM, Farber HF. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses on the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch. Dermatol.* 2004; 140: 41-46.

62. Morton CA, Brown SB, Collins S. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol* 2002; 146: 552-567.
63. Papoutsaki M., Bianchi L., Teoli M., Citarella L., Talamonti M., Chimenti S.: Applicazioni cliniche della terapia fotodinamica con metil aminolevulinato in dermatologia. W: Manuale di terapia fotodinamica in dermatologia, red. M.Monti, S. Motta, Lampi di Stampa, Mediolan 2005, str. 197-202.
64. Blum A, Grossweiner L. Singlet oxygen generation by hematoporphyrin IX, uroporphyrin I and hematoporphyrin derivative at 546 nm in phosphate buffer and in the presence of egg phosphatidyl liposomes. *Photochem Photobiol* 1985; 41: 27-32.
65. Keene JP, Kessel D, Land EJ, Redmond RW, Truscott TG. Direct detection of singlet oxygen sensitized by haematoporphyrin and related compounds. *Photochem Photobiol* 1986; 43: 117-120.
66. Lambert CR, Reddi E, Spikes JD, Rodgers MAJ, Jori G. The effect of porphyrin structure and aggregation state on photosensitized processes in aqueous and micellar media. *Photochem Photobiol* 1986; 44: 595-601.
67. Reddi E, Jori G. Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines. *Rev Chem Intermed* 1988; 10: 241-268.
68. Chow EFA, Dolphin D, Paine III JP, McGarvey D, Potter R, Truscott TG. The excited states of covalently linked dimeric porphyrins. I: The excited single state. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1988; 2: 253-263.
69. Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5: 215-237.
70. Menon IA, Becker MA, Persad SD, Haberman HF. Quantitation of hydrogen peroxide formed during UV-visible irradiation of protoporphyrin, coproporphyrin and uroporphyrin, *Clin Chim Acta* 1990; 186: 375-381.
71. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist* 2006; 11: 1034-1044.
72. Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol* 2006; 2: 53-71.
73. Zhang J, Jiang C, Longo JPF, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018; 8: 137-146.
74. Jori G. Tumor photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36: 87-93.
75. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanism. *Radiat. Res.* 1998; 150 (Suppl.): 146-156.
76. Montforts F-P, Gerlach B, Höper F. Discovery and synthesis of less common natural hydroporphyrins. *Chem Rev* 1994; 94: 327-347.
77. Pavlov VYu. Modern aspects of the chemistry of protoporphyrin IX. *Russian J Org Chem* 2007; 43: 1-34.
78. Moore MR. An historical introduction to porphyrin and chlorophyll synthesis. W: *Tetrapyrroles: birth, life and death*. Rozdz. 1. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, Nowy Jork 2009. Red. MJ Warren i AG Smith, str. 1-28.
79. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publisher, Singapore 2000, str. 149-176.
80. Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* 1996; 96: 2841-2887.
81. Guallar V, Baik M-H, Lippard SJ, Friesner RA. Peripheral heme substituents control the hydrogen-atom abstraction chemistry in cytochromes P450. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6998-7002.
82. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 723-736.
83. Goldberg A, Paton WDM, Thompson JW. Pharmacology of the porphyrins and porphobilinogen. *Br J Pharmacol* 1954; 9: 91-94.
84. El-Sharabasy MMH., El-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br J Cancer* 1992; 65: 409-412.
85. Porra RJ. Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 492-516.
86. Lange N. Pharmaceutical and biological considerations in 5-aminolevulinic acid in PDT. W: *Advances in photodynamic therapy. Basic, translational, and clinical*. Rozdz. 4. Artech House, Boston-Londyn 2008. Red. MR Hamblin, P Mróz, str. 59-91.
87. Schneckenburger H, König K, Kunzi-Rapp K, Westphal-Frösch C, Rück A. Time-resolved in vivo fluorescence of photosensitizing porphyrins. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1993; 21: 143-147.
88. Pottier R, Truscott TG. The photochemistry of hematoporphyrin and related systems. *Int J Radiat Biol* 1986; 50: 421-453.
89. Kelty CJ, Brown NJ, Reed MWR, Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 158-168.

90. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1990; 6:143-148.
91. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 469-485.
92. Graczyk A, Konarski J. Complex salts of hematoporphyrin and of its derivatives, their synthesis, and therapeutic agent, 1995. Patent USA nr 5.451.599.
93. Graczyk A, Konarski J. Hematoporphyrin derivatives complex salts and their use in the detection and treatment of neoplasms, 1997. Patent Europejski nr EP 0539960 B1.
94. Bombalska A, Graczyk A. Interactions of peripheral-type benzodiazepine receptor with diamino acid derivatives of protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2009; 94: 138–142.
95. Bombalska A, Graczyk A. Interactions of protoporphyrin IX and its derivatives with benzodiazepine receptor. *Photodiagn Photodyn Ther* 2009; 6: 46–51.
96. Bombalska A, Graczyk A. Influence of photodynamic effect on biological activity of PBR–PP complexes. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2010; 98: 159–166.
97. Kwitniewski M, Kunikowska D, Dera-Tomaszewska B. i in. Influence of diamino acid derivatives of protoporphyrin IX on mouse immunological system: Preliminary results. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2005; 81: 129–135.
98. Graczyk A, Janik P. Investigations of therapeutic efficiency of porphyrin amino acid derivatives PP(AA)2Arg2 sensitizers on cell lines. IPA Conference, Nantes 1998, poster 86.
99. Bugaj A, Kwitniewski M, Iani V, Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Moan J. Photodynamic therapy with di-L-arginine protoporphyrinate on WiDr human colon adenocarcinoma xenografts in athymic nude mice. *Photodiagn Photodyn Ther* 2007; 4: 237-241.
100. Kwitniewski M, Juzeniene A, Ma L-W, Glosnicka R, Graczyk A, Moan J. Diamino acid derivatives of PpIX as potential photosensitizers for photodynamic therapy of squamous cell carcinoma and prostate cancer: In vitro studies. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2009; 94: 214–222.
101. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
102. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2011; 14: e31-e47.
103. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. NCCN Guidelines® Insights Colon Cancer, Version 2.2018. Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2018;16:359-369.
104. van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, i in. Addition of Aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3499–3506.
105. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, i in. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med* 2004; 350: 2335–2342.
106. Dallas NA, Xia L, Fan F, i in. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 2009; 69: 1951–1957.
107. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1254–1261.
108. Munker S, Gerken M, Fest P, et al. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. *BMC Cancer* 2018; 18: 455.
109. Barr H, Krasner N, Boulos PB, Chatlani P, Bown SG. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study, *Br. J. Surg.* 1990; 77: 93–96.
110. Kashtan H, Haddad R, Yossiphov Y, Bar-On S, Skornick Y. Photodynamic therapy of colorectal cancer using a new light source. From in vitro studies to a patient treatment. *Dis Colon Rectum* 1996; 4: 379–383.
111. Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, et al., Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX: a pilot study, *Gut* 1995; 36: 67–75.
112. Ezquerria Riega SD, Chiarante N, Valli F. Novel hydro- and lipophilic selenium zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical properties and photodynamic effects on CT26 colon carcinoma cells. *Dyes and Pigments* 2018; 156: 133-139.
113. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148: 135–146.
114. Danhier F, Ucakar B, Magotteaux N, Brewster ME, Préat V. Active and passive tumor targeting of a novel poorly soluble cyclin dependent kinase inhibitor. *Int J Pharm* 2010; 392: 20–28.
115. Yang S-J, Shieh M-J, Lin F-H. i in., Colorectal cancer cell detection by 5-aminolaevulinic acid loaded chitosan nanoparticles, *Cancer Lett* 2009; 273: 210–220.

