

WYDZIAŁ FIZYKI, ASTRONOMII I INFORMATYKI STOSOWANEJ
&
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
UNIwersytetu Jagiellońskiego



**Badanie fotosensybilizującej efektywności
pochodnych bakteriochlorofilu *a*,
oraz mechanizmów fotogenerowania przez te
barwniki tlenu singletowego i wolnych rodników**

mgr Tomasz Oleś

Praca doktorska przygotowana
pod kierunkiem
Profesora dr hab. Józefa Mościckiego
i Profesora dr hab. Tadeusza Sarny

Kraków 2015

Serdecznie dziękuję
Panu Profesorowi Tadeuszowi Sarnie i
i Panu Profesorowi Józefowi K. Mościckiemu
za cenne uwagi, życzliwą pomoc, życzliwość i poświęcony mi czas;
Profesorowi Avigdorowi Scherzowi
oraz **Dr Iddo Pinkasowi** z Instytutu Nauki Weizmanna
za udostępnienie aparatury badawczej i pomoc
podczas mojego pobytu w Izraelu;
Ani oraz wszystkim Kolegom i Koleżankom,
szczególnie z Zakładu Biofizyki WBBiB UJ,
za okazaną pomoc i wiarę we mnie;
Rodzinie, za troskliwość wyrozumiałość i wsparcie.

Część wyników uzyskanych podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej została opublikowana w następujących pracach i czasopismach naukowych:

1. A. Scherz, W. Piedzia, T. Oles, G. Szewczyk, T. Sarna, I. Ashur, R. Goldschmidt, I. Pinkas, Y. Salomon, "Catalytic Photogeneration of Oxygen Radicals by Complexes of Pd-Bacteriochlorin with Serum Albumin", *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 130-131, (2009).
2. N. A. Aksenova, T. Oles, T. Sarna, N. N. Glagolev, A. V. Chernjak, V. I. Volkov, S. L. Kotova, N. S. Melik-Nubarov, A. B. Solovieva, "Development of novel formulations for photodynamic therapy on the basis of amphiphilic polymers and porphyrin photosensitizers. Porphyrin-polymer complexes in model photosensitized processes", *Laser Physics*, 1-8, (2012).
3. A. Kozinska, T. Oles, T. Sarna, "Photoactivation and detection of photoexcited molecules and photo chemical products", *Israel Journal of Chemistry*, 52, 745–756, (2012).

Spis treści

<i>Wykaz ważniejszych skrótów używanych w pracy</i>	9
1. Wprowadzenie	11
1.1. Terapia fotodynamiczna	13
1.2. Molekularny mechanizm działania PDT	14
1.2.1. Diagram Jabłońskiego	14
1.2.2. Fotosensybilizowane utlenianie.....	16
1.2.3. Reaktywne formy tlenu	16
1.2.3.1. Anionorodnik ponadtlenkowy i wodoronadtlenkowy	17
1.2.3.2. Nadtlenek wodoru	18
1.2.3.3. Rodnik hydroksylowy	18
1.2.3.4. Tlen singletowy.....	19
1.3. Fotosensybilizatory w PDT	19
1.4. Cechy idealnego fotosensybilizatora	20
1.5. Chlorofile i bakteriochlorofile w PDT.....	21
1.5.1. Naczyniowo skierowana terapia fotodynamiczna	23
1.5.2. WST09.....	24
1.5.3. WST11.....	25
1.6. Przegląd metod stosowanych do wyznaczania reaktywnych form tlenu oraz mechanizmu ich generowania.....	28
2. Cele pracy	33
3. Materiały i metody	35
3.1. Stosowane odczynniki chemiczne.....	35
3.2. Techniki badawcze.....	38
3.2.1. Spektroskopia UV/VIS	38
3.2.1.1. Widma absorpcji	38
3.2.1.2. Ocena stopnia fotodegradacji	38
3.2.2. Pomiary fluorescencji.....	38
3.2.3. Oksymetria EPR	39
3.2.4. Pułapkowanie Spinowe	40
3.2.5. Czasowo rozdzielcza detekcja fosforescencji tlenu singletowego w 1270nm	42

3.2.6.	Laserna fotoliza błyskowa	45
3.2.7.	Pomiary w warunkach beztlenowych i po nasyceniu tlenem	49
3.2.8.	Analiza niepewności	49
4.	Wyniki.....	51
4.1.	Opis własności fizycznych.....	52
4.1.1.	Właściwości spektralne.....	52
4.1.1.1.	Wpływ polarności na absorpcję	52
4.1.1.2.	Właściwości spektralne w środowisku wodnym.....	53
4.1.1.3.	Wpływ BSA na absorpcję WST11	55
4.1.1.4.	Proces fotodegradacji WST11	56
4.1.2.	Femto- i pikosekundowa fotoliza błyskowa z WST11	61
4.1.2.1.	Pikosekundowa fotoliza błyskowa dla WST11 w środowisku hydrofobowym	62
4.1.2.2.	Pikosekundowa fotoliza błyskowa w środowisku wodnym.....	64
4.1.2.3.	Wpływ BSA na stany przejściowe obserwowane w piko-sekundowej laserowej fotolizie błyskowej	65
4.1.3.	Nano- i mikrosekundowa laserowa fotoliza błyskowa z WST11	67
4.1.3.1.	Środowisko MeOH i TX-100	67
4.1.3.2.	Środowisko wodne	68
4.1.3.3.	Nano- i mikrosekundowa fotoliza błyskowa dla WST11 w obecności BSA.....	69
4.1.3.4.	D ₂ O i tabela podsumowująca.....	72
4.1.4.	Rozdzielczo czasowa detekcja tlenu singletowego przy 1270nm.....	74
4.1.4.1.	Generowanie tlenu singletowego w PBS i D ₂ O(PBS)	74
4.1.4.2.	Wydajność kwantowa generowania ¹ O ₂ (¹ Δ _g) w różnych środowiskach	79
4.1.4.3.	Wpływ lokalnego stężenia tlenu na wydajności generowania ¹ O ₂ (¹ Δ _g).....	80
4.1.4.4.	Wpływ BSA na fotogenerację tlenu singletowego	81
4.1.4.5.	Wyznaczenie stałych gaszenia ¹ O ₂ dla NADH i NaN ₃	82
4.1.5.	Pomiary fotokonsumpcji tlenu	83
4.1.5.1.	Konsumpcja tlenu indukowana naświetlaniem WST11 w środowisku wodnym	83
4.1.5.2.	Fotokonsumpcja tlenu dla WST11 w środowisku micelarnym.....	85
4.1.5.3.	Wpływ BSA na fotokonsumpcję tlenu z WST11	86
4.1.6.	Identyfikacja wolnych rodników metodą pułapkowania spinowego.	88
4.1.7.	Fluorescencja tryptofanu	94
4.2.	Wyniki otrzymane dla STL3009 i STL4009.....	95

4.2.1.	Właściwości spektralne.....	95
4.2.2.	Femto- i piko-sekundowa fotoliza błyskowa	98
4.2.3.	Nano- i mikro-sekundowa laserowa fotoliza błyskowa.....	102
4.2.4.	Czasowo rozdzielcza detekcja fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm ..	104
4.2.5.	Fotokonsumpcja tlenu indukowana naświetlaniem STL3009 i STL4005.....	107
4.2.6.	Pułapkowanie spinowe.....	110
4.2.7.	Pomiary fluorescencyjne.....	112
5.	Dyskusja.....	115
5.2.	WST11.....	115
5.1.1.	Właściwości fotofizyczne WST11.....	115
5.1.2.	Stabilność wzbudzonego stanu trypletowego i jego oddziaływanie z tlenem	121
5.1.3.	Zdolność WST11 do generowania tlenu singletowego.....	124
5.1.4.	Fotogenerowanie wolnych rodników przy udziale WST11.....	127
5.1.5.	Podsumowanie mechanizmu fotosensybilizowanego utleniania WST11.....	131
5.1.6.	Uwagi końcowe.....	136
5.2.	STL3009 i STL4005	139
5.2.1.	Własności fotofizyczne STL3009 i STL4005	139
5.2.2.	Stabilność wzbudzonego stanu trypletowego i jego oddziaływanie z tlenem	141
5.2.3.	Zdolność do generowania reaktywnych form tlenu.....	141
5.2.4.	Podsumowanie wyników otrzymanych dla STL3009 i STL4005	142
6.	Wnioski końcowe	145
7.	Summary (in English)	147
8.	Literatura.....	149

Wykaz ważniejszych skrótów używanych w pracy

$^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$	tlen singletowy
A	absorpcja
APDT	antybakteryjna terapia fotodynamiczna
BSA	albumina surowicy wołu, z ang. bovine serum albumin
D ₂ O	ciężka woda
DMPO	N-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny
DMSO	sulfotlenek dimetylu
EPR	elektronowy rezonans paramagnetyczny; elektronowy rezonans spinowy
F	fluorescencja
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HO ₂ [•]	rodnik wodoronadtlenkowy
HSA	albumina z ludzkiej surowicy, z ang. human serum albumin
IC	konwersja wewnętrzna
IR	promieniowanie podczerwone (z ang. infrared)
ISC	konwersja międzysystemowa/ przejście interkombinacyjne
mHCTPO	N-tlenek-4-wodoro-3-karbamilo-2,2,5,5-tetradeuterometylo-3-piroliny
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
O ₂ ^{•-}	anionorodnik ponadtlenkowy
P	fosforescencja
PBS	buforowana sól fizjologiczna, z ang. phosphate buffered saline
PBS (D ₂ O)	buforowana sól fizjologiczna w D ₂ O
Pd-Bchl	pallado-bakteriochlorofil
PDT	terapia fotodynamiczna, z ang. photodynamic therapy
RB	róż bengalski
RFT/ROS	reaktywne formy tlenu, z ang. reactive oxygen species
STL3009	Pd-bakteriofeoforbid o grupach aminoetylowych przy węglach C13 i C17
STL4005	Pd-bakteriofeoforbid o grupie karboksylowej i N-(aminopropylo)-aminopropyloj-aminokarbonylowej przy węglach C13 i C17
Tiron	sól disodowa 1,2- dihydroksybenzeno-3,5-disulfonianu
TPPS4	5,10,15,20- tetra-(4-sulfofenylo)porfiryna
TX-100/PBS	Triton X-100 w PBS
VTP	naczyniowo skierowana terapia fotodynamiczna, z ang. vascular targeted photodynamic therapy
WD	woda destylowana
WST09	pallado-bakterioforbid (Pd-Bpheid)
WST11	di-potasowa sól pallado-bakterioforbidu (Pd-Bpheid)

1. Wprowadzenie

Skuteczna walka z chorobami nowotworowymi jest wyzwaniem numer jeden współczesnej medycyny. Do najczęściej stosowanych obecnie metod ich leczenia zalicza się chirurgię, chemio- i radioterapię. W niektórych przypadkach wykorzystywana jest również hormonoterapia, terapia genowa, krioterapia i immunoterapia. Pomimo tylu różnych możliwości walki z nowotworami, praktycznie żadna z nich nie jest idealna. Najczęściej stosowane leczenie operacyjne jest inwazyjne, kosztowne i nie zawsze gwarantuje całkowite usunięcie chorej tkanki. Inne terapie, choć często skuteczne, niosą ze sobą duże ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek. Najlepszym tego przykładem jest chemioterapia, która wprawdzie efektywnie niszczy komórki guza, czyni to jednak kosztem spustoszenia w całym organizmie. Dodatkowym niekorzystnym czynnikiem większości z wymienionych terapii jest długi i uciążliwy czas rekonwalescencji po ich zakończeniu. Inną wysoce skuteczną metodą jest terapia hadronowa/jonowa, która charakteryzuje się brakiem większości skutków ubocznych. Niestety jej koszty i dostępność czynią ją praktycznie nieosiągalną dla większości pacjentów. Nic dziwnego, że nauka i medycyna wciąż poszukują nowej, efektywnej, selektywnej, mało inwazyjnej, ale też i taniej alternatywy dla skutecznego i względnie bezpiecznego leczenia. W ostatnich latach pojawiła się nowa metoda, którą można określić jako światełko w tunelu. To „światło” można potraktować dosłownie, gdyż chodzi o terapię fotodynamiczną (ang. Photodynamic Therapy, PDT), gdzie główną rolę odgrywa promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu 600-900nm, którego energia zostaje zaabsorbowana przez cząsteczki tzw. fotosensybilizatora (fotouczulacza), który oddziałując z tlenem cząsteczkowym lub donorami, względnie akceptorami elektronu, uruchamia kaskadę procesów powodujących efekt fototoksyczny.

Główną przewagą PDT nad konwencjonalnymi metodami leczenia nowotworów jest jej duża wybiórczość, osiągana przez preferencyjną akumulację w miejscach chorobowych nietoksycznego w ciemności fotosensybilizatora, a następnie selektywne naświetlanie schorzenia. Takie podejście minimalizuje uszkodzenia w zdrowej tkance. Innymi atutami PDT jest stosunkowo mała inwazyjność, która ogranicza się do precyzyjnego doprowadzenia

światłowodów w ściśle określone miejsce. Nasuwa się pytanie – jeżeli terapia ta posiada tyle zalet i przewag nad konwencjonalnymi metodami walki z rakiem, to dlaczego ich jeszcze nie wyparła? Otóż ze względu na nowatorskość metody wciąż istnieją nierozwiązane do końca problemy w jej stosowaniu.

Zniszczenie patogenicznej tkanki uzależnione jest od wywołania odpowiednio silnego efektu fototoksycznego w miejscu występowania guza. W tym celu fotosensybilizator powinien charakteryzować się selektywną kumulacją w tkance nowotworowej, wysoką wydajnością generowania reaktywnych form tlenu oraz intensywną absorpcją w obszarze 600-900nm, w którym nie absorbują związki endogenne, natomiast penetracja tkanki jest największa. Obecnie stosowane fotouczulacze ciągle nie są doskonałe. Niska absorpcja przy długich falach oraz ograniczona selektywność kumulacji wymuszają stosowanie wysokich ich stężeń. Powoduje to odkładanie się związku w innych partiach ciała, a w konsekwencji, trwającą nawet tygodniami nadwrażliwość na promienie słoneczne.

Dlatego prowadzone są ciągłe poszukiwania nowych związków fotosensybilizujących, które posiadałyby optymalną kombinację wyżej wymienionych właściwości. W ostatnich latach zainteresowano się chlorofilami oraz bakteriochlorofilami, których korzystniejsze parametry fizykochemiczne oraz fotochemiczne czynią je potencjalnymi następcami stosowanych do tej pory porfiryń. W szczególności pallado-podstawione pochodne bakteriochlorofilu, które charakteryzują się biokompatybilnością, intensywną absorpcją przy 750nm, oraz wysoką wydajnością generowania reaktywnych form tlenu, wydają się być atrakcyjnymi fotosensybilizatorami o potencjalnym zastosowaniu w PDT. Istotną trudność stanowi jednak ich stosunkowo mała stabilność, co utrudnia uzyskanie odpowiedniej akumulacji w tkance. Przełom nastąpił, gdy zmieniła się koncepcja wykorzystania tych fotosensybilizatorów i celem terapii stało się zniszczenie naczyń krwionośnych odżywiających guz, a nie jak dotychczas, bezpośrednio komórek nowotworowych. Wywołane reakcje fototoksyczne prowadzą do powstania zakrzepów, okluzji lub zniszczenia naczyń wokół guza. W konsekwencji, nowotwór zostaje odcięty od dopływu tlenu i substancji odżywczych a to prowadzi do jego nekrozy i obumarcia. Grupa prof. Avigdora Scherza z Instytutu Nauki Weizmana w Izraelu, wykorzystła hydrofilową Pd-pochodną bakteriochlorofilu *a* -WST11, która w przeciwieństwie

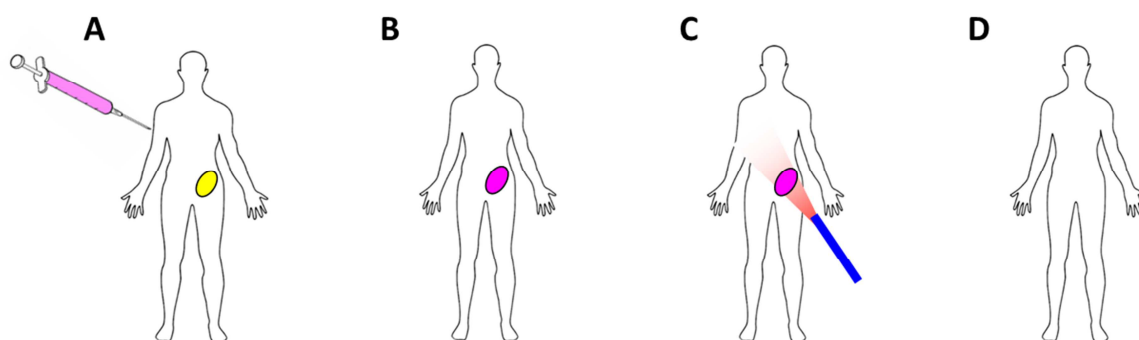
do dotychczas stosowanych fotosensybilizatorów, nie wnika w komórki lecz pozostaje w krwioobiegu. Dzięki temu fotouczulacz nie akumuluje się w tkankach, co drastycznie skraca czas rekonwalescencji, natomiast reakcje fototoksyczne są ściśle ograniczone do miejsca naświetlania.

W okresie ostatniego roku została pozytywnie zakończona III faza badań klinicznych z zastosowaniem WST11 przeciw rakowi prostaty. Wstępne badania pokazały, że WST11 można stosować z powodzeniem w procesie leczenia nowotworów litych oraz innych schorzeń dotyczących nadmiernej waskularyzacji, jak wysiękowa forma starczego zwyrodnienia plamki żółtej (AMD). Pomimo wielu badań, postulowany molekularny mechanizm działania tego fotosensybilizatora, który zakłada wyłącznie wolnorodnikową drogę fotosensybilizowanego utleniania, wciąż budzi wiele pytań i kontrowersji. Niniejsza praca ma stanowić przyczynek do uzyskania odpowiedzi na niektóre z nich.

1.1. Terapia fotodynamiczna

Wykorzystanie energii promieniowania słonecznego w celach leczniczych sięga czasów egipskich [1]. Jednak za narodziny tematyki związanej z terapią fotodynamiczną uważa się początek wieku XX [2]. Ponad 100 lat temu Niels Finsen odkrył, że naświetlanie światłem czerwonym przynosi pozytywne wyniki w leczeniu ospy [3]. Podejście to nazwał „fototerapią”, za co kilka lat później otrzymał Nagrodę Nobla. W roku 1903 kilka niezależnych grup w Europie odkryło, iż kombinacja światła z niektórymi związkami chemicznymi może prowadzić do śmierci komórek [4]. Zjawisko to opisali jako „akcję fotodynamiczną” (z ang. „Photodynamic action”), a całą koncepcję nazwali później **terapią fotodynamiczną (PDT)**. PDT jest metodą leczenia, w której w wyniku interakcji trzech czynników: fotosensybilizatora – molekuly, światła i tlenu, dochodzi do utworzenia reaktywnych form tlenu (RFT), których toksyczne działanie prowadzi do zniszczenia (patogennych) komórek i tkanek. Z uwagi na to, że żaden z tych czynników oddzielnie nie jest toksyczny, natomiast RFT generowane są tylko w obszarze naświetlania i charakteryzują się stosunkowo krótkim czasem życia, a efekty fotocytotoksyczne są ograniczone zarówno przestrzennie jak i czasowo, taka metoda leczenia jest wyjątkowo selektywną i skuteczną. Uproszczony schemat przebiegu terapii przedstawiono na Rys.1.

Fotosensybilizator, może być podawany dożylnie, śródtkankowo lub w postaci maści. Podczas gdy ze zdrowych komórek fotosensybilizator usuwany jest w ciągu kilku godzin, w tkance nowotworowej pozostaje znacznie dłużej [5]. Przyczyną jest prawdopodobnie charakterystyka szybko namnażających się komórek nowotworowych, które potrzebując do budowy dużych ilości cholesterolu i lipoprotein przy okazji akumulują w sobie fotouczulacz. Dodatkowy udział przypisuje się nieprawidłowo funkcjonującemu systemowi limfatycznemu w obrębie miejsc chorobowo zmienionych [6]–[8]. W terapii preferowane są fale dłuższe, które umożliwiają lepszą penetrację tkanki. Źródłami światła w PDT są głównie lasery, których światło doprowadzane jest światłowodami do okolic guza [9]. Mechanizm powstawania reakcji fotochemicznych opisano w następnym podrozdziale.



Rys.1 Schemat przebiegu terapii fotodynamicznej. **(A)** Fotosensybilizator (kolor fioletowy na rysunku) zostaje wprowadzony do organizmu. **(B)** W miarę upływu czasu fotosensybilizator selektywnie gromadzi się w patogenicznej tkance (schematycznie oznaczona owalem). **(C)** Leczony obszar naświetlany jest długością fali dostosowaną do absorpcji stosowanego fotosensybilizatora; wynikiem jest powstanie reaktywnych form tlenu o cytotoksycznym działaniu dla komórek w obszarze naświetlania. **(D)** W konsekwencji terapii PDT następuje obumarcie i nekroza tkanki.