116. Lu Z-R, Shiah J-G, Sakuma S, Kopečková P, Kopeček J. Design of novel bioconjugates for targeted drug delivery. *J Control Release* 2002; 78: 165–173.
117. Akhlynina TV, Jans DA, Rosenkranz AA. i in., Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity, *J Biol Chem* 1997; 272: 20328–20331.
118. Ferreira CSM, Cheung MC, Missalidis S, Bisland S, Gariépy J. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2008; 37: 866–876.
119. Chen J, Stefflova K, Warren M, Bu J, Wilson BC, Zheng G. Rational design of a receptor-targeted photodynamic molecular beacon for the multilevel control of singlet oxygen production and PDT activity in cancer cells, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 2007, 6449, 1–9.
120. Cinteza LO, Ohulchanskyy TY, Y Sahoo, Bergey EJ, Pandey RK, Prasad PN. Diacyllipid micelle-based nanocarrier for magnetically guided delivery of drugs in photodynamic therapy. *Mol Pharmaceutics* 2006; 3: 415–423.
121. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
122. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.

Plan kontynuacji badań.

Wyniki badań przedstawionych do oceny w cyklu habilitacyjnym stanowią podstawę do dalszych badań nad zwiększeniem skuteczności i bezpieczeństwa fotochemioterapii. Jeden z głównych kierunków planowanych badań będzie obejmował wyznaczanie parametrów molekularnych i farmakologicznych badanych fotosensybilizatorów (aminokwasowe pochodne PP IX) i ich prekursorów (ALA i jego estry), z uwzględnieniem przełożenia uzyskanych wyników na badania kliniczne. Jak dotąd, badań dotyczących farmakokinetyki fotosensybilizatorów jest stosunkowo niewiele, gdy tymczasem informacje na temat losów tych leków w organizmie mogą mieć istotne znaczenie dla ustalania schematów ich dawkowania w warunkach klinicznych.

Istotny kierunek zamierzonych badań stanowić będzie również analiza mikrośrodowiska tkanek poddawanych działaniu fotochemioterapii. Do tej analizy zostaną wykorzystane metody genomiki, transkryptomiki proteomiki oraz metabolomiki. Punktem wyjścia do tych badań jest przyjęcie nowego paradygmatu fotochemioterapii, w którym tkankę objętą procesem chorobowym, poddawaną działaniu tej procedury leczniczej, traktuje się jako twór heterogeniczny i podlegający dynamicznej zmienności pod wpływem czynników otoczenia. Podejście takie mogłoby pozwolić na wyjaśnienie obserwowanych zróżnicowań skuteczności fotochemioterapii u różnych pacjentów, wynikających najprawdopodobniej z odmienności sygnatur molekularnych komórek czy wewnątrzkomórkowej aktywności enzymów. Umożliwiłoby to indywidualne dopasowanie (personalizację) tej metody do poszczególnych pacjentów.

Interesujące byłoby również wyznaczenie molekularnych parametrów badanych fotosensybilizatorów za pomocą metod obliczeniowych chemii kwantowej. Uzyskane wyniki mogłyby umożliwić przewidywanie a priori mechanizmów oddziaływania badanych fotosensybilizatorów na poziomie molekularnym i komórkowym.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Już jako student Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, interesowałem się procesami fotochemicznymi, czego wyrazem była praca magisterska „Fotochemiczne i fotofizyczne właściwości tiokumaryny w roztworach niewodnych”, wykonana w Zakładzie Fotochemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza pod kierunkiem Pana Prof. Jana Wojtczaka. Po obronie pracy magisterskiej rozpocząłem studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego, pod kierunkiem Pani Prof. Barbary Marciniak, gdzie kontynuowałem moje zainteresowania naukowe, prowadząc badania nad kinetyką i mechanizmem fotodegradacji leków przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych w roztworach i fazie stałej, których wynikiem była rozprawa doktorska „Kinetyka i mechanizm fotodegradacji azatiopryny”. Wyniki tych badań były także prezentowane podczas naukowych konferencji w kraju oraz na 1st International Meeting on Photostability of Drugs w Oslo, jak również publikowane w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, takich jak *Analytical Chemistry (Warsaw)* (IF=0,293) w 1994, *Acta Poloniae Pharmaceutica* w 1995 oraz *Pharmazie* (IF=0,504) w 1997. Najistotniejszym wynikiem tych badań było wyznaczenie korelacji pomiędzy parametrami kinetycznymi fotodegradacji pochodnych puryny i nitroimidazolu o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym w roztworach wodnych i fazie stałej, a rozkładem gęstości ładunku elektrycznego w ich cząsteczkach, obliczonym metodami chemii kwantowej.