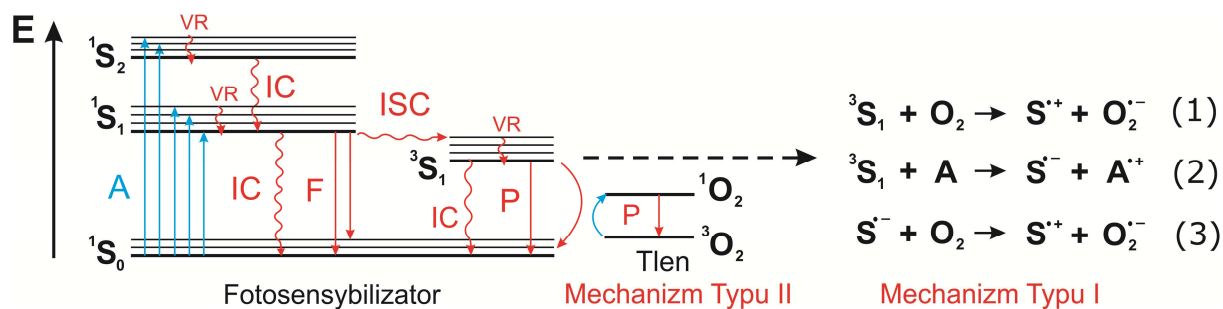
1.2. Molekularny mechanizm działania PDT

1.2.1. Diagram Jabłońskiego

Molekularny mechanizm działania PDT najłatwiej wytłumaczyć w oparciu o diagram Jabłońskiego tj. graficzny schemat stanów kwantowych cząsteczki [10] (Rys.2). Bezpośrednio po **zaabsorbowaniu fotonu (A)** cząsteczka (w przypadku PDT - fotosensybilizator) przechodzi z podstawowego stanu singletowego 1S_0 do jednego z wibracyjnych poziomów **wzbudzonych**

stanów singletowych (na Rys.2 oznaczono je jako 1S_1 , 1S_2). Proces ten zachodzi bardzo szybko, w czasie rzędu $\sim 10^{-15}$ s. Następnie w procesie **relaksacji wibracyjnej (VR)** oraz **konwersji wewnętrznej (IC)**, nadmiar energii jest uwalniany w wyniku tłumienia drgań lub zmiany fazy drgań. Prowadzi to do przejścia elektronu do najniższego stanu wibracyjnego danego wzbudzonego podstawowego stanu singletowego (proces zachodzi w skali czasowej 10^{-14} – 10^{-12} s).

Cząsteczka znajdująca się we wzbudzonym stanie 1S_1 może oddać swą energię i powrócić do stanu podstawowego 1S_0 na trzy sposoby. W **konwersji wewnętrznej** nadmiar energii uwalniany jest bezpromieniście na drodze oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalnika lub otoczenia. Inną drogę stanowi **fluorescencja (F)** – promieniste przejście do stanu podstawowego z emisją fotonu o energii odpowiadającej różnicy energii pomiędzy obu stanami. Proces ten jest stosunkowo szybki (10^{-10} - 10^{-6} s) i zależy od budowy cząsteczki oraz od mikrośrodowiska, w którym się znajduje. Krótki czas życia wzbudzonego stanu singletowego powoduje, iż rzadko bierze on bezpośredni udział w reakcjach chemicznych. Najciekawszym procesem z punktu widzenia terapii fotodynamicznej, jest **przejście interkombinacyjne (lub międzysystemowe, ICS)** ze wzbudzonego stanu singletowego do **wzbudzonego stanu trypletowego** (3S_1). Podczas tego przejścia następuje zmiana multipletowości, co czyni ten proces „wzbronionym”, czyli mało prawdopodobnym, jednak gdy energie między poziomami są niewielkie lub stany te nakładają się, prawdopodobieństwo procesu wzrasta. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, w wyniku relaksacji wibracyjnej, elektron osiąga pierwszy wzbudzony stan trypletowy (3S_1). Przejście cząsteczki do stanu 1S_0 wiąże się ze zmianą multipletowości, czyniąc je formalnie zabronionym. Sumarycznie wydłuża to czas życia wzbudzonego stanu trypletowego. Typowy czas życia 3S_1 jest w granicach 10^{-6} - 10^{-3} s, co wystarcza, żeby energia wzbudzenia została wykorzystana w procesach prowadzących do zmian chemicznych otoczenia bądź samego fotosensybilizatora, a w szczególności może prowadzić do powstania reaktywnych form tlenu w procesie fotosensybilizowanego utleniania [11]. Innymi procesami prowadzącymi do dezaktywacji wzbudzonego stanu trypletowego są: bezpromienista konwersja wewnętrzna, w wyniku której energia oddana jest otoczeniu w postaci ciepła oraz **fosforescencja** z emisją fotonu.



Rys.2 Diagram Jabłońskiego połączony mechanizmem fotosensybilizowanego utleniania. Symbole na rysunku oznaczają: 1S_0 – stan podstawowy cząsteczki S, 1S_1 – wzbudzony stan singletowy cząsteczki, 3S_1 – wzbudzony stan trypletowy cząsteczki; VR – relaksacja wibracyjna, E – energia; A – absorpcja; IC – konwersja wewnętrzna; F – fluorescencja, ISC – przejście międzysystemowe, P – fosforescencja, 3O_2 – cząsteczka tlenu w stanie podstawowym trypletowy, 1O_2 – tlen singletowy.

1.2.2. Fotosensybilizowane utlenianie

Fotosensybilizatory mogą generować reaktywne formy tlenu pod wpływem zaabsorbowanego promieniowania świetlnego. Wyróżniamy dwie drogi fotosensybilizowanego utleniania. W **Mechanizmie Typu I** (Rys.2) ma miejsce jednoelektronowe utlenienie fotosensybilizatora (1) lub jednoelektronowe utlenienie donora elektronu przez wzbudzony stan trypletowy fotosensybilizatora (2), który później oddziałuje z tlenem (3). Bezpośrednim produktem tych reakcji jest najczęściej anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$). W **Mechanizmie Typu II** (Rys.2) ma miejsce transfer energii ze stanu wzbudzonego trypletowego fotosensybilizatora na stan podstawowy trypletowy tlenu, co prowadzi do powstania wzbudzonej formy tlenu – tlenu singletowego (1O_2) (Rys. 2). Stosunek udziału obu mechanizmów zależy od wielu czynników, takich jak: budowy i formy występowania cząsteczki fotosensybilizatora, dostępu do tlenu, pH środowiska, polarności i stałej dielektrycznej otoczenia. Powstałe w obu procesach produkty należą do większej grupy związków określanej nazwą **reaktywnych form tlenu** (RFT).

1.2.3. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu są produktami kolejnych stopni redukcji cząsteczki tlenu. Jest to bardzo heterogenna grupa jeśli chodzi o reaktywność chemiczną i czas życia, jednak na ogół RFT charakteryzują się większą reaktywnością w stosunku do tlenu w stanie podstawowym.

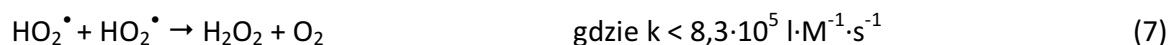
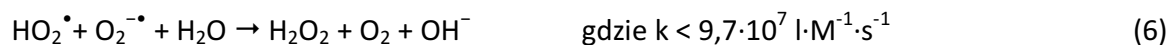
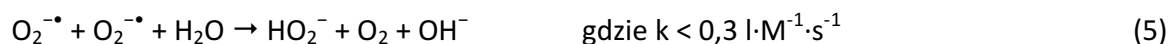
Można do nich zaliczyć między innymi: tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodoronadtlenkowy ($\text{HO}_2^\bullet$), rodnik hydroksylowy ($^\bullet\text{OH}$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), tlenek azotu, rodniki alkoksylowe i nadtlenuk. Najważniejsze z nich omówiono poniżej.

1.2.3.1. Anionorodnik ponadtlenkowy i wodoronadtlenkowy

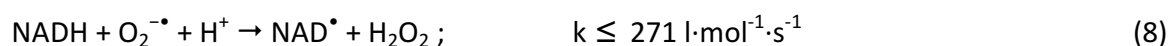
Bezpośrednim produktem mechanizmu Typu I (fotosensybilizowanego utleniania) jest **anionorodnik ponadtlenkowy**. W środowisku wodnym pozostaje on w równowadze ze swoją uprotonowaną formą – **rodnikiem wodoronadtlenkowym** (4). Stała dysocjacji dla tej reakcji wynosi (pK) wynosi około 4,8, co oznacza, że dla biologicznego pH, stężenie formy zdysocjowanej jest zdecydowanie dominujące.



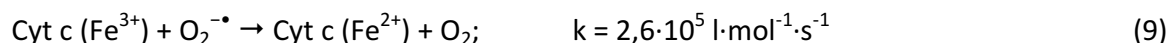
Rodniki mogą reagować między sobą w reakcjach dysmutacji, prowadząc do utlenienia jednego rodnika a redukcji drugiego (5-7). Zaznaczona poniżej stała k oznacza stałą reakcji.



Dysmutacja anionorodnika ponadtlenkowego w roztworach wodnych zachodzi najszybciej przy pH = 4,8, co także odpowiada pK dysocjacji rodnika $\text{HO}_2^\bullet$. Stąd też w roztworach nie zawierających protonów, jakimi są roztwory alkaliczne i aprotyczne (np. sulfotlenek dimetylu) $\text{O}_2^{\bullet-}$ jest stosunkowo trwałe. Anionorodnik ponadtlenkowy może być zarówno reduktorem jak i utleniaczem. I tak, może utleniać substancje takie jak adrenalina albo dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), gdzie produktem jest H_2O_2 (8).



W reakcji, w której $\text{O}_2^{\bullet-}$ jest reduktorem, produktem jest tlen cząsteczkowy (np. reakcja z dla cytochromem c) (9)



Anionorodnik ponadtlenkowy nie jest jednak zbyt reaktywny wobec składników komórek. Będzie wykazywał reaktywność w stosunku do związków zawierających grupy tiolowe, z kolagenem, substancjami redukującymi jak askorbinian, (NADH), a także z w reakcjach redukcji jonów metali przejściowych na wyższym stopniu utlenienia (Fe^{3+} , Cu^{2+}). Jego ujemny ładunek utrudnia mu natomiast przenikanie przez błony i co więcej, nie jest zdolny inicjować niebezpiecznego dla komórek procesu peroksydacji lipidów. Nie posiadający ładunku rodniak wodoronadtlenkowy, może swobodnie przebywać w fazie lipidowej. Dodatkowo, jego wyższa wartość potencjału oksydacyjno-redukcyjnego pozwala mu atakować nienasyconych kwasów tłuszczowych i inicjować peroksydację lipidów [12].

1.2.3.2. **Nadtlenek wodoru**

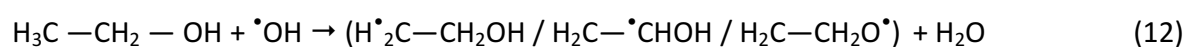
Z powyższych reakcji (6,7,8) wynika, że tam gdzie generowany jest anionorodnik, będzie też występował **nadtlenek wodoru**. Ta stosunkowo stabilna reaktywna forma tlenu jest dość dobrym utleniaczem, szczególnie w stosunku do grup tiolowych, ale także indolowych, imidazowych, fenolowych, tioestrowych [13]. Rola nadtlenu wodoru ujawnia się dopiero w obecności metali przejściowych, podczas tzw. reakcji Fentona [14], gdzie jest substratem kolejnej bardzo reaktywnej formy tlenu, **rodnika hydroksylowego**:



Anionorodnik ponadtlenkowy może tu pełnić tu rolę reduktora jonu żelaza.

1.2.3.3. **Rodnik hydroksylowy**

Rodnik hydroksylowy posiada bardzo wysoki potencjał oksydacyjno-redukcyjny, co czyni go silnym utleniaczem. Jego wysoka reaktywność wobec większości składników komórkowych powoduje, iż jest mało specyficzny. Jest w stanie oderwać atom wodoru od alkanów i pochodnych (12) lub ulega addycji do wiązań podwójnych jak to widać w poniższej reakcji [15]:



1.2.3.4. Tlen singletowy

Produktem mechanizmu Typu II fotosensybilizowanego utleniania jest **tlen singletowy**. Istnieją jego dwie postacie – tlen singletowy typu *delta* $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, oraz tlen singletowy typu *sigma* $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$. Drugi z nich charakteryzuje się wyższą energią i reaktywnością, jednak krótki czas jego życia minimalizuje prawdopodobieństwo jego bezpośredniego udziału w reakcji chemicznej. Znacznie częściej ulega konwersji do bardziej stabilnego tlenu $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Tlen singletowy charakteryzuje się krótkim czasem życia w wodzie, podczas gdy w środowisku hydrofobowym czas ten ulega wydłużeniu. Powoduje to, iż w błonach ta reaktywna forma tlenu może dyfundować na większe odległości i może również zapoczątkować bardzo niebezpieczną dla żywej komórki łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów. Dzięki tym właściwościom, tlen singletowy uważany jest za główną reaktywną formą tlenu odpowiedzialną za efekt fotodynamiczny w terapii PDT. W białkach, najbardziej podatne na uszkodzenia wywołane $^1\text{O}_2$ są reszty aminokwasowych: tryptofan, histydyny, tyrozyny, metioniny i cysteiny.

1.3. Fotosensybilizatory w PDT

Pierwszymi fotosensybilizatorami w PDT, tzw. fotosensybilizatorami pierwszej generacji, były pochodne hematoporfiryny, głównego barwnika krwi [4], [16], [17]. Związki te charakteryzują się korzystnymi parametrami fizykochemicznymi, a więc przede wszystkim posiadają silną absorpcję w świetle widzialnym, trwałość cząsteczki, niską toksyczność w ciemności oraz wydajnie generują RFT podczas naświetlania. Badania wstępne wykazały zwiększoną akumulację tych związków w komórkach nowotworowych w stosunku do komórek zdrowych. Naświetlanie w tkance w obecności nowotworu indukowało nekrozę i procesy apoptotyczne [18], [19]. Pomimo tego działania, próby kliniczne wykazały niewystarczająco wysoką akumulację związku, aby umożliwić efektywną i selektywną terapię z ich użyciem [20]. Aktywacja tych fotosensybilizatorów wymaga użycia stosunkowo krótkofalowego promieniowania, co utrudnia penetrację tkanki.

W ciągu ostatniej dekady, wraz zatwierdzeniem do zastosowań klinicznych nowych fotosensybilizatorów, takich jak Photofrin®, Photosan®, Photoheme®, HpD®, Levulan®,

Vsudyne®, czy mTHCP, wzrosło zastosowanie i zainteresowanie terapią fotodynamiczną. Wymienione leki z sukcesem zostały wykorzystane w leczeniu stanów przedrakowych, zlokalizowanych między innymi w obrębie jamy ustnej, przewodu pokarmowego, a także w leczeniu raka pęcherza moczowego, raka przełyku, płuca, szyjki macicy oraz raka skóry [21]–[28]. Ponadto, z powodzeniem stosuje się je w terapii zwyrodnienia plamki żółtej oka (AMD) [29], [30].

Pomimo zaawansowanego rozwoju i ciągłego postępu w PDT, wciąż nie udało się w pełni wykorzystać potencjalnych możliwości tej metody. Przyczynami są:

- nieoptymalne właściwości absorpcyjne dopuszczonych klinicznie fotosensybilizatorów, które pozwalają stosować je tylko przy powierzchniowych lub niewielkich nowotworach,
- nie wystarczająco specyficzna akumulacja fotosensybilizatorów w docelowej tkance, co podczas naświetlania skutkuje w uszkodzeniu również zdrowych komórek,
- długi czas retencji fotosensybilizatora w zdrowych tkankach, np. w skórze prowadzi do długiego i nieprzyjemnego dla pacjenta czasu rekonwalescencji.

1.4. Cechy idealnego fotosensybilizatora

Brak satysfakcjonujących rezultatów z zastosowaniem dopuszczonych klinicznie fotosensybilizatorów motywował grupy badawcze do dalszego poszukiwania nowych związków. W tym celu sformułowano wymienione poniżej kryteria, które powinien spełniać potencjalnie optymalny fotosensybilizator [18], [31].

- i) Powinien być **czysty chemicznie**, co pozwoli na powtarzalność wyników badań.
- ii) Powinien posiadać **wysoki współczynnik absorpcji (ekstynkcji) przy długościach fali powyżej 650 nm**; przyjmuje się, iż „okno zabiegowe” w terapii fotodynamicznej rozciąga się między 650-850 nm. Poniżej tego zakresu, penetracja światła w tkance jest stosunkowo słaba oraz istnieje możliwość wzbudzenia niektórych endogennych składników komórkowych w naświetlanej tkance. Natomiast powyżej tego zakresu,

energia wzbudzenia fotosensybilizatora staje się zbyt niska aby efektywnie oddziaływać z tlenem [2], a ponadto światło jest intensywnie absorbowane przez wodę [32].

- iii) Musi charakteryzować się **wysoką wydajnością generowania reaktywnych form tlenu**. Uważa się, iż tlen singletowy pełni kluczową rolę w reakcjach PDT [17], [33]–[35], jednak zdania są podzielone i szczególnie w ostatnich latach spekuluje się na temat dużego znaczenia wolnych rodników w terapii fotodynamicznej [36], [37].
- iv) **Nie może być toksyczny** w ciemności oraz powinien być **szybko metabolizowany lub usuwany** z organizmu.
- v) Powinien posiadać odpowiednią **stabilność**, która z jednej strony umożliwi przeprowadzenie terapii, a z drugiej strony nie spowoduje długoczasowej akumulacji związku w zdrowych tkankach.
- vi) Wymagana jest **selektywność i odpowiednia lokalizacja**, co oznacza, że fotosensybilizator powinien gromadzić się w obrębie tkanki patogenicznej oraz blisko kluczowych struktur komórkowych, umożliwiając wywołanie pożądanego efektu cytotoksycznego.

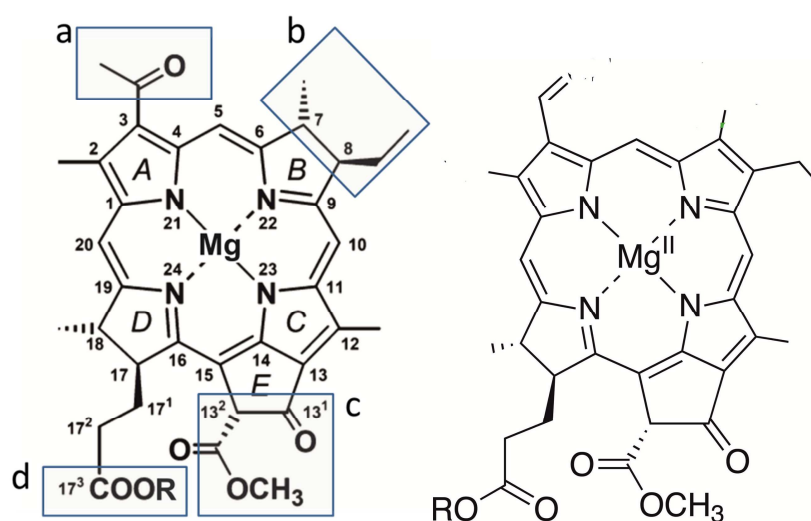
1.5. Chlorofile i bakteriochlorofile w PDT

Ewolucja nie bez powodu wybrała grupę chlorofili (Chl) i bakteriochlorofili (BChl) jako kolektory i konwertery światła w procesie fotosyntezy. Cząsteczki te zbudowane są z cyklicznego tetrapirołu zawierającego charakterystyczny izocykliczny, pięcioczłonowy pierścień (Rys. 3). W centrum pierścienia znajduje się jon metalu, najczęściej – magnezu [38]. Ta budowa tworzy układ elektronów π odpowiedzialny za właściwości spektralne tych związków, tzw. pasmo Soreta (zlokalizowane w zakresie 300-400nm) oraz pasma Q_x i Q_y (zlokalizowane w zakresie 600-800nm) [38]–[40]. Z punktu widzenia terapii fotodynamicznej, szczególnie atrakcyjny jest wysoki współczynnik ekstynkcji przy długich falach, czyli w paśmie Q_y [38]. Wykazano, iż chlorofile i bakteriochlorofile cechuje wysoka wydajność generowania RFT. Czyste Chl i BChl nie spełniają części wymienionych wyżej kryteriów; są związkami wysoce niestabilnymi, natomiast hydrofobowy fitol utrudnia ich aplikację i lokalizację w komórkach nowotworowych.

Aby zwiększyć stabilność, oraz poprawić własności fotofizyczne i fotochemiczne Chl i Bchl, wykonano szereg modyfikacji chemicznych.