W latach 1995-2005, jako adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, rozszerzyłem moje zainteresowania naukowe o procesy fotobiologiczne. W tym okresie zajmowałem się badaniem wpływu pochodnych porfiry i kumaryny na stres oksydacyjny granulocytów obojętnochłonnych. Badania te prowadziłem jako koordynator 6 uczelnianych projektów badawczych, w których uczestniczyli badacze z Zakładu Anestezjologii Doświadczalnej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, jak również studenci Wydziału Farmaceutycznego tej Uczelni, wykonujący pod moim kierunkiem prace magisterskie. Najważniejszym wynikiem tych badań było stwierdzenie, że niektóre aminokwasowe pochodne PPIX, testowane jako fotosensybilizatory PDT, zarówno przed, jak i po naświetleniu promieniami UV-A ($\lambda = 365\text{nm}$, dawka energii 2.0J/cm^2), obniżały stres oksydacyjny neutrofilów stymulowanych opsonizowanym zymosanem. Nienaświetlony diazepam nasilał antyoksydacyjny efekt badanych pochodnych PPIX, natomiast po naświetleniu promieniami UV-A nie wykazywał wpływu na stres oksydacyjny neutrofilów zarówno sam, jak i w połączeniu z badanymi aminokwasowymi pochodnymi PPIX. Nie stwierdziłem również wpływu lipoprotein LDL i HDL na antyoksydacyjne działanie badanych pochodnych PPIX wobec stymulowanych granulocytów, zaobserwowałem natomiast synergistyczny antyoksydacyjny efekt 5-metoksypsoralenu w połączeniu z niektórymi pochodnymi PPIX wobec tych komórek. Wyniki tych badań były publikowane w takich czasopiśmie jak *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* (IF = 1,246) w r. 1010, *Current Topics in Biophysics* w latach 2001, 2003 i 2007 oraz w *Photodiagnosis and Photodynamic*

Therapy w r. 2006. Były one również prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych w Wiedniu (1996), Stresie, Włochy (1997), Paryżu (1998), Grenadzie, Hiszpania (1999) i Berlinie (2000).

W roku 2001 uzyskałem w drodze konkursu stypendium rządu francuskiego na pobyt naukowy w Laboratoire de Photobiologie, należącym do Muséum National d'Histoire Naturelle w Paryżu. W tym laboratorium około sto lat wcześniej Maria Skłodowska-Curie rozpoczynała swą drogę naukową. Pod kierownictwem Prof. René Santusa i Dr. Patrice'a Morlière'a zajmowałem się tam badaniem fototoksycznego działania aminokwasowych pochodnych protoporfiryny IX na komórki fibroblastów i keratynocytów *in vitro*, pod działaniem promieni UVA ($\lambda=365\text{nm}$, dawka energii $2,0\text{J/cm}^2$) i światła czerwonego ($\lambda = 645\text{-}730\text{nm}$, dawka energii $0,1\text{-}10,0\text{J/cm}^2$), w nieobecności i w obecności 5-metoksypsoralenu. Wyniki tych badań były publikowane w *Photochemistry and Photobiology* (IF = 2,054) oraz prezentowane na Międzynarodowym Kongresie Współczesnej Onkologii w Poznaniu w r. 2011 oraz na Kongresie Europejskiej Platformy Medycyny Fotodynamicznej w Połczynie-Zdroju w r. 2013.