Pierwszym krokiem była hydroliza niewygodnego długiego fitolu [41], [42]. Dalsze modyfikacje otrzymanego w ten sposób chlorofilidu pozwoliły na uzyskanie wielu wydajnych fotosensybilizatorów. Jednak ze względu na lepsze własności spektroskopowe, w centrum zainteresowania znalazły się pochodne bakteriochlorofii [35]. Co więcej, okazało się, że zamiana centralnego metalu w cząsteczce bakteriofeoforbidu - BChl pozbawionego fitolu i centralnego metalu - diametralnie zmienia własności fotofizyczne i fotochemiczne związku [43], [44]. Podczas gdy wzbudzone niklo- i miedzio-pochodne ulegają szybkiej, bezradiacyjnej konwersji wewnętrznej do stanu podstawowego nie wykazując fotochemicznej aktywności, magnezo-, cynko- i ruteno-, rodo-, europio-, pallado-pochodne charakteryzują się wysoką wydajnością przejścia międzysystemowego i są wysoce fotoaktywne [43], [45]. Dalsze modyfikacje tak otrzymanych cząsteczek obejmowały zmiany w czterech miejscach cząsteczki (na Rys.3 oznaczono je literami a,b,c,d). W szczególności pokazano, iż hydroliza lub otwarcie izocyklicznego pierścienia przy węglu C13, oraz zamiana podstawników na bardziej hydrofilowe przy C17, pozwoliło otrzymać fotosensybilizatory o właściwościach z potencjalnym zastosowaniem w terapii fotodynamicznej [46].

Pomimo obiecujących wyników fizykochemicznych, badania z zastosowaniem pochodnych Bchl w konwencjonalnym PDT, gdzie naświetlanie następuje po kilku godzinach od podania fotosensybilizatora, wykazały ich stosunkowo słabą akumulację w komórkach nowotworowych oraz znikomy efekt fototoksyczny [17], [47]. Okazało się, że fotosensybilizatory te słabo wnikają w komórki, natomiast pozostają w krwioobiegu. Fakt ten wykorzystano w nieco innym podejściu terapii fotodynamicznej – **naczyniowo skierowanej PDT** [48].



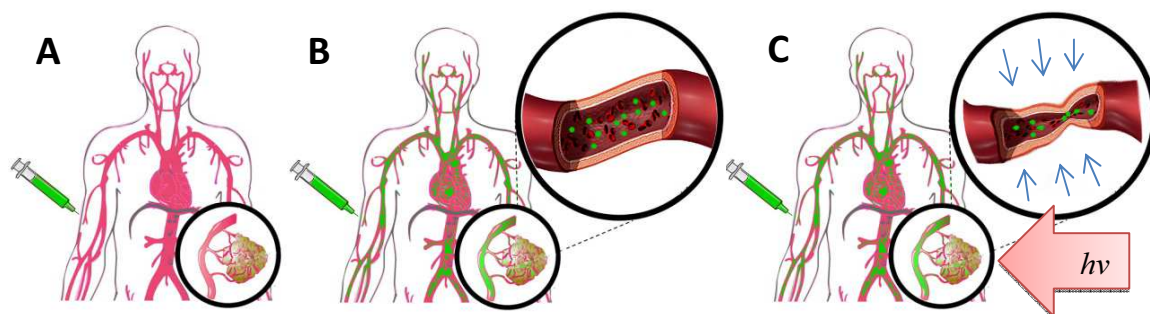
Rys.3 Wzór strukturalny bakteriochlorofilu a (po lewej) i chlorofilu a (po prawej). Częsteczka BChl jest ponumerowana zgodnie z obowiązującą nomenklaturą [38]. Jako R oznaczono fitol.

1.5.1. Naczyniowo skierowana terapia fotodynamiczna

Naczyniowo skierowana terapia fotodynamiczna (VTP) wykorzystuje zjawiska fotosensybilizowanego utleniania, ale w odróżnieniu od konwencjonalnej PDT skierowana jest przeciw naczyniom krwionośnym oplatającym guz, a nie przeciw samym komórkom nowotworu [49]–[52] (Rys.4). Jednym z podejść jest stosowanie hydrofobowych fotosensybilizatorów, które wnikają w komórki/błony komórek endotelialnych naczyń krwionośnych guza. Generowane w czasie naświetlania RFT, głównie tlen singletowy, niszczy naczynia krwionośne, odcinając patogenną tkankę od dopływu substancji odżywczych i tlenu, a to w konsekwencji prowadzi do jej nekrozy [53], [54].

W ostatnich latach opracowano alternatywne, bardziej skuteczne podejście w VTP. Zastosowano amfifiliczne fotosensybilizatory będące różnymi pochodnymi bakteriochlorofilu [46], [55], [56], które nie wnikają do komórek endotelialnych, lecz pozostają w krwioobiegu. Stąd generowanie RFT jest ograniczone do środowiska hydrofilowego osocza [5], [49], [57]–[59]. Efekt fototoksyczny powoduje powstanie zatorów, zakrzepów i okluzji naczyń krwionośnych, co skutkuje obumieraniem tkanki nowotworowej [16], [60], [61]. Molekularny

mechanizm VTP wciąż nie jest całkowicie poznany, jednak przyjętą się pogląd, iż środowisko wodne może sprzyjać generowaniu wolnych rodników [62].



Rys.4 Schemat przebiegu/działania naczyniowo skierowanej terapii fotodynamicznej. **(A)** Podany lek, fotosensybilizator, **(B)** jest tak zaprojektowany, aby nie wnikać do komórek ale pozostawać w krwioobiegu. **(C)** Naświetlanie chorego obszaru prowadzi do okluzji i zamknięcia się naczyń, co w konsekwencji powoduje nekrozę tkanek (Wykorzystano grafikę z [63], którą przerobiono do własnych celów).

1.5.2. WST09

Szczególną uwagę poświęcono pallado-pochodnym bakteriochlorofilu α . Wykazano bardzo wysoką wydajność tworzenia wzbudzonego stanu trypletowego przez te związki [64], a także ich stosunkowo wysoką stabilność. Najprostszą cząsteczką jest Pd-bakteriofeoforbid, WST09. W wodzie tworzy agregaty z głównym pasmem absorpcji w zakresie 820-900nm, podczas gdy w obecności lipidów lub miceli monomeryzuje, z pasmem absorpcji przy 760nm [46]. Jego wysoki współczynnik absorpcji przy 760nm, $\epsilon_{760\text{nm}} = 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, umożliwia wydajne wzbudzenie go w tkance. Pierwsze badania pokazały, że WST09 jest wysoce fototoksyczny dla komórek rakowych i endotelialnych [65], [66].

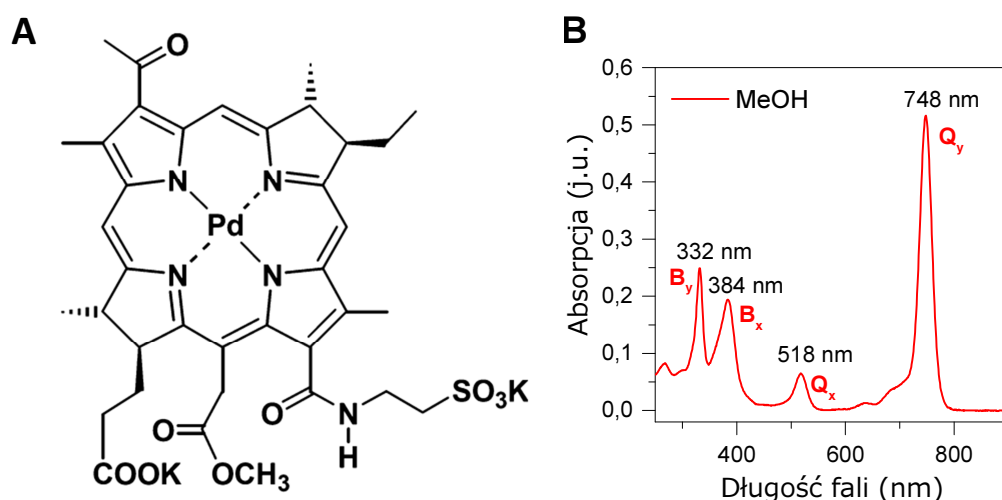
Wyniki pomiarów fizykochemicznych, wskazują na silną zależność typu procesu fotosensybilizowanego utleniania od środowiska, w którym on przebiega [62]. O ile w otoczeniu hydrofobowym barwnik ten charakteryzował się wysoką wydajnością kwantową generacji tlenu singletowego, z niewielkim udziałem rodników tlenowych, to w środowisku hydrofilowym, gdzie wprowadzany był po micelizacji z Cremophore EL, w dużej mierze przeważał I Typ fotosensybilizowanego utleniania, z generacją zarówno anionorodnika nadadtlenkowego jak i rodnika hydroksylowego [62]. Dalsze badania pokazały, że właściwości

tego fotosensybilizatora będą bardziej skuteczne do niszczenia naczyń krwionośnych, niż samych komórek nowotworowych [65].

WST09 zastosowano w naczyniowo kierowanej terapii fotodynamicznej guzów litych. Badania przedkliniczne guza łitego C6 szczurzego glejaka [65], raka okrężnicy [67], raka oskrzeli [68], raka płaskonabłonkowego [69], oraz raka prostaty [70], [71], wykazały wysoki procent remisji tkanki nowotworowej. WST09 zakończył również pozytywnie I i II fazę badań klinicznych. Jednak z powodu opracowania nowego, lepiej przystosowanego do VTP fotosensybilizatora – WST11, zaprzestano dalszych badań nad tą pochodną.

1.5.3. WST11

Inkubacja WST09 z tauryną i KH_2PO_4 w DMSO prowadzi do otrzymania nowego, hydrofilowego fotosensybilizatora – dwupotasowej soli pallado-bakterioforbidu, WST11 (Rys. 5), znanego też pod nazwami Stakel, Tookad® Soluble, Padelipofrin [46], [55], [56]. Związek ten posiada szereg zalet czyniących go godnym następcą WST09, oraz kandydatem na bliski ideału fotosensybilizator do zastosowań w VTP. Jest to związek hydrofilowy o ujemnym ładunku, wobec czego nie wymaga micelizacji przed jego aplikacją. Jest nietoksyczny dla organizmu, natomiast jego szybkie usuwanie z organizmu (w ciągu zaledwie kilku godzin) zmniejsza prawdopodobieństwo ubocznych efektów fototoksycznych [46], [56], [72]. W przeciwieństwie do swojego poprzednika, WST11 nie wnika do komórek endotelialnych i jego działanie jest ograniczone do wnętrza naczynia krwionośnego [73]. Z punktu widzenia konwencjonalnej terapii PDT jest to wada, jednak przy VTP wręcz przeciwnie – pozwala to zwiększyć selektywność metody [70], [74]. Ponadto, wysoki współczynnik absorpcji przy 747nm ($\epsilon = 1,2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Rys.5) pozwala na głęboką penetrację tkanki oraz wykorzystanie fotosensybilizatora przy leczeniu większych nowotworów. Następnym atutem tego fotosensybilizatora jest jego wysoka wydajność tworzenia trypletu oraz generowania reaktywnych form tlenu [37]. Praktyczną zaletą WST11 jest stosunkowo prosta, wydajna i tania synteza. BChl *a* otrzymuje się z bakterii *Rhodovulum sulfidophilum*, a WST11 – na drodze hydrolizy, podmienienia centralnego jonu magnezu palladem oraz aminolizy pierścienia izocyklicznego [75] [76].



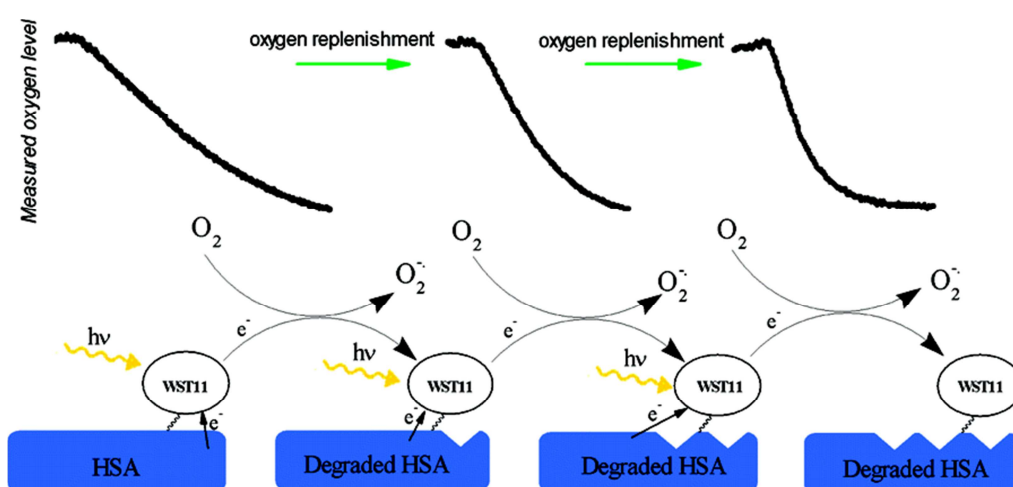
Rys.5. (A) Wzór strukturalny WST11. **(B)** Widmo absorpcji WST11 w MeOH (badania własne).

WST11 wykazuje wysoką skuteczność fotodynamiczną. Fotosensybilizator znalazł zastosowanie w naczyniowo skierowanej terapii przeciw raka prostaty. W ciągu ostatniej dekady, pozytywnie zakończono badania z WST11 na zwierzętach [77] oraz wszystkie trzy fazy badań klinicznych na pacjentach [51], [52], [78], [79].

Ponadto trwają próby kliniczne nad wykorzystaniem WST11 w VTP w walce z nowotworami przewodów żółciowych [80] i niedrobnokomórkowym rakiem płuc [81]. Związek ten mógłby być zastosowany do leczenia poddołkowej neowaskularyzacji w starym zwyrodnieniu plamki [82] oraz raka nerek. Inne badania pokazały, że WST11 wywołuje reakcje prowadzące do stwardnienia rogówki i sugeruje się wykorzystanie tego procesu w leczeniu stożka rogówki [83].

Molekularny mechanizm działania WST11 przedstawiono w pracy Ashura i kolegów [37]. Postulowano, że w wodzie, gdzie fotosensybilizator występuje w postaci mieszaniny monomerów, dimerów i oligomerów [46], generowane są wyłącznie wolne rodniki. Po wprowadzeniu do krwioobiegu oddziaływanie WST11 z ludzką surowiczą albuminą (HSA) powoduje rozerwanie agregatów związku i utworzenie niekowalencyjnych kompleksów z białkiem. Postulowano, iż ta para działa jak aktywowana światłem oksydoreduktaza, która katalizuje transfer elektronu z proteiny na cząsteczkę tlenu (Rys. 6). Sugerowano, iż jedna cząsteczka kompleksu WST11-HSA może przekazać na tlen cząsteczkowy nawet 15 elektronów, zanim kompleks ulega całkowitej degradacji (Rys. 6). W efekcie powstają anionorodniki

ponadtlenkowe, z których powstają inne reaktywne formy tlenu, w szczególności rodniki hydroksylowe. Ponadto wykluczono możliwość powstawania tlenu singletowego. Produkcji RFT towarzyszy konsumpcja tlenu, za którą jest odpowiedzialny anionorodnik ponadtlenkowy. Natomiast efekt okluzji naczyń przypisano działaniu wygenerowanego przez kompleks WST11-HSA wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego. Jeden z modeli przewiduje, że elektron dostarczony na cząsteczkę tlenu pochodzi z WST11, które następnie pobiera elektron z cząsteczki HSA. W innym modelu elektron jest dostarczany bezpośrednio przez cząsteczka białka, a WST11 jest tylko fotoaktywowanym katalizatorem [84].



Rys.6 Schemat postulowanego mechanizmu działania skompleksowanego z albuminą WST11. W wyniku naświetlania, cząsteczka WST11 przekazuje elektron na cząsteczkę tlenu, prowadząc do powstania anionorodnika ponadtlenkowego. Następnie elektron z cząsteczki białka redukuje WST11 do jego stanu podstawowego. Przedstawionemu procesowi towarzyszy konsumpcja tlenu, która jest wynikiem oddziaływania cząsteczki białka z anionorodnikiem ponadtlenkowym [37].

1.6. Przegląd metod stosowanych do wyznaczania reaktywnych form tlenu oraz mechanizmu ich generowania

Postęp, szczególnie w naukach biologicznych i medycznych zależy od istnienia i dostępności metod, którymi jesteśmy w stanie zbadać interesujący nas problem czy zagadnienie. Zastosowanie niewłaściwej metody, np. pośredniej, nieselektywnej lub niewystarczająco czułej, może prowadzić do niepoprawnych założeń lub wniosków. Istotne jest więc śledzenie rozwoju metod badawczych, a także specyfiki każdej z nich i dokonywanie wyboru tych, które dostarczą najwięcej informacji o badanym zagadnieniu i pozwolą zrozumieć oraz wytłumaczyć zachodzące zjawiska.

Fotofizyka i fotochemia fotosensybilizatorów to dziedziny nauki, które ze względu na ich złożoność oraz szybkość zachodzących procesów, wymagają odpowiednio czułych i specyficznych metod badawczych. Podstawowe procesy fizyczne zachodzące podczas wzbudzenia molekuly, można z powodzeniem badać metodami bezpośrednimi. Tak więc do badania właściwości absorpcyjnych i emisyjnych związków używa się odpowiednio spektroskopii absorpcyjnej i fluorymetrii. Bardziej zaawansowanych urządzeń wymagają czasowo-rozdzielcze badania tych zjawisk, szczególnie gdy zachodzą w czasie rzędu $10^{-12} - 10^{-3}$ s. Wówczas, niezbędne stają się czułe detektory o niezwykle szybkiej odpowiedzi, a także precyzyjne impulsowe źródła światła. Rejestracja zmian absorpcji w czasie, która jest możliwa dzięki zastosowaniu laserowej fotolizy błyskowej pozwala na charakterystykę stanów przejściowych związku, generowanych po jego wzbudzeniu krótkim impulsem światła, zwykle laserowego. Podobnie zastosowanie lasera impulsowego, jako źródła światła wzbudzającego, sprzężonego z wydajnym fotopowielaczem lub kamerą CCD umożliwia pomiar kinetyk zaniku fluorescencji lub fosforescencji związku.

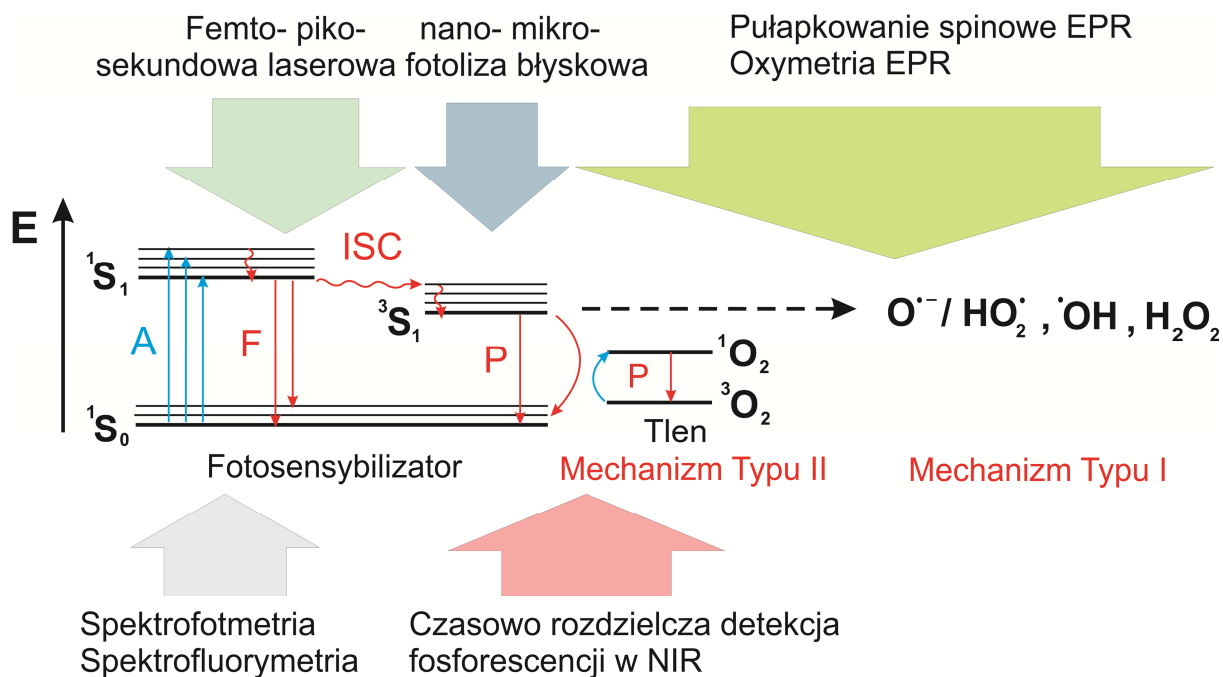
Wykrywanie reaktywnych form tlenu jest bardziej złożonym procesem, z powodu ich krótkiego czasu życia i często niewielkiego stężenia w próbce. Dodatkowym problemem jest brak bezpośrednich, czułych metod do wykrywania większości RFT. Wyjątkiem jest tlen singletowy, dla którego jedną z najczulszych i najbardziej specyficznych metod detekcji jest czasowo-rozdzielcza detekcja jego charakterystycznej fosforescencji przy 1270 nm. Czułość metody w dużej mierze zależy od układu pomiarowego, z którego się korzysta [85]. Niestety nie

dysponujemy bezpośrednimi i czułymi metodami do wykrywania wolnych rodników [15]. Z tego względu w badaniu mechanizmów ich powstawania skazani jesteśmy na metody pośrednie. Warto jednak zaznaczyć, że wybór dostępnych metod pośrednich jest bardzo duży i pozwala na analizowanie różnych aspektów fizykochemii wolnych rodników. Zwykle, w wyniku reakcji chemicznej lub oddziaływania fizycznego znacznika, pułapki spinowej lub substancji chemicznej z reaktywną formą tlenu powstaje produkt o charakterystycznych właściwościach, które można zmierzyć spektrofotometrycznie [86], spektrofluorymetrycznie [87], metodami elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR; *ang.* Electron Paramagnetic Resonance) [88] bądź przez rozdział na wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC; *ang.* high-performance liquid chromatography) [89], [90]. Do tej grupy należą znaczniki fluorescencyjne [91], które są szczególnie atrakcyjne ze względu na różnorodność, jak i brak potrzeby wyrafinowanego sprzętu do wykonania pomiaru. Jednak metody, w których stosuje się znaczniki fluorescencyjne, pomimo że często są wyjątkowo czułe, charakteryzują się ograniczoną specyficznością i używanie ich prowadzi często do obarczonych dużym błędem wyników [92]. Kolejną czułą i powszechnie stosowaną metodą detekcji reaktywnych form tlenu jest pułapkowanie spinowe EPR, gdzie w wyniku reakcji pułapki spinowej z danym rodnikiem powstaje addukt spinowy o charakterystycznym (dla danego rodnika) widmie [88]. Metoda ta, w zależności od użytej pułapki spinowej, jest dość specyficzna i czuła, jednak wymaga bardzo kosztownej aparatury. Warto też wspomnieć o detekcji anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji redukcji ferricytochromu *c* (pomiar spektrofotometryczny). Cenną i czułą metodą badawczą stosowaną przy analizie wydajności i tempa generowania reaktywnych form tlenu jest pomiar fotokonsumpcji tlenu. Można tego dokonać za pomocą specjalnych sond i elektrod tlenowych, pomiarów kolorymetrycznych albo poprzez zastosowanie specjalnego znacznika spinowego, który pod wpływem zmian stężenia tlenu w badanym układzie zmienia parametry swojego widma EPR [93].

W niniejszej rozprawie doktorskiej zdecydowano się użyć kilku komplementarnych metod badawczych, które pozwoliłyby lepiej zrozumieć mechanizm działania badanych fotosensybilizatorów - pochodnych bakteriofioforbidu *a* - w wybranych układach modelowych. Kierowano się przydatnością metody, jej czułością oraz specyficznością, jednak w niektórych przypadkach wybór był uwarunkowany dostępem do aparatury badawczej. Na Rys.7

przedstawiono poglądowo wybrane metody w zależności od mierzonej wielkości fizycznej i badanego procesu.

Podstawowe pomiary absorpcyjne i spektrofluorymetryczne przeprowadzono na aparaturze pomiarowej dostępnej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (WBBiB UJ) [94]. Badanie wzbudzonych stanów przejściowych fotosensybilizatorów oraz ich zmian w czasie wykonano za pomocą układów do ultra-szybkiej laserowej fotolizy błyskowej w Instytucie Weizmanna. Aparatura tam dostępna charakteryzuje się najnowszą, unikatową technologią i wyjątkową czułością, natomiast otwarty system pozwala na dowolne dostosowanie układu do badanej próbki. Do detekcji fotogenerowanego tlenu singletowego wykorzystano metodę bezpośrednią, poprzez pomiar rozdzielczej czasowo fosforescencji tlenu singletowego przy 1270 nm. W tym celu wykorzystano indywidualnie zaprojektowany zaawansowany i najwyższej klasy układ pomiarowy dostępny na WBBiB UJ. System ten działa w modzie zliczania pojedynczych fotonów, składa się z wydajnego lasera impulsowego sprzężonego z fotopowielaczem czułym w podczerwieni, co pozwala na wykrycie nawet śladowej produkcji tlenu singletowego. Dodatkowo, układ pozwala na obserwację zaniku fosforescencji samego fotosensybilizatora. Ze względu na brak bezpośrednich metod pozwalających na czułe wykrywanie wolnych rodników, zdecydowano się na jedną z najlepiej przystosowanych do tego celu metod pośrednich, pułapkowanie spinowe EPR. Jako pułapkę spinową użyto N-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny (DMPO), ze względu na brak zadowalających wyników przy zastosowaniu innych dostępnych pułapek spinowych, takich jak DEPMPO (ang. 2-Diethylphosphono-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide) oraz BMPO (ang. 5-tert-Butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide) (wyników nie pokazano w pracy). W celu identyfikacji reaktywnych form tlenu wykorzystano szereg specyficznych wygaszaczy i zmiataczy poszczególnych reaktywnych form tlenu. Do oceny tempa i efektywności generowanych reaktywnych form tlenu użyto metodę oksymetrii EPR z użyciem N-tlenek-4-wodoro-3-karbamyl-2,2,5,5-tetradeuterometylo-3-piroliny (mHCTPO), jako znacznika spinowego. W chwili obecnej jest to jedna z najczulszych metod pozwalająca na rejestrację zmian stężenia tlenu w badanym układzie.



Rys.7 Poglądowy schemat wybranych metod badawczych stosowanych w pracy doktorskiej. Przy wyborze kierowano się przydatnością, czułością i specyficznością metody. Symbole na rysunku oznaczają: 1S_0 – stan podstawowy cząsteczki fotosensybilizatora (S), 1S_1 – wzbudzony stan singletowy cząsteczki, 3S_1 – wzbudzony stan trypletowy cząsteczki; E – energia; A – absorpcja; F – fluorescencja, ISC – przejście międzysystemowe, P – fosforescencja, 3O_2 – cząsteczka tlenu w stanie podstawowym trypletowy, 1O_2 – tlen singletowy, NIR – bliska podczerwień

2. Cele pracy

Celem niniejszej pracy było szczegółowe zbadanie własności fotofizycznych i fotochemicznych WST11 oraz wyjaśnienie mechanizmu fotosensybilizowanego utleniania wybranych substratów w wodzie, w obecności i pod nieobecność BSA.

Dodatkowym celem badań opisanych w pracy była analiza własności fotofizykochemicznych nowych pochodnych Pd-Bakteriochlorofilu – STL3009 i STL4005, jako fotosensybilizatorów o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej.

Dla osiągnięcia zamierzonych celów, należało zrealizować następujące **zadania badawcze**:

- zbadać własności fotofizycznych WST11 w zależności od mikrośrodowiska;
- wyznaczyć zdolność WST11 do fotogenerowania tlenu singletowego i wolnych rodników w wybranych układach modelowych i różnych warunkach doświadczalnych;
- sprawdzić wpływ kompleksowania fotosensybilizatora przez BSA na jego efektywność fotosensybilizującą;
- zbadać własności fotofizyczne fotosensybilizatorów STL3009 i STL4005 w zależności od mikrośrodowiska i porównać otrzymane wyniki do lepiej poznanego WST11;
- przeanalizować zdolność generowania wolnych rodników oraz tlenu singletowego przez fotosensybilizatory STL4005 i STL3009 w wybranych układach modelowych ;
- sprawdzić powinowactwa nowych fotosensybilizatorów do BSA oraz wpływu białka na ich fotoreaktywność;

3. Materiały i metody

3.1. Stosowane odczynniki chemiczne

- Stosowane **odczynniki** posiadały klasę czystości co najmniej cz. d. a. (czysty do analizy) i pochodziły z następujących źródeł:

- Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska: chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), dwuwodorofosforan (V) potasu (KH_2PO_4), wodorofosforan (V) sodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), wodorotlenek sodu (NaOH), żel krzemionkowy.

- Przedsiębiorstwo przemysłowo-handlowe „Standard”, Lublin, Polska: kwas solny (35-38% HCl), nadtlenuk wodoru (30% H_2O_2), chloroform, metanol (MeOH).

- Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy: żywica chelatująca (Chelex-100), woreczki dializacyjne ($\approx 12000\text{u}$), albumina wołowa (BSA), katalaza z wątroby wolej, róż bengalski, Eter p-1,1,3,3-tetrametylobutylofenylowo polietylenoglikolowy – Triton X-100 (TX-100), azyd sodu (NaN_3), EtOH, Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), Toluen.

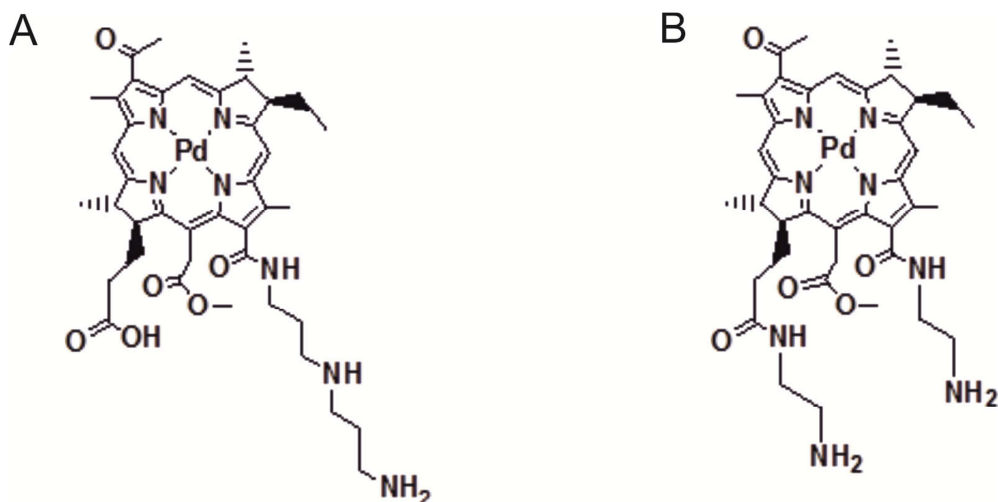
- Znacznik spinowy mHCTPO (N-tlenek-4-wodoro-3-karbamilo-2,2,5,5-tetradeuterometylo-3-piroliny) otrzymano dzięki uprzejmości Prof. H.J. Halperna (University of Chicago, Chicago, IL, USA).

- Wodę destylowaną (podwójnie destylowaną) otrzymano dzięki uprzejmości Dra Andrzeja Żądło (WBBiB UJ).

- Badane **Fotosensybilizatory**:

Fotosensibilizator **WST11** (Rys. 5) otrzymano w formie proszku od Steba Biotech [75], dzięki uprzejmości Prof. Avigdora Scherza.

W ramach współpracy z grupą Profesora Scherza, otrzymano również dwie nowe i dotąd nieprzebadane, rozpuszczalne w wodzie pochodne bakteriofioforbidu (zsyntetyzowano i oczyszczono przez Dra Alexandra Brandisa z Instytutu Weizmanna). Pierwsza, fotosensybilizator **STL3009**, posiada podstawnik karboksylowy przy węglu C13 oraz grupę N-(aminopropilo)-aminopropilo]-aminokarbonylową przy węglu C17, co sumarycznie daje ładunek neutralny cząsteczki (Rys.8(A)). Druga, **STL4005**, jest dodatnio naładowana i posiada dwie grupy aminoetylowe (przy węglach C13 i C17) (Rys.8(B)).



Rys.8 Wzory strukturalne fotosensybilizatorów: **(A)** STL3009 i **(B)** STL4005.

• Oczyszczanie DMPO

Dostarczane przez firmę Sigma Aldrich DMPO zawiera znaczną ilość zanieczyszczeń paramagnetycznych, więc wymagało dodatkowego oczyszczenia. 1g DMPO rozpuszczano w 5ml podwójnie destylowanej wody. Następnie, przez 15 minut, wytrząsano wodny roztwór z 5ml toluenu. Roztwór wirowano i odebrano frakcję toluenu. Czynność powtórzono trzykrotnie. Następnie odebrano frakcję wodną do probówek typu Eppendorf i wytrząsano z węglem aktywnym (0,09g : 1,5ml roztworu DMPO). Po odwirowaniu odebrano nadsącz do nowych probówek Eppendorf i powtórzono czynność wytrząsania i wirowania z węglem aktywnym. Zebrany supernatant przesączono przez sączek (0,22µm), a następnie spektrofotometrycznie wyznaczono stężenie DMPO (przyjmując, że w roztworze wodnym dla $\lambda=228\text{nm}$ współczynnik ekstynkcji pałapki wynosi $7200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [95]). Oczyszczone DMPO przechowywano w probówkach Eppendorf w -20°C .

• Przygotowanie buforów

PBS - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej o pH 7,4: Na 5l wody (woda dejonizowana przez system milipore (Milipore S.A. 67120 Molsheim, Francja)) rozpuszczano 1g KCl; 1g KH_2PO_4 ; 40g NaCl i 14,45g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. W celu pozbycia się metali, w przygotowanym buforze umieszczano woreczek dializacyjny z Chelexem (ok 3 g) i inkubowano przez ok 48h na mieszadle magnetycznym. pH buforu doprowadzano do $\approx 7,4$ poprzez dodawanie stężonego kwasu solnego. Bufor był przechowywany w chłodni. Przed pomiarami odbierano potrzebną porcję do probówek typu Falcon 50ml.

Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej **D₂O(PBS)** o pD=7,4 (pD można wyznaczyć odczytując pH na pH-metrze i biorąc poprawkę : $\text{pD} = \text{pH} + 0,4$ [96]) Z uwagi na higroskopijność ciężkiej wody, podczas przygotowywania buforu, podjęto wszelkie kroki w celu zniwelowania kontaktu z powietrzem, mogącym zawierać parę wodną. Między innymi każde użyte naczynie było 15min przedmuchiwane azotem. Przygotowano pięciokrotnie stężony roztwór D₂O-PBS: Do kolby 100ml odsypano 1g KCl, 1,29g

KH_2PO_4 , 8,20g NaCl i 0,0216g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. D_2O uzupełniono do kreski i rozpuszczono składniki buforu. Tak przygotowany bufor przechowywano w szczelnie zamkniętej buteleczce wraz z Chelexem (przygotowanym i przepłukany w D_2O). Do wszystkich pomiarów w ciężkiej wodzie rozcieńczano ten bufor pięć razy w D_2O (w razie potrzeby, przeprowadzono korektę pD używając DCl).

Używane naczynia były przepłukiwane 0,1M kwasem solnym (otrzymanym poprzez rozcieńczenie 35-38% HCl), wodą po chelexie oraz metanolem. Suszenie następowało pod azotem gazowym. Przed pomiarami wysuszone kuwety były przedmuchiwane strumieniem sprężonego powietrza.

- **Przygotowanie miceli TX-100**

Zawiesinę miceli otrzymano poprzez dodanie 0,5% Tritonu X-100 (TX-100) do roztworu badanego fotosensybilizatora w buforze (PBS lub $\text{PBS}(\text{D}_2\text{O})$) a następnie delikatne wytrząsanie (na wytrząsarce BioMix WL-2Ep) tak przygotowanej próbki. Niewielka ilość detergentu przeciwdziała powstawaniu agregatów badanych fotouczulaczy. I tak, dla WST11 zaledwie 0,2% TX-100 wystarczyło, aby całkowicie rozbić agregaty, natomiast dla pozostałych fotosensybilizatorów, STL4005 i STL3009, potrzeba było około 0,4% detergentu. W eksperymentach tu opisywanych i omawianych stosowano 0,5% TX-100.

- **Przygotowywanie próbek WST11, STL3009 oraz STL4005**

WST11 posiada dobrą rozpuszczalność w wodzie [46]. Próbki o stężeniu 2-5mM WST11 przygotowywano odpowiednio w wodzie destylowanej, buforze PBS, D_2O , $\text{PBS}(\text{D}_2\text{O})$ – w zależności od eksperymentu. Po odważeniu potrzebnej ilości czystego WST11 i dodaniu rozpuszczalnika próbkę wytrząsano przez 5 minut w ciemności. Ostateczne stężenie próbki wyznaczano z równania *Lamberta-Beera* ($A = k \cdot c \cdot l$; gdzie A jest absorbancją próbki, c – stężeniem substancji w próbce, l – grubością warstwy absorbującej [97]) wiedząc, że współczynnik ekstynkcji WST11 przy 747nm w MeOH wynosi $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [46].

Próbki STL3005 i STL4005 przygotowano w wodzie destylowanej lub dejonizowanej w stężeniu 1-2mM. Końcowe stężenie próbki wyznaczano z równania Lamberta-Bera zakładając, że współczynnik ekstynkcji tych fotosensybilizatorów w paśmie Q_y w MeOH wynosi $\sim 1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (informacja własna: Dr Brandis, z Weizmanna).

Badane fotosensybilizatory wykazują słabą rozpuszczalność w środowiskach polarnych. W przypadku pomiarów wykonywanych w metanolu i acetonie do stosowanych rozpuszczalników organicznych dodawano niewielką objętość stężonej próbki wodnego roztworu WST11, STL3009 lub STL4005.

Ze względu na małą stabilność fotosensybilizatorów w roztworze, próbki na potrzeby eksperymentu przygotowywano z proszku składowanego w -20°C . Podczas eksperymentu próbki przygotowanych związków przetrzymywano w ciemności na lodzie.

- **Przygotowywanie kompleksu WST11/STL3009/STL4005 - BSA**

Kompleks WST11 z BSA powstaje w ciągu kilku sekund po zmieszaniu składników w środowisku wodnym, bez względu na kolejność dodawania ich do roztworu. W przypadku STL3009 i STL4005 proces był wolniejszy i stan równowagi otrzymano po odczekaniu 30min.

3.2. Techniki badawcze

3.2.1. Spektroskopia UV/VIS

3.2.1.1. Widma absorpcji

Pomiary widm absorpcji wykonano na spektrofotometrze Hewlett Packard 8453 o rozdzielczości 1nm, w zakresie 190-1100nm. W większości przypadków badane próbki umieszczano w kwarcowych kuwetach spektrofotometrycznych firmy Hellma o drodze optycznej 10mm. Niektóre widma absorpcji w badaniach właściwości spektralnych wybranych fotosensybilizatorów oraz widma absorpcji próbek używanych podczas pomiarów femto- i nanosekundowej fotolizy błyskowej wykonano w kuwetach kwarcowych (Starna Scientific) o drodze optycznej 2 i 4mm, przy użyciu spektrofotometru Thermo Scientific-Evolution 300 UV-VIS.

3.2.1.2. Ocena stopnia fotodegradacji

Pomiar fotodegradacji fotosensybilizatorów wykonano poprzez rejestrację ich widm absorpcji po określonym czasie naświetlania wiązką laserową o parametrach: długość fali: 532nm, częstotliwość: 10kHz, energia impulsu: 8μJ (Pulselas-P-1064-FC, Alphalas GmbH, Goettingen, Germany). Naświetlana próbka była umieszczona w kuvecie kwarcowej (droga optyczna 10mm, Hellma) i nieprzerwanie mieszana podczas eksperymentu przy użyciu mieszadła magnetycznego (mieszadło magnetyczne do mieszania cieczy w kuwetach 10mm/10mm - Thermo Scientific™ Cimarec™ i Mini Stirrers). Przed pomiarem kształt wiązki był optymalizowany tak, aby pokrywać maksymalną objętość próbki (1,5ml) w kuvecie.