Przez dwa lata, od r. 2005 do 2007, pracowałem w Photodynamic Therapy and Biophysics Group Prof. Johana Moana, działającej w ramach Department of Radiation Biology, wchodzącego w skład Institute for Cancer Research w The Norwegian Radium Hospital w Oslo. Moje badania w tym zespole koncentrowały się na czterech zagadnieniach:

- a) Wpływ promotorów penetracji (*penetration enhancers*), takich jak dimetylosulfotlenek (DMSO), 1-[2-(decyltio)ethylo]azacyklopentan-2-on (HPE-101), Labrafac®CC, Labrafil®, Labrasol® i Transcutol®, na wchłanianie estru metylowego kwasu 5-aminolewulinowego (MAL) w skórę myszy po podaniu miejscowym w postaci kremu.
- b) Wpływ czynników środowiska (zagęszczenie komórek, temperatura, pH, jony żelaza) na kinetykę eliminacji PPIX indukowanej za pomocą kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) w komórkach nowotworów jelita grubego *in vitro*.
- c) Farmakokinetyka PPA_{g2} w skórze myszy po podaniu dożylnym.
- d) Działanie fotodynamiczne PPA_{g2} po jednorazowym podaniu dożylnym i naświetleniu czerwonym światłem lasera ($\lambda=632\text{nm}$, dawka energii 150J/cm^2) u myszy z przeszczepionymi śródskórnymi guzami jelita grubego.

Tematy c) i d) były częściowo finansowane z programu Norwegian Cancer Society (Kreftforeningen) nr C88239. Wyniki tych badań były publikowane w *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (IF = 1,909) w r. 2006, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* w r. 2006 i 2007 oraz w *Proceedings of SPIE* w r. 2009, a także prezentowane na konferencjach naukowych w Brixen-Bressanone, Włochy (2006), Paryżu (2007) Seattle, USA (2009) i w Poznaniu (2010).

W Laboratoire de Photobiologie des Cancers w Nantes (Francja), kierowanym przez Prof. Thierry'ego Patrice'a w Centre Hospitalier Universitaire „Nord-Laënnec”, gdzie pracowałem jako visiting scientist, zajmowałem się wpływem warunków przechowywania roztworów wodnych ALA na ich zdolność indukowania PPIX w komórkach glejaka *in vitro*. Badania te wykazały, że temperatura i czas przechowywania oraz stężenie i rodzaj użytego rozpuszczalnika mają istotny wpływ na trwałość chemiczną ALA w wodzie do iniekcji, buforowanym fosforanami roztworze fizjologicznym (PBS) i podłożu RPMI do hodowli komórek, a tym samym na jego fototoksyczność względem komórek glejaka. Uzyskane wyniki sugerowały kumulowanie wpływu warunków otoczenia na fototoksyczne działanie ALA

względem komórek glejaka, a tym samym możliwość zwiększenia tego działania przez odpowiedni dobór tych warunków. Wyniki tych badań zostały opublikowane w roku 2006, w *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*.

Ogółem jestem autorem bądź współautorem 40 publikacji naukowych o łącznej mierze oddziaływania IF = 24,385 i łącznej liczbie punktów MNiSW = 278 oraz o łącznej liczbie cytowań 268, bez autocytowań – 259 (indeks Hirscha 8), wg bazy danych Web of Science na dzień 19.10.2018. W 27 pracach jestem pierwszym autorem, w 28 – korespondencyjnym, w 8 – drugim, i w jednej – ostatnim. W 16 publikacjach jestem autorem jedynym.