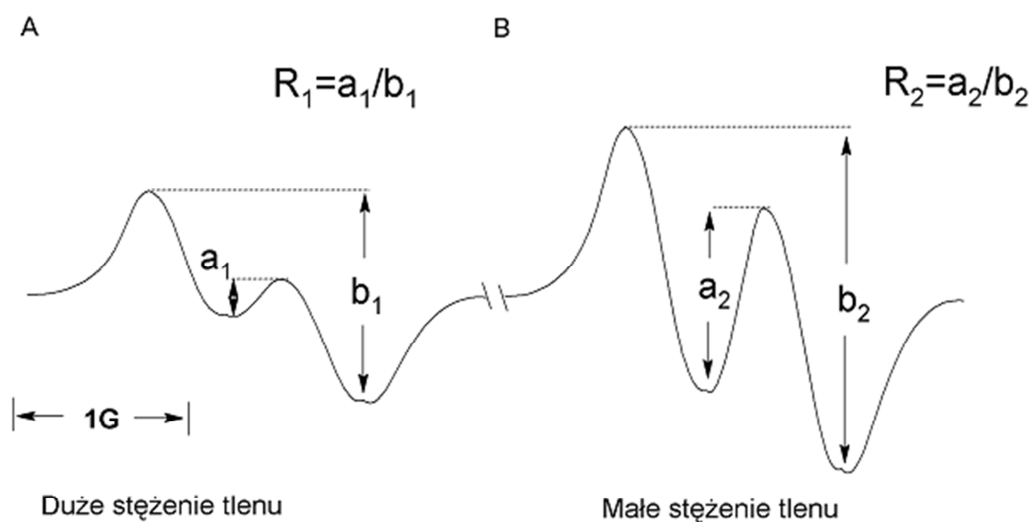
3.2.2. Pomiary fluorescencji

Widma emisji i wzbudzenia fluorescencji zarejestrowano w temperaturze pokojowej w kuwetach kwarcowych o drodze optycznej 10mm (Helma) przy użyciu spektrofluorymetru Fluorolog 3 (Horiba, Jobin Yvon S.A.S., Longjumeau, Francja). Szczeliny wzbudzania i emisji spektrofluorymetru podczas pomiarów dla fotosensybilizatorów w rozpuszczalniku były ustawione odpowiednio na 10 i 10mm oraz dla pomiarów fluorescencji tryptofanu na 5 i 5mm.

3.2.3. Oksymetria EPR

Pomiar tempa konsumpcji tlenu indukowanej światłem w obecności badanych fotosensybilizatorów mierzono metodą oksymetrii EPR. Metoda ta jest podejściem pośrednim, które przy pomocy sondy spinowej pozwala na pomiar stężenia tlenu oraz jego zmian w próbce. Technika ta wykorzystuje wpływ wymiennego oddziaływania spinów między cząsteczkami tlenu i rodnika nitroksylowego [98]. Zmiany stężenia tlenu wywołują zmiany widma EPR sondy spinowej (np. przy wzroście stężenia tlenu obserwuje się poszerzenie linii lub zanik struktury nadsubtelnej widma).

W ramach niniejszej pracy, do pomiarów szybkości fotokonsumpcji tlenu użyto znacznik spinowy mHCTPO [93], [99]. Wyznaczając parametr fenomenologiczny R (pokazano na Rys.9) oraz korzystając z równania $[O_2](\text{mM}) = -0,707 + 0,463 \cdot R$ (parametry równania zostały wyznaczone w pomiarach kalibracyjnych w pracy [100]) wyznaczono stężenie tlenu w próbce. Ta wygodna metoda nie znajduje zastosowania w układach o wysokim stężeniu tlenu, takich jak rozpuszczalniki organiczne (aceton, DMSO, MeOH) ze względu na zupełnie zaburzoną strukturę widma. Jednakże w większości wykonywanych pomiarów, które miały miejsce w środowisku wodnym lub micelnym, nie napotkano na powyższy problem.



Rys.9 Sposób pomiaru fenomenologicznego parametru R dla (A) próbki o dużym stężeniu tlenu i (B) o małym stężeniu tlenu rejestrowane w H_2O .

Próbki w płaskiej kwarcowej kuwecie (o drodze optycznej 0,3mm, pojemności 200 μ l lub 100 μ l, Wilmad Glass, Co., NY, USA) umieszczonej horyzontalnie w rezonatorze, naświetlano in situ podczas pomiarów. Badania zmian stężenia tlenu przeprowadzano w temperaturze pokojowej; dla stabilizacji temperatury rezonator był przedmuchiwany azotem gazowym. Parametry zbierania niskopolowej składowej struktury nadsubtelnej sygnału znacznika spinowego były następujące: moc mikrofal – 1mW,

szerokość przemiatania – 3G, amplituda modulacji – 0,13G. Liczba skanów podczas pomiaru wynosiła 30, czas jednego skanu 20,97s. Pierwszy pomiar rejestrowany był w ciemności (jako ciemność w tej pracy rozumie się brak dostępu próbki do promieniowania elektromagnetycznego z zakresu długości fal 200-900nm), kolejne po odsłonięciu źródła światła. Wyniki analizowano przy użyciu programu komercyjnego WinEPR [101], gdzie znajdowano położenia poszczególnych ekstremów widm i wyznaczano parametr fenomenologiczny R. Przy pomocy programu OriginPro 9.1 sporządzono wykres zależności stężenia tlenu od czasu naświetlania, a następnie, poprzez dopasowanie funkcji liniowej, wyznaczono szybkość procesu fotokonsumpcji.

Do pomiarów wykorzystano spektrometr EPR Bruker typ EMX – AA, seria nr. 1579, Bruker, Niemcy. Źródłem światła była wysokociśnieniowa lampa ksenonowa o mocy 300W Cermax PE300CE – 13FM / Module 300W w obudowie chłodzonej powietrzem HX1, Perkin Elmer, USA wyposażona w zasilacz PS300 – 12/300W, Perkin Elmer, USA. W celu uzyskania odpowiedniego zakresu spektralnego światła zielonego (490-580nm) użyto szeregu filtrów, w tym filtru wodnego o drodze 5cm, pełniącego funkcję filtru odcinającego podczerwień, szklanych filtrów krawędziowych odcinających długości fali poniżej 390nm i powyżej 800nm oraz zielonego filtru dichroicznego (Andover Corporation, LOT-QuantumDesign GmbH), przepuszczającego tylko światło zielone.

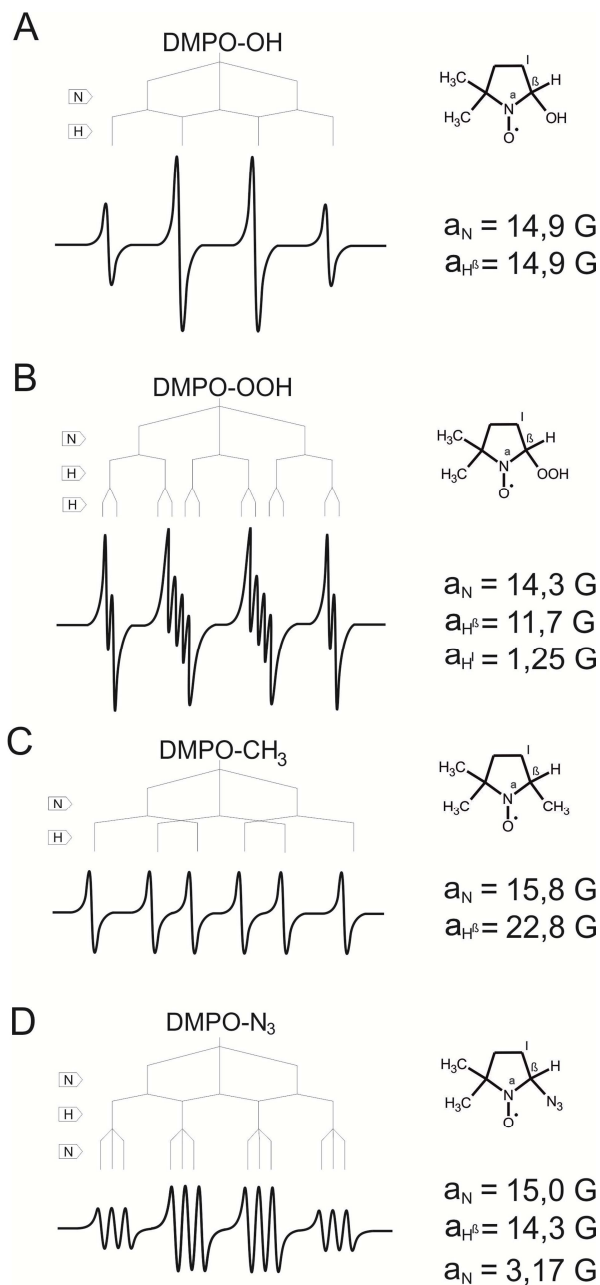
3.2.4. Pułapkowanie Spinowe

Generowanie krótko żyjących rodników (takich jak rodnik hydroksylowy czy anionorodnik ponadtlenkowy) monitorowano przy użyciu metody pośredniej, pułapkowania spinowego EPR. W technice tej wykorzystuje się własności diamagnetycznego nitronu, bądź związku nitrozowego jako pułapki spinowej, która oddziałując z wolnymi rodnikami tworzy stabilniejsze addukty spinowe, o charakterze wolnych rodników nitroksylowych. W zależności od przyłączonego rodnika, powstały addukt spinowy posiada charakteryzujące się stałymi rozszczepienia nadsubtelnej widmo EPR.

W niniejszej pracy jako pułapkę spinową zastosowano DMPO [102]. Na Rys.10 przedstawiono widma adduktów spinowych wybranych rodników z DMPO. Dostępne w literaturze stałe rozczepień dla poszczególnych adduktów, pozwalają na przewidywanie struktury adduktów spinowych oraz symulację widm [103].

Pomiar przeprowadzono analogicznie do pomiaru fotokonsumpcji tlenu, korzystając z tego samego spektrometru EPR i źródła światła. Parametry rejestracji niskopolowej składowej struktury nadsubtelnej sygnału adduktów spinowych były następujące: moc mikrofali – 1mW, szerokość przemiatania – 3G, amplituda modulacji - 0,13G. Wykonano serię 14 skanów, każdy trwający 41,94s. Zarejestrowane widma analizowano przy pomocy programu komercyjnego WinEPR (dostarczony przez firmę Bruker).

Identyfikacji poszczególnych adduktów spinowych w zarejestrowanych widmach dokonano porównując stałe rozszczepień otrzymanych widm z danymi literaturowymi oraz generując widma symulowane przy pomocy programu WinSim® 2002 [104].



Rys.10 Symulowane przy pomocy programu WinSim® widma poszczególnych adduktów DMPO (wersja 2002; jest to darmowe oprogramowanie, napisane przez National Institute of Environmental Health Sciences, Stany Zjednoczone, służące do symulacji widm eksperymentalnych EPR na podstawie zadanych parametrów pomiaru i rozszczepienia struktury nadsubtelnej [104]). Nad każdym widmem pokazano schemat rozczepienia nadsubtelnego, natomiast po lewej stronie podano stałe rozczepień oraz pokazano wzór strukturalny danego adduktu.

3.2.5. Czasowo rozdzielcza detekcja fosforescencji tlenu singletowego w 1270nm

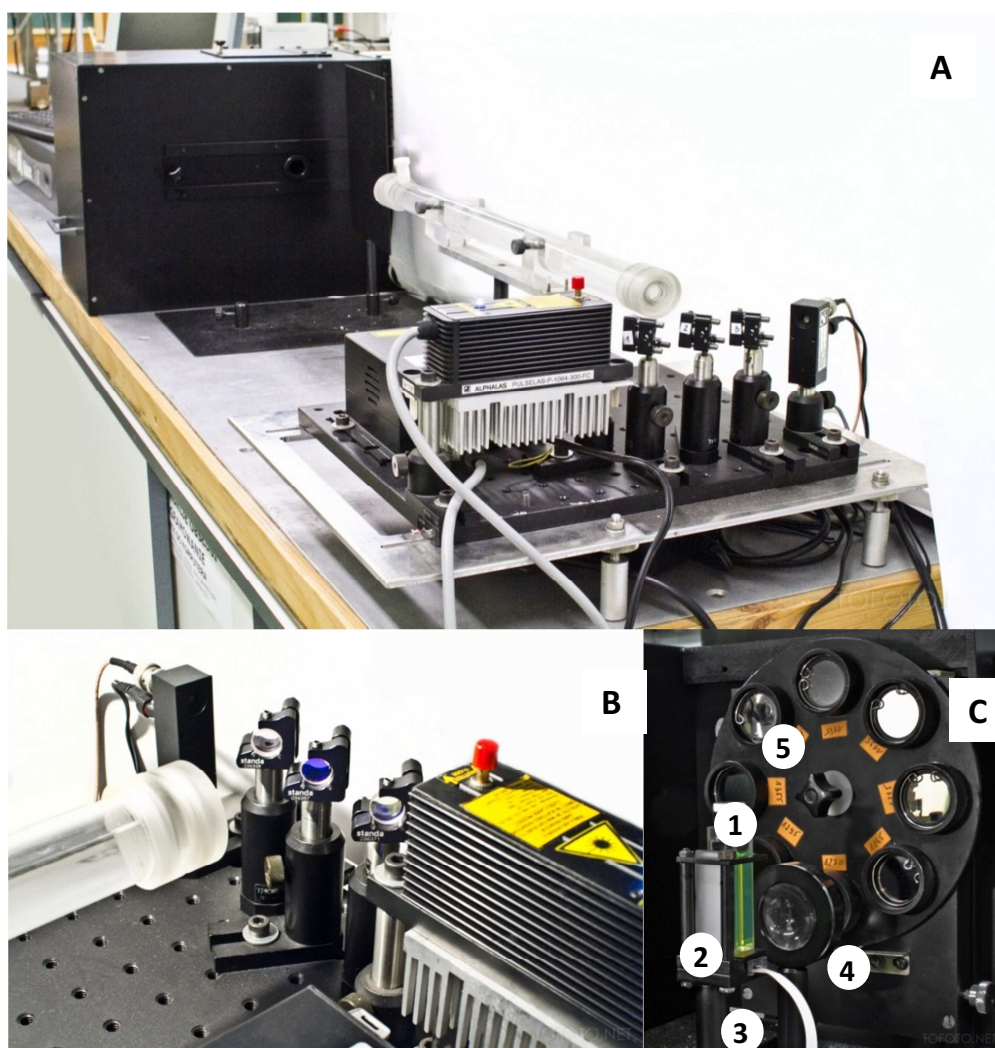
Do detekcji fotogenerowanego tlenu singletowego zastosowano bezpośrednią metodę polegającą na czasowo-rozdzielczej rejestracji jego charakterystycznej fosforescencji przy 1270nm [85]. Emisja tego promieniowania ma miejsce podczas przejścia ze wzbudzonego stanu singletowego cząsteczki tlenu do stanu podstawowego (Rys.11). Przejście to zachodzi z bardzo małym prawdopodobieństwem, bowiem ze względu na różnice multipletowości pomiędzy singletowy stanem wzbudzonym a trypletowym stanem podstawowym jest to przejście wzbronione. Dlatego czasowo rozdzielcza rejestracja fosforescencji tlenu singletowego jest bardzo trudna i wymaga bardzo czułych detektorów bliskiej podczerwieni.

Badania wykonano na dwóch unikatowych, indywidualnie zoptymalizowanych systemach. Pomiaru fosforescencji tlenu singletowego dokonuje się pod kątem 90° w stosunku do wiązki wzbudzającej promieniowania laserowego (Rys.11). Ze względu na unikalność urządzeń, poniżej przedstawiono schematy wraz ze szczegółowym opisem tych układów.



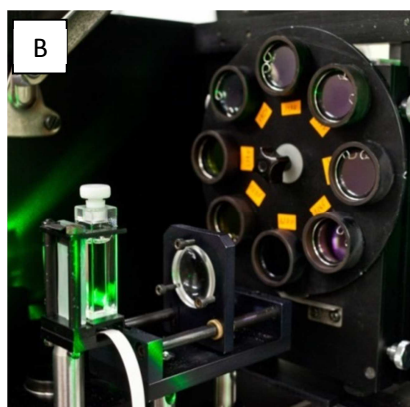
Rys.11 Schemat aparatury do czasowo rozdzielczej detekcji fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm. Wiązka lasera (1) padająca na próbkę prowadzi do wzbudzenia fotosensybilizatora (2). Wzbudzony fotosensybilizator może przekazać swoją energię wzbudzenia na rozpuszczony w roztworze tlen, co z kolei prowadzi do wygenerowania tlenu singletowego. Pomiaru fosforescencji $^1\text{O}_2$ dokonuje się pod kątem 90° w stosunku do wiązki wzbudzającej promieniowania laserowego po uprzednim skupieniu sygnału za pomocą soczewki (4) na oknie fotopowielacza (6) oraz przepuszczeniu przez odpowiednie filtry (filtr odcinający promieniowanie poniżej 1100nm oraz filtr interferencyjny wąskopasmowy z maksimum transmitancji około 1270nm (5)). W celu zwiększenia intensywności rejestrowanego sygnału zastosowano zwierciadło (3) odbijające fotogenerowane fotony w kierunku fotopowielacza.

- **System (I)**, pokazany na Rys.12 składa się z lasera impulsowego Nd-YAG (Pulselas-P-1064-FC, Alphalas GmbH, Goettingen, Germany) z modułem drugiej i trzeciej harmonicznej (532 i 355nm) o nanosekundowych impulsach i czasie repetycji 2-10kHz, fotopowielacza czułego w bliskiej podczerwieni (model H10330-45, Hamamatsu, Japan) wyposażonego w filtr odcinający 1100nm, filtra wąskopasmowego (NB series, NDC Infrared Engineering LTD, Maldon, UK) oraz karty do przeliczania wielokanałowego (NanoHarp 250, PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Dzięki niskiej energii pojedynczego impulsu, system znajduje szerokie zastosowanie do badań próbek łatwo ulegających fotodegradacji a także próbek o wysokiej wydajności generowania tlenu singletowego, gdzie za duża moc lasera może spowodować wysycenie i przekłamanie przebiegu sygnału.



Rys.12 (A). System (I) do czasowo-rozdzielczej detekcji fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm składa się z **(B)** lasera impulsowego Nd:YAG z modułem drugiej i trzeciej harmonicznej (rozdział na 532 i 355nm odbywa się na filtrach dichroicznych; 1064nm zostaje odcięte poprzez 50cm filtr wodny) **(C)** oraz z układu detekcji opartego na czułym w bliskiej podczerwieni fotopowielaczu, znajdującym się w oksydowanej obudowie redukującej dopływ promieniowania IR z otoczenia. Na rysunku zaznaczono odpowiednio elementy aparatury: **1.** próbka **2.** lustro odbijające sygnał w kierunku fotopowielacza, **3.** mieszadło magnetyczne (Thermo Scientific™ Cimarec™ z modułem Mini Stirrers). **4.** Kwarcowa soczewka zbierająca sygnał, **5.** Zestaw filtrów wąskopasmowych, w tym 1270nm dla detekcji $^1\text{O}_2$.

- **System II** wykorzystuje ten sam układ detekcji co System (I), ale różni się źródłem wzbudzenia (Rys.13). Wykorzystano tu laser ND:YAG pompowany diodami z tzw. „Q-switch’em” (co pozwala na generowanie impulsów nanosekundowych), zintegrowany z optycznym oscylatorem paramagnetycznym (Ekspla NT242). Laser ten charakteryzuje się o co najmniej rząd wielkości większą niż w Systemie (I) energią pojedynczego impulsu (40μJ UV, czas trwania impulsu : 3-6ns). Ponadto, ma możliwość generowania impulsów z czasem repetycji 1kHz z zakresu 210-2600nm z wyjątkową czystością spektralną (gwarantowane przez producenta). Laser o dużej mocy jako źródło wzbudzenia jest bardzo przydatny do badania substancji charakteryzujących się niską wydajnością kwantową do fotogenerowania tlenu singletowego.



Rys.13 (A) System 2 do detekcji fosforescencji tlenu singletowego w 1270nm. Wiązka lasera nie wymaga stosowania dodatkowych filtrów w celu otrzymania pożądanej długości fali. **(B)** Schemat układu detekcji luminescencji w podczerwieni skonstruowany na wzór układu z Systemu (I).

Oba systemy charakteryzują się bardzo dużą czułością, pozwalającą na wykrycie nawet śladowych sygnałów fosforescencji tlenu singletowego. Analiza danych, polegająca na dopasowaniu funkcji lub superpozycji kilku funkcji eksponencjalnych, została przeprowadzona przy użyciu specjalnie zaprojektowanego w tym celu programu „LASER” (dr Marcin Sarewicz, Zakład Biofizyki WBBiB UJ; w procedurze dopasowania, program wykorzystuje algorytm iteracyjny Levenberg-Marquardta). Dalszą analizę, między innymi sporządzenie wykresów i wyliczenie wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego, przeprowadzono w programie OriginPro 9.1. W celu wyznaczenia wydajności kwantowej, porównano zdolność generowania $^1\text{O}_2$ badanych próbek z wydajnością kwantową wzorca – Rózu Bengalskiego (RB). W tym celu sporządzono roztwory próbki badanej i wzorca, o jednakowej absorbancji przy fali wzbudzenia. Początkowe wartości intensywności mierzono w zależności od energii promieniowania wzbudzającego. W obszarze liniowego wzrostu intensywności fosforescencji wyznaczono nachylenie prostej dla próbki (a) i dla standardu (a_s). Znając wartość wydajności kwantowej standardu (ϕ_s), szukana wydajność kwantowa próbki wynosi: $\phi = \phi_s(a/a_s)$.