Jako jedyny autor opublikowałem m. in. artykuł „*Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment*”, który ukazał się w r. 2011 w ***Photochemical and Photobiological Sciences*** (IF = 2,584). W tym artykule przeglądownym omówiłem techniki celowanej terapii fotodynamicznej (*targeted photodynamic therapy* – TPDT) jako nowej strategii terapeutycznej mającej na celu ominięcie problemów stwarzanych przez konwencjonalną chemioterapię nowotworów, takich jak toksyczność leków lub ich oporność wobec tkanek nowotworowych. Wskazałem również konieczność wprowadzenia nowego paradygmatu PDT nowotworów, opartego na zrewidowanym modelu nowotworu, uwzględniającego jego heterogenność i dynamiczną zmienność wynikającą z oddziaływania składników tkanki nowotworowej z otoczeniem. W ciągu pierwszych sześciu miesięcy po opublikowaniu artykułu ten znajdował się na liście 20 najczęściej czytanych artykułów *Photochemical and Photophysical Sciences* i ciągle znajduje się na liście najczęściej czytanych publikacji tego czasopisma (129 cytowań wg Web of Science na dzień 19.10.2018).

Jestem również jedynym autorem dwóch monografii książkowych: „*Aminokwasowe pochodne protoporfiryny – działanie fotodynamiczne in vitro i in vivo*” oraz „*Jakość i bezpieczeństwo kosmetyków*”, a także jedynym autorem rozdziału „*Intradermal delivery of active cosmeceutical ingredients*” w anglojęzycznej monografii naukowej „*Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*” (red. Ryan F. Donnelly i Thakur Raghu Raj Singh), wydanej w roku 2015 przez Wiley & Sons Ltd. (Chichester, Wielka Brytania).

6. Omówienie osiągnięć dydaktycznych i w zakresie popularyzacji nauki.

Mam wieloletnie i wielorakie doświadczenie dydaktyczne: prowadzenie wykładów, seminariów, ćwiczeń audytoryjnych i laboratoryjnych, prac licencjackich i magisterskich oraz specjalizacji w dziedzinie farmacji klinicznej.

Jako pracownik naukowo-dydaktyczny Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego (dawniej Akademii Medycznej) w Poznaniu (UMP) w latach 1995-2005 byłem promotorem 16 prac magisterskich studentów farmacji, zarówno doświadczalnych, dotyczących działania pochodnych porfiryny i kumaryny na stres oksydacyjny granulocytów, jak i teoretycznych, na temat zastosowania modeli farmakokinetyczno-farmakodynamicznych w monitorowaniu farmakoterapii chorób nowotworowych, nadciśnienia tętniczego i zakażeń bakteryjnych (antybiotykoterapii). Prace te często były prezentowane na konkursach prac magisterskich Wydziału Farmaceutycznego UMP.

Prowadziłem również ćwiczenia i seminaria w dziedzinie farmacji klinicznej, farmakoterapii i biofarmacji dla studentów IV i V roku farmacji, wykłady z zakresu farmakokinetyki oraz interakcji leków z żywnością na kursach podyplomowych dla farmaceutów i pielęgniarek, a także wykłady na międzywydziałowych zajęciach fakultatywnych „*Uzależnienia-mity i fakty*” oraz „*Farmakoterapia wieku dojrzałego i podeszłego*”, dla studentów farmacji, medycyny i biologii, m. in. z tematów „*Doping w sporcie*” oraz „*Biologiczne, psychologiczne i socjologiczno-kulturowe uwarunkowania uzależnień*”.

Ponadto w latach 1989-1994 prowadziłem ćwiczenia laboratoryjne z chemii farmaceutycznej i analizy leków dla studentów III i IV roku farmacji a w latach 1988-1989 ćwiczenia obliczeniowe z matematyki i statystyki dla studentów I roku farmacji.

Obecnie (od 2011) prowadzę wykłady i ćwiczenia laboratoryjne dla studentów I i II roku studiów kosmetologii II stopnia Wyższej Szkoły Zdrowia, Urody i Edukacji w Poznaniu z następujących przedmiotów: „*Lasery w medycynie i kosmetologii*”, „*Chemiczne i fizyczne metody badań kosmetyków*” oraz „*Bezpieczeństwo i jakość kosmetyków*”.

Jestem promotorem licznych prac licencjackich i magisterskich studentów kosmetologii. Wiele z tych prac było wyróżnianych na uczelnianych konkursach prac dyplomowych. Wyniki wykonywanych pod moim kierunkiem prac magisterskich, dotyczących wpływu stosowania kosmetyków z filtrami UV na ryzyko oparzeń słonecznych oraz usuwania przebarwień skóry metodami fizycznymi (laser) i chemicznymi, były także prezentowane w postaci posterów podczas XV Konferencji Wyższej Szkoły Zdrowia, Urody i Edukacji „*Nowoczesne trendy w kosmetologii i dietetyce*”, w listopadzie 2015 roku.

Od czerwca 2010 do listopada 2014, z ramienia Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie i Studium Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu byłem opiekunem naukowym specjalizacji z farmacji klinicznej pięciorga kandydatów. Wszyscy oni w latach 2013-2014 złożyli egzamin specjalizacyjny, uzyskując tytuł specjalisty farmacji klinicznej. Wynikiem jednej z prowadzonych przeze mnie specjalizacji był artykuł „*Opieka farmaceutyczna w leczeniu nadciśnienia tętniczego*”, opublikowany w *Czasopiśmie Aptekarskim* (MNiSW = 4,0) w roku 2014.

Najważniejszym moim docenionym osiągnięciem w tym zakresie było przyznanie mi w roku 2014 przez Ministra Zdrowia Rzeczypospolitej Polskiej dyplomu z gratulacjami i podziękowaniem za opiekę nad specjalizacją osoby, która z najlepszym wynikiem w kraju złożyła Państwowy Egzamin Specjalizacyjny Farmaceutów.

Od początku mojej działalności naukowej byłem zawsze głęboko zaangażowany w popularyzację nauki. W latach 1995-2001 jako jedyny autor opublikowałem w czasopiśmie naukowych i zawodowych 11 artykułów popularnonaukowych z zakresu fotochemii, fotomedycyny, historii i dydaktyki nauk przyrodniczych oraz interakcji leków z pożywieniem. Wśród nich chciałbym zwrócić uwagę na dwa artykuły, przybliżające złożone mechanizmy procesów fotochemicznych: „*Szampański two-step, czyli o wzbudzeniu dwufotonowym*” (*Kurier Chemiczny*, 1995) oraz „*Skoki i wspinaczki elektronów, czyli o diagramie Jabłońskiego w stulecie urodzin odkrywcy*” (*Foton*, 1998).

7. Inne osiągnięcia.

- Od roku 2011 przez dwie kadencje (2011-2015 i 2016-2018) byłem członkiem kolegium redakcyjnego („editorial board member”) *World Journal of Methodology* wydawanego przez Baishideng Publishing Group w USA. W roku 2018 zostałem wybrany na III kadencję do 2021.
- Od roku 2017 jestem członkiem kolegium redakcyjnego („editorial board member”) w *Jacobs Journal of Medicinal Chemistry*, wydawanego przez Jacobs Publisher w USA.
- W roku 2010 byłem współredaktorem (co-editor) poświęconego fotomedycynie numeru specjalnego czasopisma *Advances in Pharmacological Sciences*, wydawanego przez Hindawi, w Wielkiej Brytanii.
- Za swoje znaczące osiągnięcie podoktorskie uważam czterokrotne (2012, 2014, 2016 i 2018) zdanie egzaminu i uzyskanie Certificate in Photobiology „at a PhD level” podczas European School for Photobiology w Università di Padova (Brixen-Bressanone, Włochy), w zakresie: fotofizyki, fotochemii, fotomedycyny (fotodiagnostyki i fototerapii z uwzględnieniem terapii fotodynamicznej), fotobiologii promieni UV (fotokancerogeneza, fotoimmunologia, przekazywanie sygnałów komórkowych, biosynteza witaminy D), a także fotosyntezy, fotobiologii środowiska i biologii fotoreceptorów.

Poznań, 18 listopada 2018.

dr n. farm. Andrzej M. Bugaj

dr n. farm. Andrzej M. Bugaj
specjalista farmacji klinicznej
14025921

A. M. Bugaj