3.2.6. Laserowa fotoliza błyskowa

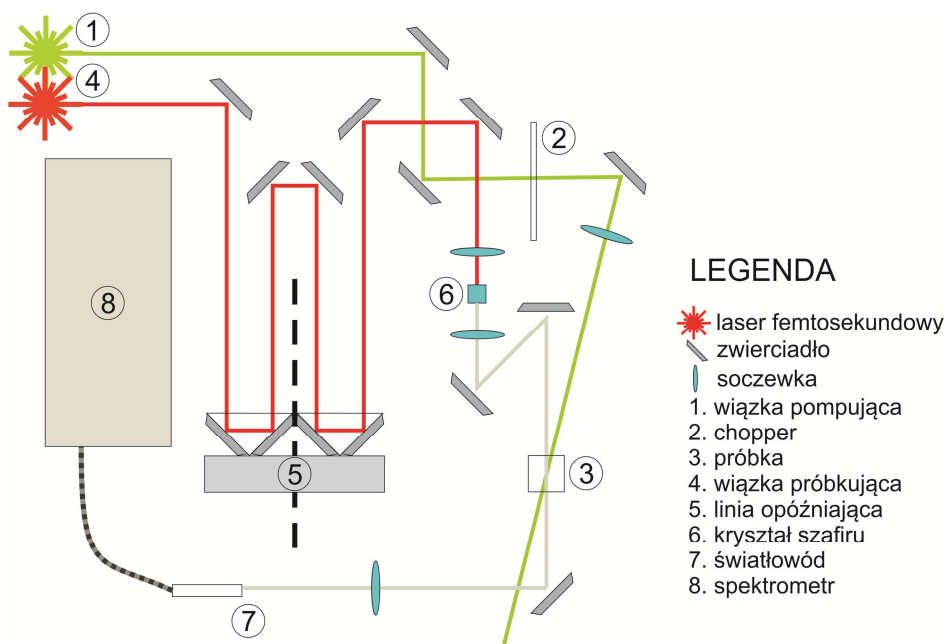
Laserowa fotoliza błyskowa została wykorzystana do badania właściwości spektralnych i czasów życia krótko żyjących stanów przejściowych fotogenerowanych pod wpływem femtosekundowego impulsu laserowego. Pomiary zostały wykonane w Instytucie Nauki Weizmanna, dzięki uprzejmości Prof. Avigdora Scherza; oraz wsparciu finansowemu w ramach projektu NCN Etiuda 2013/08/T/ST4/00053).

3.2.7.1. Femto- i pikosekundowa fotoliza błyskowa

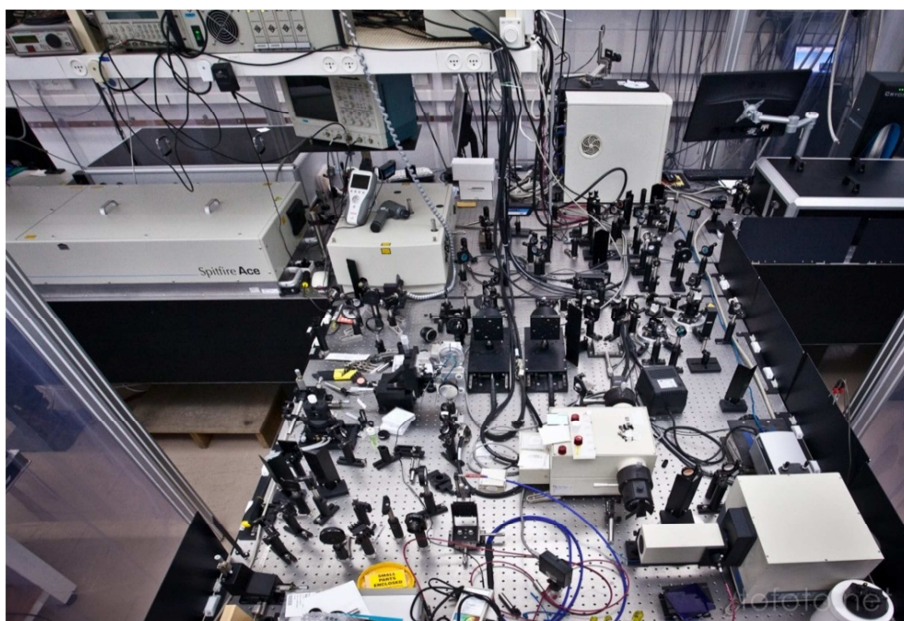
Unikalny układ do femto- i pikosekundowej fotolizy błyskowej został zaprojektowany i złożony przez Dr Iddo Pinkas'a z Instytutu Nauki Weizmanna (fotografia układu na Rys.15). Układ pomiarowy składa się z systemu laserowego opartego na oscylatorze pracującym w trybie „mode-locked” (Spectra Physics, Mai Tai SP). Oscylator produkuje serie 120fs impulsów z maksimum w 800nm i mocy 900mW (10nJ/impuls). Powstałe impulsy zostają następnie rozciągnięte w czasie do kilku pikosekund po czym zostają wzmocnione przez regeneracyjny wzmacniacz impulsowy (chirped pulse regenerative amplifier, Spectra Physics Spitfire Ace) pompowany przez laser impulsowy Nd:YLF (Spectra Physics Empower 45). Po wzmocnieniu, impuls o mocy 2,5mJ i czasie repetycji 500kHz zostaje rozdzielony na dwie wiązki: pompującą i próbkującą, po czym zostaje skierowany do paramagnetycznego optycznego wzmacniacza (OPA, Spectra Physics OPA-800CF), w celu otrzymania 120fs impulsów w zakresie długości fal 300-3000nm. W zależności od długości fali, moc wyjściowa impulsu waha się od kilku do kilkudziesięciu mikrodżuli. Częstotliwość wiązki pompującej jest mechanicznie zredukowana do 250Hz przy użyciu zsynchronizowanego z laserem choppera (C-995 TTI).

Wiązkę próbkującą otrzymano z wcześniej oddzielonej części wiązki 800nm. Wpierw wiązkę poprowadzono przez linię opóźniającą sterowaną softwarowo, po czym odpowiednio skupiono na kryształach szafiru lub fluorku wapnia (CaF_2) w celu otrzymania kontinuum widmowego odpowiednio w zakresie 420 - 720nm lub 300 – 720nm.

Końcowe wiązki próbkująca i pompująca są skupione w tym samym punkcie i przecinają się pod małym kątem wewnątrz kuwety kwarcowej o drodze optycznej 4mm (Starna). Podczas pomiaru próbka była delikatnie mieszana mieszałem magnetycznym (moduł TC 125, Quantum North West). Po przejściu przez próbkę, wiązka próbkująca jest analizowana przez spektrograf (Jobin Yvon Triax 180) a następnie zbierana kamerą CCD (Andor Newton DU-970N-UV). Cały system do femto- i pikosekundowej fotolizy błyskowej jest kontrolowany programem napisanym w National Instruments LabView. Uproszczony schemat działania układu przedstawiono i opisano na Rys.14.



Rys.14 (A) Uproszczony schemat aparatury femto- i pikosekundowej fotolizy błyskowej. Próbkę (3) zostaje wzbudzona wiązką pompującą lasera femtosekundowego (1) po uprzednim przejściu przez tzw. Chopper (2), w celu dobrania odpowiedniej częstotliwości. Wiązka próbkująca (4), pochodząca z tego samego lasera co wiązka pompująca, nakierowywana jest na zespół ruchomych lusterek, stanowiących moduł opóźnienia względem wiązki wzbudzającej (poprzez wydłużanie drogi wiązki). Następnie wiązka próbkująca, po przejściu przez kryształ szafiru (6), który konwertuje światło podczerwone na światło białe (460-760nm), jest skierowana na próbkę tak, aby przecinać się z wiązką próbkującą. Zmianę położenia lusterek modułu opóźniającego (5), umożliwia „próbkowanie”, czyli pomiar zmiany absorpcji w danym punkcie czasowym. Zmiany absorpcji próbki po uprzednim skupieniu na światłowodzie (7), rejestrowane są przez odpowiedni detektor (8).



Rys. 15 Fotografia systemu do femto- i pikosekundowej laserowej fotolizy błyskowej znajdującego się w Instytucie Nauki Weizmanna, Rehovot, Izrael.

Przebieg pomiaru:

Po włączeniu lasera odczekiwano ok. 3h w celu stabilizacji mocy i pozycji wiązki. Następnie ustawiano wiązkę próbkującą poprzez odpowiednie skupienie wiązki lasera 800nm na kryształach szafiru/ CaF_2 . Otrzymane białe continuum zależy od kryształu (szafir lub CaF_2), skupienia i szerokości padającej wiązki. Kryształ fluorku wapnia wymagał ciągłego ruchu w celu zapobieżenia termicznemu zniszczeniu jego struktury – co otrzymano poprzez sprzężenie ze specjalnym wolno suwnym silniczkami. To rozwiązanie powodowało jednak dodatkowe szумы wynikające z niejednorodności i niedoskonałości w kryształach (zanieczyszczenia lub mikro rysy na jego powierzchni). Otrzymane widmo, charakteryzowało się bardzo słabą intensywnością w zakresie 420-500nm, większą w 500-700nm, oraz dużą intensywnością powyżej 700nm. Z kolei białe kontinuum otrzymane z zastosowaniem kryształu szafiru, które pozwalało na badanie w zakresie długości fal 500-780nm, charakteryzowało się większą stabilnością niż światło po przejściu przez fluorek wapnia. Do większości pomiarów użyto CaF_2 w celu próby uzyskania sygnału <500nm.

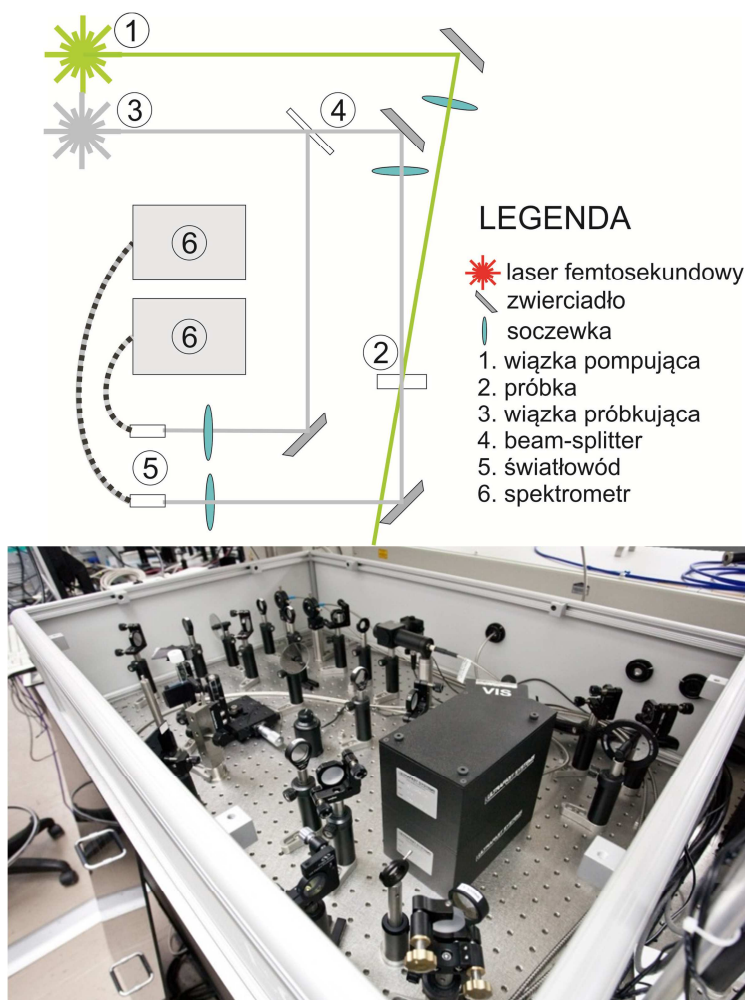
W większości przeprowadzonych pomiarów, próbkę wzbudzano wiązką lasera o długości fali 520-530nm, o mocy 400-500 μW . Ze względu na pewne problemy techniczne, część pomiarów przeprowadzono przy wzbudzeniu w 400nm (moc 300-1000 μW). Moc wiązki wzbudzającej modyfikowano przy użyciu filtrów kołowych gradientowych ND (Thorlabs) i mierzono miernikiem (Ophir, Vega P/N 7Z01560). Następnie przy pomocy mikropokręteł luster, nakierowujących wiązki w kierunku próbki, ustawiono ich przecięcie w środku kuwety, tak aby otrzymywany sygnał absorpcji różnicowej był maksymalny. Przebieg otrzymywanego sygnału jest różny w zależności od stopnia przykrywania się obu wiązek. Prawdopodobnie jest to też związane z niejednorodnością spektralną przekroju wiązki próbkującej. Stosowana kamera CCD nie była wystarczająco czuła w zakresie krótkich fal (<520nm), stąd analizie poddano absorpcję różnicową tylko z zakresu 520-780nm. Niektórym pomiarom towarzyszyły wahania mocy lasera, prawdopodobnie spowodowane zmiennymi warunkami otoczenia (temperatura, wilgotność).

Wyniki numeryczne miały postać pliku (.csv) będącego zbiorem widm różnicowych absorpcji (różnica widm absorpcji próbki wzbudzonej i przed wzbudzeniem) przypisanych poszczególnym punktom czasowym. Wstępną analizę danych, między innymi wybór reprezentatywnych widm różnicowych, dopasowanie krzywych zaniku oraz znalezienie poszczególnych składowych sygnału przy pomocy funkcji „Global Fit”, wykonano w programie Surface Explorer Pro 2.2 (Ultrafast Systems [105]).

3.2.7.2. Nanosekundowa fotoliza błyskowa

Do badania stanów przejściowych cząsteczek o nano- i mikrosekundowym czasie życia (między innymi stanu trypletowego) wykorzystano nowoczesny, szerokopasmowy, sub-nanosekundowy spektrometr do absorpcji przejściowej EOS (Ultrafast Systems). Został on specjalnie zaprojektowany do pracy z laserami o częstotliwości do 1kHz. System wykorzystuje technikę pomiarową ‘Pump-probe’, gdzie źródłem wzbudzania jest system laserowy opisany w Sekcji 2.3.7.1 o femto- i pikosekundowej laserowej

fotolizie błyskowej). EOS stanowi integrację wysokiej jakości elementów optycznych Thorlabs z czułymi detektorami (detektory CMOS o rozdzielczości 1,5nm, o czułości w zakresie 350-850nm, model 8370-3-VIS). System pozwala na wykonywanie pomiarów w zakresie 400-900nm z rozdzielczością czasową do 500ps. Widma są zbierane i uśredniane z częstotliwością 0,5-1kHz (w zależności od ustawienia lasera) a następnie wyświetlane w postaci graficznej w programie EOS (LabView).



Rys.16 (A) Schemat działania systemu do nano- i mikro-sekundowej laserowej fotolizy błyskowej EOS. Układ wykorzystuje podwójnie próbkujący schemat detekcji („dual probe-: probe-reference”), gdzie wiązka próbkująca **(3)** jest rozdzielona na dwie wiązki **(4)**: jedna padająca na próbkę **(2)** rejestruje zmiany absorpcji wywołane impulsem wzbudzającym **(1)** a druga jest skierowana bezpośrednio do spektrometru **(6)** w celu monitorowania i korekty fluktuacji światła próbkującego. **(B)** Fotografia układu do nanosekundowej laserowej fotolizy błyskowej dostępnego w Instytucie Nauki Weizmanna.

Wstępną analizę danych przeprowadzono przy wykorzystaniu programu Surface Xplorer Pro 2.2 (dopasowanie eksponencjalnych zaników, dopasowanie „Global Fit”, wybór kinetyk oraz reprezentatywnych widm różnicowych absorpcji). W oparciu o program Origin9.1 przygotowano

wykresy oraz oszacowano stałą oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem (z powodu braku dostępu do mieszanek gazowych oraz układu do pomiaru stężenia w próbce, stałą oddziaływania wyznaczono mając do dyspozycji dwa punkty pomiarowe: pod nieobecność tlenu oraz w równowadze z powietrzem – stężenie tlenu w tych warunkach zaczerpnięte z literatury).

3.2.7. Pomiary w warunkach beztlenowych i po nasyceniu tlenem

Niektóre badania procesu fotodegradacji, laserowej fotolizy błyskowej oraz czasowo rozdzielczej detekcji fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm, przeprowadzono w warunkach beztlenowych, małego stężenia tlenu lub nasycenia 100% tlenem. W tym celu, próbkę w kwarcowej kuwecie (w której później przeprowadzano pomiar), przedmuchano argonem (Ar 5.0; Messer, Polska sp. z o.o.), tlenem (O₂; 5.1; Messer, Polska sp. z o.o.), lub mieszaną azotu i tlenu (Messer, Polska sp. z o.o.), zgodnie z przedstawionym na Rys.17 schematem. Próbkę przedmuchiwano małym strumieniem gazu (około 2 bąbelki gazu/s) przez 30min. W próbkach w obecności miceli lub wysokich stężeń BSA, z powodu powstawania piany podczas bezpośredniego gazowania próbki, stosowano odmienną procedurę. Próbkę mieszaną mieszałem magnetycznym przedmuchiwano ponad powierzchnią roztworu. Po upływie 30min igłą doprowadzającą gaz wprowadzono do roztworu w celu wypełnienia kuwety bąbelkami gazu. Następnie, po odłączeniu igieł, mieszano próbkę przez około 2min poprzez obracanie kuwety o 180 stopni.



Rys.17 Schemat układu do przedmuchiwania próbki gazem/mieszaną gazową. Gaz (z butli) doprowadzony jest wężykiem tygonowym zakończonym igłą do próbki. Druga igła służy do wyrównania ciśnienia nad roztworem.

3.2.8. Analiza niepewności

Dla serii pomiarów o małej liczbie powtórzeń (poniżej 10) odchylenie średniej arytmetycznej liczono z rozkładu Studenta, mnożąc odchylenie standardowe z rozkładu Gaussa przez odpowiedni współczynnik Studenta aby uzyskać poziom ufności 68% lub 99,9% w celu otrzymania niepewności [106]). Błędy pomiarów pośrednich liczono metodą różniczki zupełnej [107].

4. Wyniki

W pierwszej części pracy zamieszczono wyniki szczegółowych badań właściwości fotochemicznych i fotofizycznych sensybilizatora WST11. Chociaż ogólny przebieg fotosensybilizowanego utleniania z udziałem WST11 wydaje się dość dobrze poznany [37], pewne wątpliwości, dotyczące niektórych aspektów proponowanego mechanizmu, wzmiankowane we wstępie, wymagały przeprowadzenia szeregu dodatkowych eksperymentów pozwalających na jednoznaczną interpretację wyników. W drugiej części pracy zaprezentowano wybrane właściwości fotofizyczne i fotochemiczne dwóch nowych fotosensybilizatorów –STL3009 oraz STL4005, należących do rodziny Pd-podstawionych pochodnych bakteriochlorofili, które w wodnych środowiskach o neutralnym pH występują w formie kationowej. Warto podkreślić, iż WST11 w takich samych warunkach doświadczalnych występuje w formie anionowej. Niestety, dostępna mała ilość STL3009 i STL4005 nie pozwoliła na szczegółową analizę ich fotosensybilizujących właściwości jak to miało miejsce w przypadku WST11.

Chociaż badania opisane w niniejszej pracy przeprowadzono w kilku wybranych mikrośrodowiskach, przede wszystkim skoncentrowano się na środowisku wodnym w obecności i pod nieobecność albuminy surowicy bydlęcej (BSA), której podstawowe właściwości są podobne do właściwości albuminy surowicy ludzkiej (HSA). Podyktowane jest to specyficznymi warunkami użycia WST11 jako fotosensybilizatora stosowanego w naczyniowo skierowanej terapii fotodynamicznej [52], [60], [61]. W celu identyfikacji reaktywnych form tlenu, powstających w czasie naświetlania badanych pochodnych bakteriochlorofili, zastosowano szereg bezpośrednich i pośrednich metod ich detekcji. W metodach pośrednich używano wybranych substratów cechujących się wysoką stałą oddziaływania z określoną reaktywną formą tlenu. I tak, aby potwierdzić obecność tlenu singletowego ($^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$), użyto histydyny, chemicznego wygaszacza $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ o stałej oddziaływania $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [108] i azydku sodu, fizycznego wygaszacza tlenu singletowego o stałej szybkości gaszenia $5,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [109]. Ponadto, część eksperymentów przeprowadzono w ciężkiej wodzie (D_2O), w której czas życia $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ jest ponad dziesięciokrotnie dłuższy niż w wodzie zwykłej [110]. Identyfikację generowanego w badanym

układzie anionorodnika nadadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) przeprowadzono poprzez porównanie tempa fotokonsumpcji tlenu oraz powstawania charakterystycznego adduktu spinowego w obecności i pod nieobecność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) - enzymu katalizującego dysmutację anionorodnika nadadtlenkowego [111], katalazy – enzymu katalizującego rozkład nadtlenu wodoru (H_2O_2) [112] oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego NADH, jako wydajnego donora elektronów ([113]). Dodatkowo, w celu usunięcia możliwych rodników hydroksylowych, dodawano 10% EtOH [114].

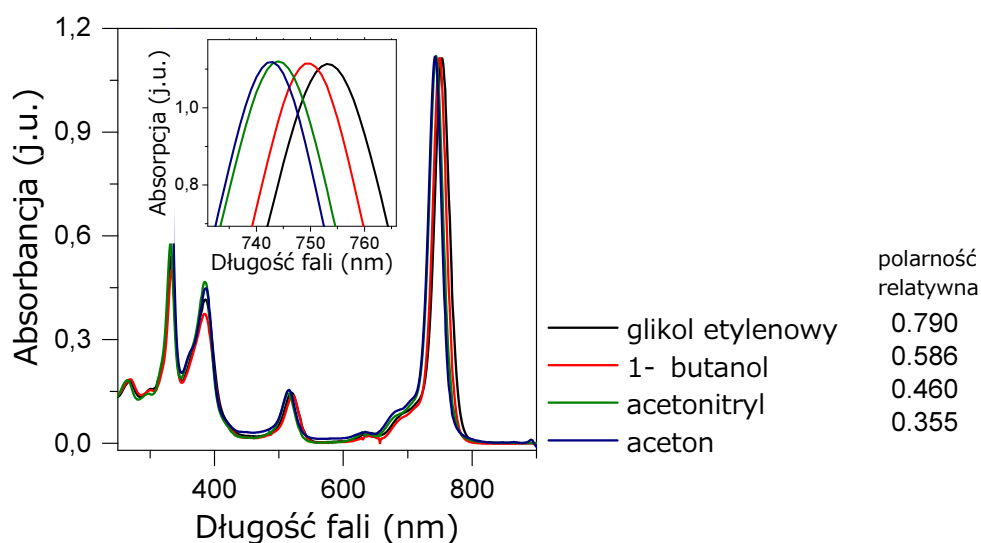
4.1. Opis własności fizycznych WST11

4.1.1. Właściwości spektralne

Badania nad fotosensybilizatorem WST11 rozpoczęto od pomiarów absorpcji stanu podstawowego w różnych mikrośrodkach. Pomiary miały umożliwić oszacowanie stopnia agregacji oraz wybór zakresu długości fal do wzbudzenia fotosensybilizatora podczas dalszych eksperymentów. W badaniach stosowano $20\mu M$ stężenie WST11, gdyż jest ono zbliżone do tego, które spodziewane jest w miejscu działania podczas terapii VTP. W terapii takiej standardowo stosuje się 2-4mg WST11 na 1kg masy ciała [52], co przy założeniu, że na 1kg masy ciała przypada 80ml krwi daje końcowe stężenie $25-50\mu M/ml$. Zastosowanie wyższych stężeń fotosensybilizatora przyczyniałoby się do jego agregacji [46]. Z drugiej strony, stosowanie niższych stężeń spowodowałoby uzyskanie jedynie niskiej jakości danych, co utrudniłoby ich analizę i interpretację.

4.1.1.1. Wpływ polarności na absorpcję

W rozpuszczalnikach organicznych WST11 występuje w postaci monomerów [46]. Typowe widmo absorpcji WST11 zmierzone w metanolu pokazano na Rys.5(B). Widmo charakteryzuje się dobrze wykształconymi pasmami Q_y , Q_x , oraz B_x , i B_y w paśmie Soreta, o maksimach absorpcji odpowiednio przy 748, 518, 384 i 332nm. Zmiana rozpuszczalnika przesuwają położenie poszczególnych pasm z zachowaniem charakterystycznego przebiegu absorpcji (Rys.18). W szczególności, położenie pasma Q_y wraz ze spadkiem polarności środowiska, przesuwają się w stronę fal krótszych (Rys.18 - insert). Trend ten jednak nie dotyczy MeOH



Rys.18 Wpływ rozpuszczalnika (legenda) na przebieg widma absorpcji 10 μ M WST11. Insert na rysunku pokazuje zmiany w położeniu pasma Q_y wraz ze spadkiem polarności rozpuszczalnika.

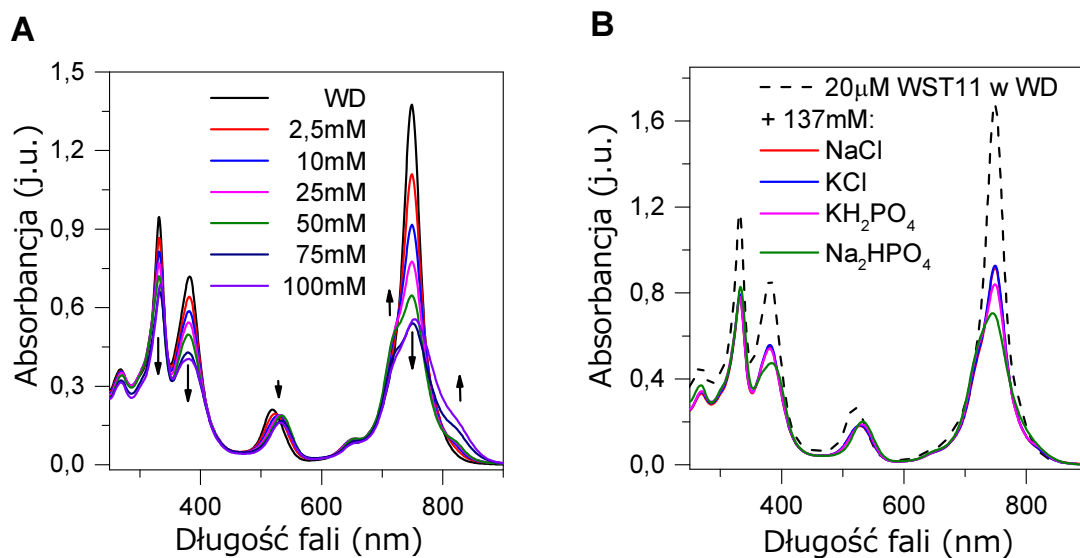
(Rys.5(B)) i DMSO (nie pokazano), gdzie położenie Q_y wynosi odpowiednio 748 i 752nm (relatywne polarności w tych rozpuszczalnikach wynoszą odpowiednio 0,762 i 0,444).

4.1.1.2. Właściwości spektralne w środowisku wodnym

W środowisku wodnym WST11 występuje w postaci częściowo zagregowanej, co uwiadcza się poszerzonymi i przesuniętymi położeniami pasm absorpcji (patrz dyskusja w pracy Brandis et al., 2007).

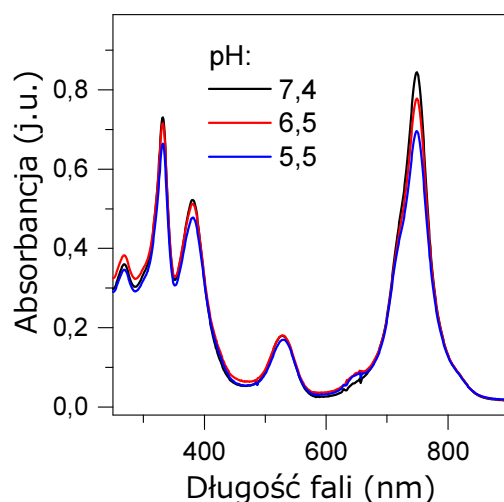
Kolejnym etapem badań wpływu środowiska na właściwości absorpcyjne oraz stopień agregacji WST11 było sprawdzenie wpływu siły jonowej. W tym celu zarejestrowano szereg widm absorpcji 20 μ M WST11 w buforze PBS (z ang. Phosphate-buffered saline) o różnej sile jonowej, otrzymanej poprzez odpowiednie rozcieńczanie 0,1M PBS (stężenie jonów: 1370mM NaCl, 27mM KCl, 81mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄) wodą destylowaną (WD) (Rys.19(A)). Wraz ze wzrastającym stężeniem buforu zaobserwowano spadek intensywności, poszerzenie i przesunięcie obszaru Soreta i Q_x w stronę fal dłuższych a także spadek intensywności pasma Q_y z pojawieniem się charakterystycznego ramienia przy około 720nm. Na Rys.19(B) pokazano,

że dodawanie każdej z soli wchodzących w skład buforu PBS do roztworu 20 μ M fotosensybilizatora w wodzie destylowanej, powoduje agregację związku.



Rys.19 (A) Postępująca agregacja 20 μ M WST11 wraz ze wzrastającą siłą jonową indukowaną poprzez odpowiednie rozcieńczenie 0,1M roztworu buforu PBS. **(B)** agregacja fotosensybilizatora indukowana 137mM stężeniem każdego ze składników PBS.

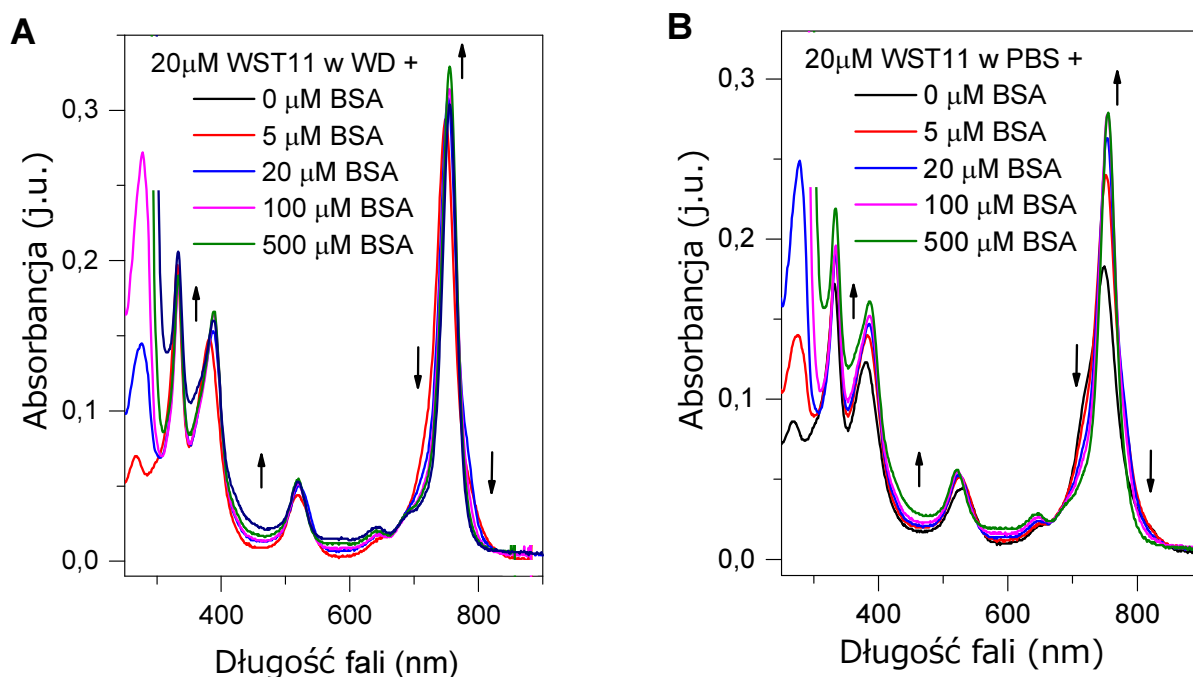
Zmiany pH roztworu WST11 w PBS także wpływają na właściwości optyczne fotosensybilizatora - spadek pH powoduje wzrost agregacji WST11, patrz – Rys.20.



Rys.20 Wpływ pH na widmo absorpcji 20 μ M WST11 w PBS. Zmiany pH otrzymano poprzez dodawanie do badanej próbki stężonego kwasu solnego, HCl.

4.1.1.3. Wpływ BSA na absorpcję WST11

Dodawanie BSA do 20 μ M WST11, zarówno w wodzie destylowanej jak i w PBS powoduje zwężenie i przesunięcie poszczególnych pasm absorpcji (Rys.21). W obu przypadkach, po dodaniu 0,5mM BSA maksimum pasma Q_y występuje przy 755nm jednak pasma te różnią się intensywnością i szerokością. Dodatkowo obserwuje się przesunięcie pasm Soreta (B_x, B_y) w stronę fal dłuższych oraz silne przesunięcie pasma Q_x w stronę fal krótszych.



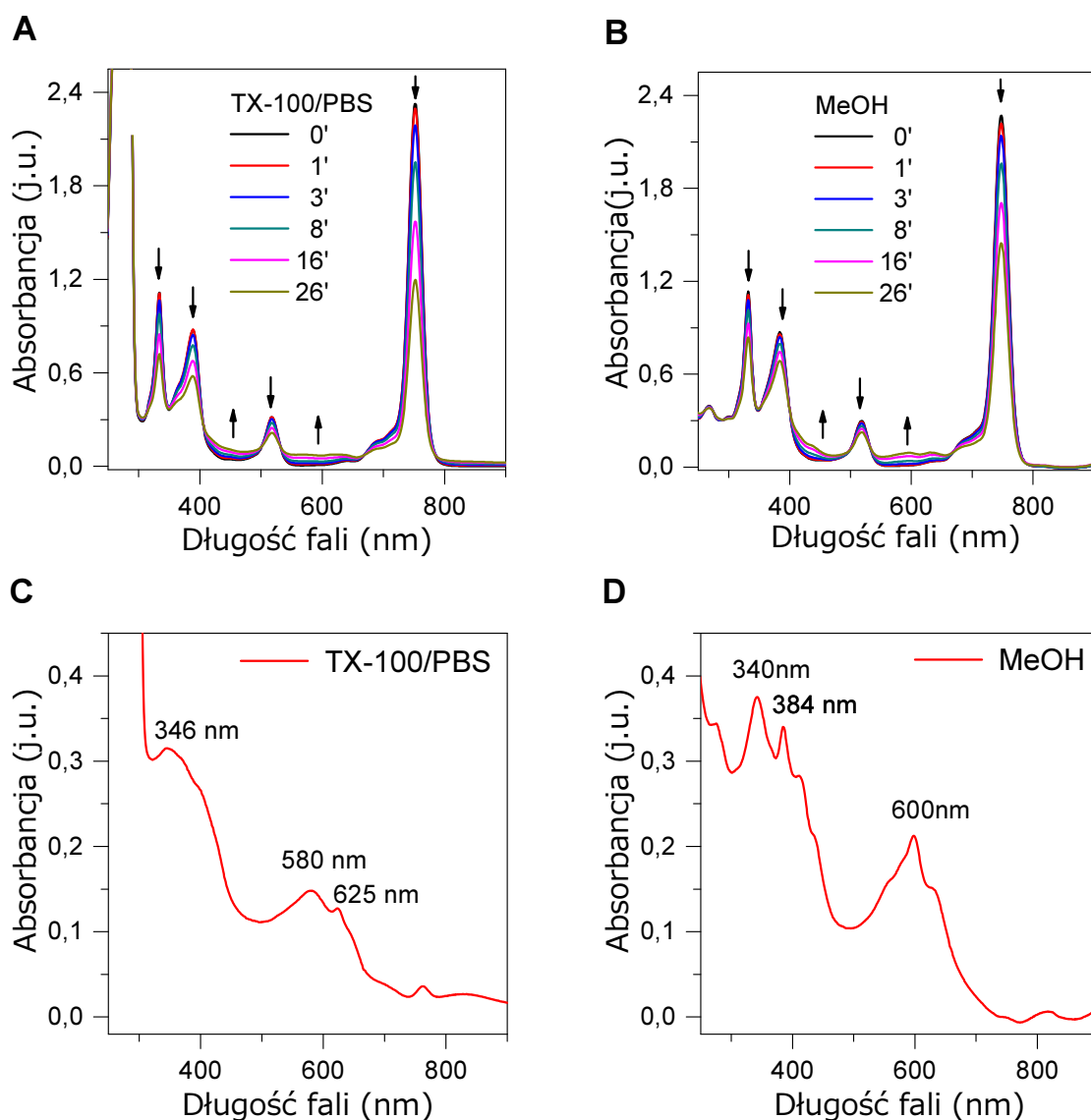
Rys.21 Zmiany widm absorpcji 20 μ M WST11 w wyniku wprowadzenia BSA do roztworu. Wyniki w środowisku **(A)** wody destylowanej (WD) i **(B)** buforze PBS. Strzałkami zaznaczono zmiany w widmie absorpcji zachodzące wraz z czasem naświetlania próbki.

Pomiary kontrolne, wykonane w obecności wybranych reagentów - NaN₃ (5mM), histydyny (100 μ M), DMPO (0,1M), mHCTPO (0,1mM), wykazały brak ich wpływu na widmo absorpcji fotosensybilizatora w zakresie 400-755nm. Widmo absorpcji fotosensybilizatora w D₂O jak i w PBS(D₂O) odpowiada widmom rejestrowanym w odpowiednio WD i PBS.

4.1.1.4. **Proces fotodegradacji WST11**

Postęp fotodegradacji WST11 zmierzono spektrofotometrycznie w wybranych układach modelowych zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Metody”. Przeprowadzenie takich pomiarów było konieczne ze względu na oszacowanie stabilności związku oraz identyfikację produktów procesów fotobłaknięcia. Co prawda w pracy Ashur’a [37] zwrócono uwagę na względnie małą fotostabilność związku w środowisku wodnym oraz pokazano ochronny efekt albuminy, jednak nie analizowano dokładnie fotodegradacji w różnych środowiskach.

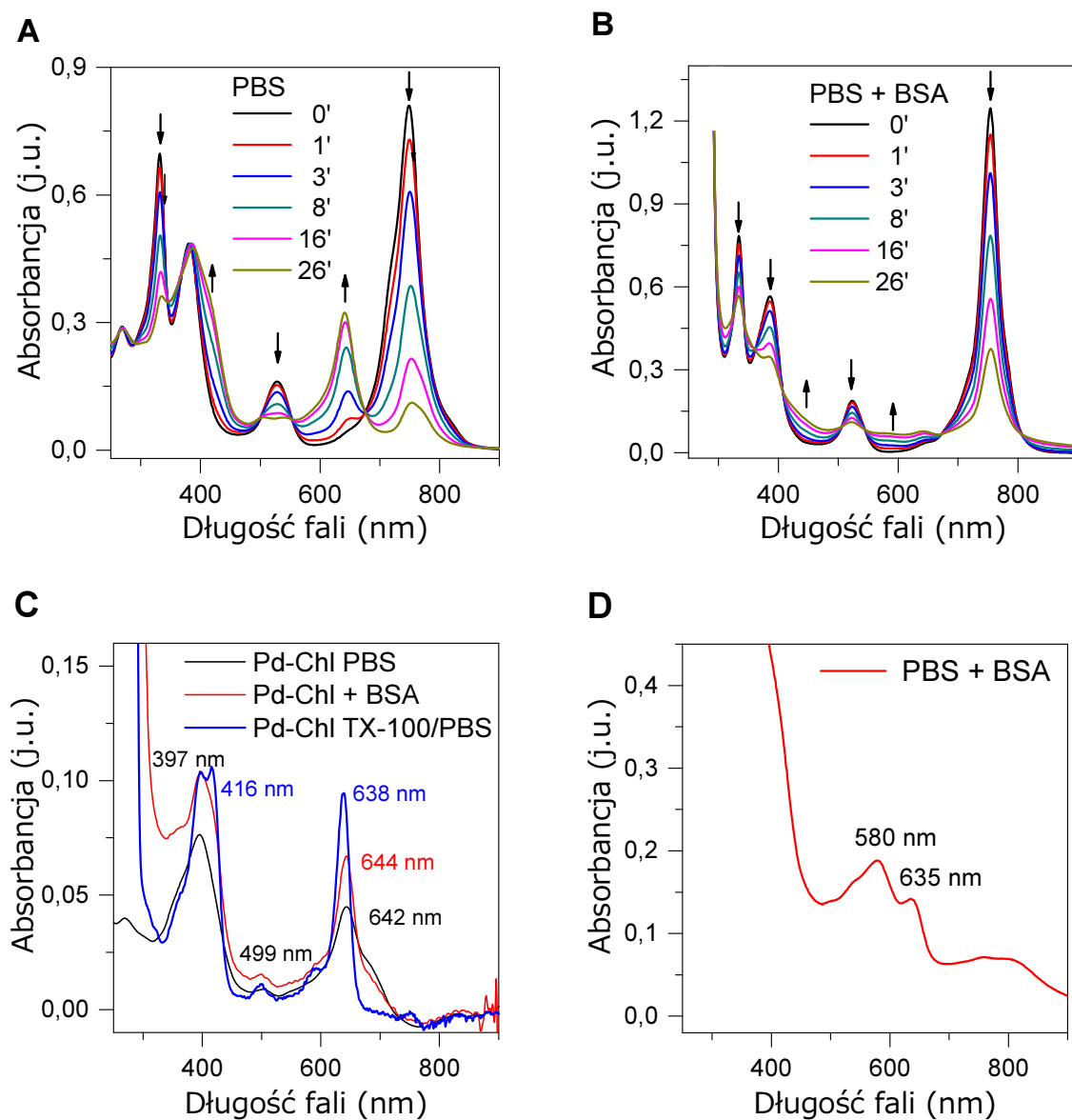
Pomiar szybkości fotodegradacji przeprowadzono naświetlając roztwór WST11 w równowadze z powietrzem wiązką lasera o długości fali 532nm. Widma zarejestrowano w sześciu punktach czasowych po 0, 1, 3, 8, 16 i 26 minutach naświetlania. Jak widać z Rys.22(A,B), 26-minutowe naświetlanie WST11 w obecności miceli 0,5% TX-100 oraz w rozpuszczalniku organicznym (MeOH) skutkuje niemal dwukrotnym zmniejszeniem sygnału absorpcji fotosensybilizatora z jednoczesnym narastaniem szerokiego widma absorpcji w obszarze 400-600nm (Rys.22). Widma absorpcji produktów końcowych fotodegradacji uzyskano poprzez kilkuminutowe naświetlanie oświetlaczem diodowym o długości fali 755nm i mocy 2W.



Rys.22 Fotodegradacja 20 μ M WST11 indukowana światłem laserowym o długości fali 532nm w (A) TX-100/PBS i (B) MeOH. Strzałkami zaznaczono zmiany w widmie absorpcji zachodzące wraz z czasem naświetlania próbki. (C) i (D) pokazują widmo absorpcji produktów degradacji odpowiednio w TX-100/PBS i MeOH otrzymanych podczas 20-minutowego naświetlania próbek oświetlaczem diodowym o długości fali 755nm i mocy 2W.

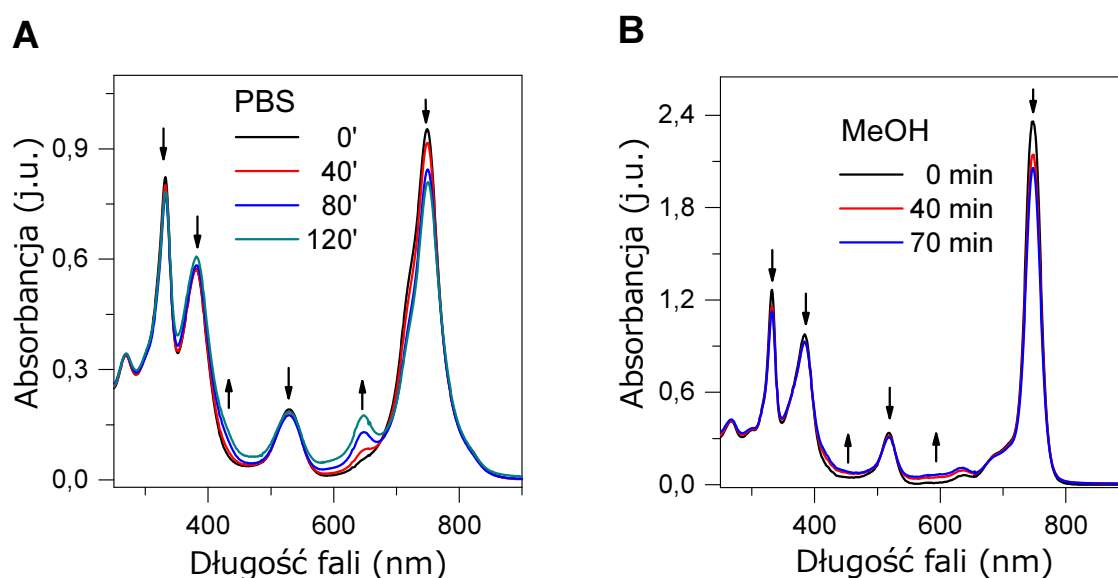
W buforze PBS zaobserwowano szybki spadek intensywności absorpcji WST11 z jednoczesnym narastaniem charakterystycznych dla Pd-Chloryny [37] pasm absorpcji z maksimami odpowiednio w 420, 640 nm (Rys.23). Otrzymany produkt rozpuszczono w obecności 0,5mM BSA oraz 0,5% TX-100/PBS w celu określenia wpływu środowiska na położenie i przebieg obserwowanych pasm (Rys.23). Tempo fotodegradacji po wprowadzeniu 100 μ M BSA ulega

spowolnieniu, natomiast produkty fotodegradacji charakteryzują się szerokim widmem absorpcji (Rys.25 (B, D)).



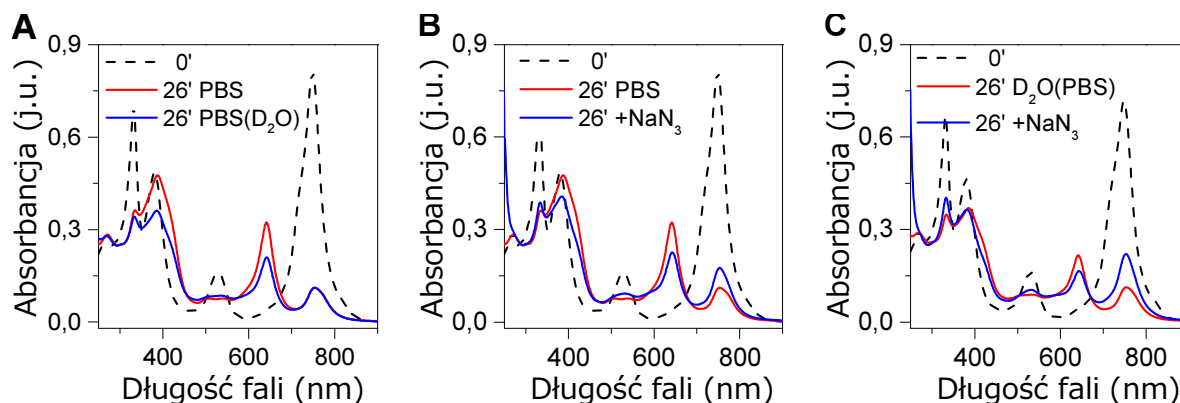
Rys.23 Fotodegradacja 20 μ M WST11 indukowana światłem laserowym o długości fali 532nm w **(A)** PBS i **(B)** PBS z 100 μ M BSA. Strzałkami zaznaczono zmiany w widmie absorpcji zachodzące w czasie naświetlania próbki. Rysunek **(C)** przedstawia widmo absorpcji produktu degradacji fotosensybilizatora w PBS, otrzymanego podczas 20-minutowego naświetlania oświetlaczem diodowym 755nm (czarna linia), w obecności BSA (czerwona linia) oraz w micelach TX-100 (niebieska linia). **(D)** Widmo absorpcji produktu otrzymanego podczas naświetlania 20 μ M WST11 w obecności 0,5mM BSA.

W celu sprawdzenia, czy postępująca fotodegradacja jest związana z utlenianiem fotosensybilizatora, przeprowadzono ten sam eksperyment w środowisku beztlenowym. Zarówno w MeOH jak i w PBS zauważono znaczne spowolnienie tempa procesu fotodegradacji, lecz nie został on całkowicie zahamowany (Rys.24(A,B)). Produkty długotrwałego naświetlania są te same co w obecności tlenu.



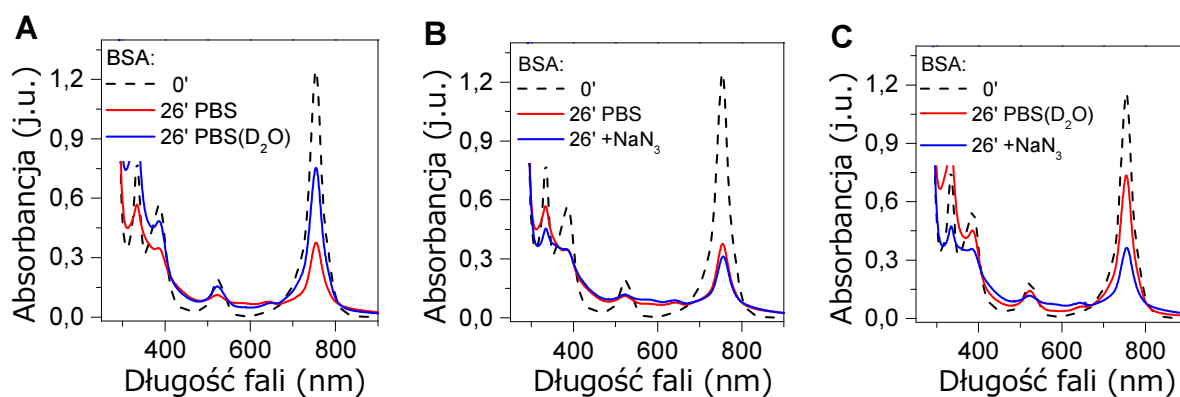
Rys.24 Postępująca fotodegradacja 20 μ M WST11 w **(A)** PBS oraz **(B)** MeOH indukowana światłem 755nm w warunkach beztlenowych (otrzymanie warunków beztlenowych oraz przebieg pomiaru opisano w metodach). Strzałkami zaznaczono zmiany w widmie absorpcji zachodzące w czasie naświetlania próbki.

Aby sprawdzić czy na przebieg procesu fotodegradacji ma wpływ tlen singletowy, wykonano pomiary w środowisku PBS(D₂O), w którym tlen singletowy charakteryzuje się co najmniej 10-krotnie dłuższym czasem życia. W tych warunkach zaobserwowano mniejszą akumulację chlorynowego produktu degradacji WST11 z jednoczesnym nieco silniejszym narastaniem absorpcji w obszarze 450-600nm (Rys.25(A)). Dodanie fizycznego wygaszacza tlenu singletowego, azydku sodu, zarówno w PBS jak i w PBS(D₂O), spowodowało spowolnienie procesu fotodegradacji i akumulacji produktu (Pd-Chloryny) o charakterystycznych pasmach w obszarze Soreta oraz 644nm (Rys.25(B,C)). Podobny efekt zaobserwowano dodając chemiczny wygaszcz tlenu singletowego, (1mM) histydynę (wyników nie pokazano).



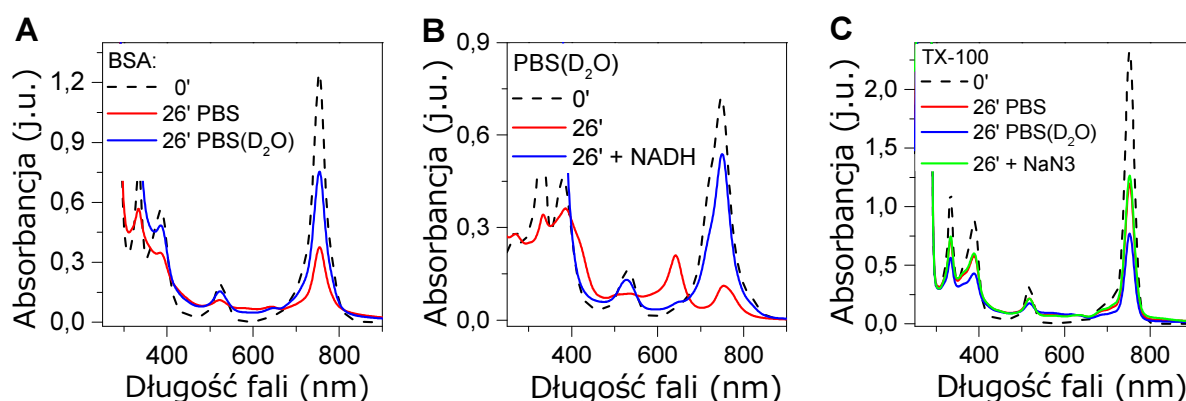
Rys.25 Zestawienie widm absorpcji 20 μ M WST11 przed i po 26-minutowym naświetlaniu wiązką lasera o długości fali 532nm w **(A)** PBS i PBS(D₂O), **(B)** PBS i w PBS po wprowadzeniu 5mM NaN₃, **(C)** PBS(D₂O) i w PBS(D₂O) po wprowadzeniu 5mM NaN₃.

W obecności 0,5mM BSA zamiana środowiska PBS na PBS(D₂O) skutkuje znacznym spowolnieniem procesów fotodegradacyjnych (Rys.26(A)). Wprowadzenie do układów azydku sodu przyspieszyło proces tylko w nieznacznym stopniu w PBS, natomiast blisko dwukrotnie w PBS(D₂O) (Rys.26(B, C)). Produkty procesu fotodegradacji wydają się być jednakowe we wszystkich badanych przypadkach.



Rys.26 Zestawienie widm absorpcji 20 μ M WST11 z 0,5mM BSA przed i po 26minutowym naświetlaniu wiązką lasera o długości fali 532nm w **(A)** PBS i PBS(D₂O), **(B)** PBS i w PBS po wprowadzeniu 5mM NaN₃, **(C)** PBS(D₂O) i w PBS(D₂O) po wprowadzeniu 5mM NaN₃.

Dodanie NADH z kolei powoduje nie tylko spowolnienie procesu fotodegradacji, ale również znacznie słabszą produkcję produktu chlorynowego. Obserwowany efekt jest znacznie silniejszy po zmianie środowiska na ciężką wodę, natomiast dodanie NaN₃ przyspieszyło fotodegradację fotosensybilizatora. Wyniki pokazano na (Rys.27(A,B)).



Rys.27 Zestawienie widm absorpcji 20 μ M WST11 przed i po 26-minutowym naświetlaniu wiązką lasera o długości fali 532nm w **(A)** PBS, PBS z 1mM NADH oraz PBS z 1mM NADH i 5mM NaN₃, **(B)** PBS(D₂O) i w PBS(D₂O) z 1mM NADH **(C)** w 0,5% TX-100/PBS, 0,5% TX-100/ PBS(D₂O) oraz 0,5% TX-100/PBS(D₂O) z 5mM NaN₃

Sprawdzono wpływ ciężkiej wody na procesy fotodegradacji WST11 w środowisku micelnym. Zaobserwowano szybszy rozpad fotosensybilizatora, który uległ spowolnieniu po wprowadzeniu 5mM azydki sodu. Produkty procesu fotodegradacji natomiast nie ulegają zmianie.

Przeprowadzone pomiary fotodegradacji WST11 w wodzie destylowanej pokazały większą jego stabilność, natomiast produkty końcowe nie różnią się od tych otrzymanych w PBS (wyników nie pokazano).

4.1.2. Femto- i pikosekundowa fotoliza błyskowa z WST11

Wyniki badań wpływu różnych czynników na widmo absorpcji oraz na proces degradacji pozwoliły na w miarę optymalny dobór długości fali wzbudzenia fotosensybilizatora WST11. Zastosowanie fal o długości z zakresu UV może skutkować wzbudzeniem innych składników badanych próbek, z kolei zastosowanie fal o długości do 450nm mogłoby skutkować w wydajnym wzbudzaniu produktów degradacji fotosensybilizatora. Chociaż najwłaściwszą długością fali wydaje się być 750nm, to ze względu na ograniczoną dostępność tego typu źródła światła oraz braku próbek referencyjnych oraz ze względu na ważne informacje, które może nieść ze sobą obszar pasma Q_y (w laserowej fotolizie błyskowej), zdecydowano przeprowadzić pomiary wzbudzając WST11 długością fali 520-532nm. W niektórych pomiarach, z powodu

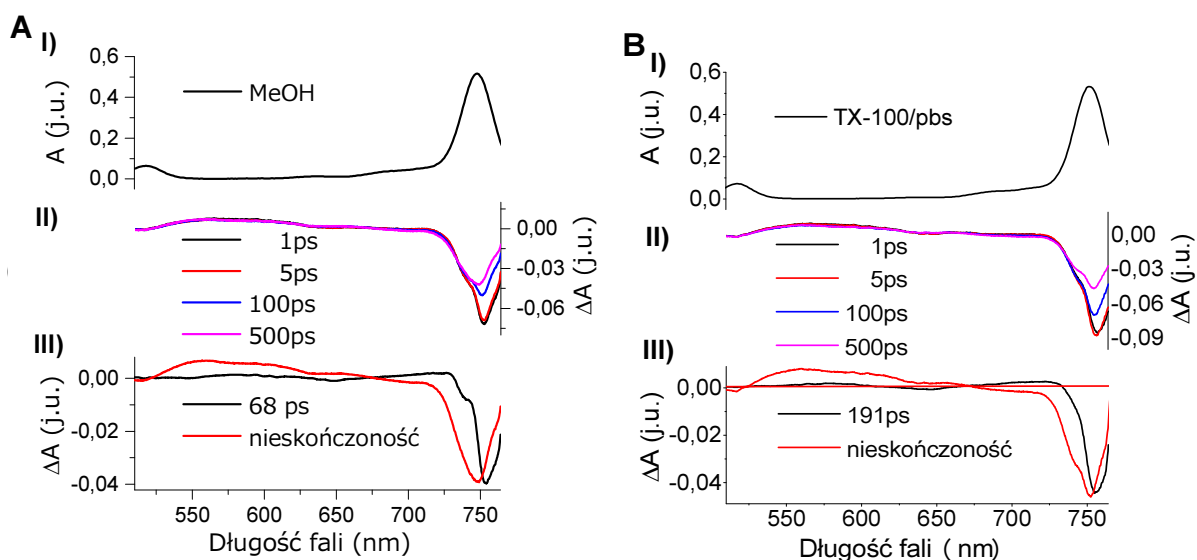
problemów technicznych, użyto długości fali 400nm. Ta zamiana nie miała wpływu na obserwowane procesy.

Podstawowe właściwości fotofizyczne WST11 i jego form przejściowych w pierwszych femto- i pikosekundach po absorpcji fotonów impulsu laserowego, zostały zmierzone techniką femto-piko-sekundowej laserowej fotolizy błyskowej. Zakres czasowy pozwala na rejestrację widm krótkożyjących niestabilnych stanów przejściowych, między innymi wzbudzonego stanu singletowego, oraz jego ewolucji i przejścia do wzbudzonego stanu trypletowego. Jak sprawdzono, w tym przedziale czasowym tlen nie ma wpływu na rejestrowane sygnały, gdyż typowa szybkość oddziaływania tlenu z trypletem jest rzędu 10^9 (wykonano pomiary kontrolne danych w niniejszej pracy nie zamieszczono). W celu zmniejszenia prawdopodobieństwa procesu fotoutleniania fotosensybilizatora, próbki badano w środowisku pozbawionym tlenu. Podczas pomiarów nie zaobserwowano znacznej degradacji próbki. Ze względów technicznych, część pomiarów wykonano przy użyciu wiązki wzbudzającej o długość fali 400nm, jednak pomiary kontrolne potwierdziły, iż praktycznie identyczne wyniki otrzymano niezależnie od tego czy próbkę wzbudza się w B_x czy w Q_y (nie pokazano).

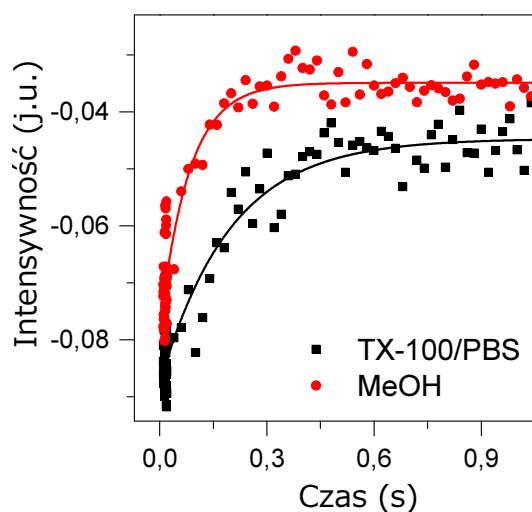
4.1.2.1. **Pikosekundowa fotoliza błyskowa dla WST11 w środowisku hydrofobowym**

Wzbudzenie WST11 w metanolu oraz w TX-100/PBS impulsem lasera o długości trwania 120fs prowadzi w ciągu 900fs do generacji indywiduów o szerokim widmie absorpcji w obszarze 525-675nm oraz ujemnej absorpcji stanu podstawowego, tzw. obszaru blaknięcia, z maksimum w 753nm. Ujemna absorpcja jest przesunięta w stronę fal dłuższych w porównaniu do absorpcji stanu podstawowego (Rys.28 I) & II)). W ciągu pierwszych 500ps od impulsu lasera nie zaobserwowano znacznych zmian w obszarze dodatniej absorpcji, podczas gdy w obszarze 730-765nm w obu przypadkach co najmniej 50% sygnału zanika. Wyodrębnienie poszczególnych komponent czasowych obserwowanego widma różnicowego absorpcji poprzez zastosowanie funkcji „Global Fit” (funkcja programu do obróbki danych – Surface Explorer Pro 2.2, która pozwala na rozkład obserwowanego widma różnicowego absorpcji na składowe widma różnicowe absorpcji przejściowej o jednakowych czasach zaniku) pokazało przesunięcie w kierunku fal dłuższych pasmo, zanikające z czasem połowicznego zaniku (67 ± 9)ps i (191 ± 37)ps, odpowiednio, dla WST11 w MeOH i TX-100/PBS. W celu dodatkowej weryfikacji

tych wyników zbadano również kinetykę zaniku sygnału przy 753nm (Rys.28). Wyznaczone czasy zaniku ujemnej absorpcji dla MeOH i TX-100/PBS wynoszą odpowiednio (77 ± 22) ps oraz (206 ± 43) ps i potwierdzają wartości otrzymane poprzednią metodą.



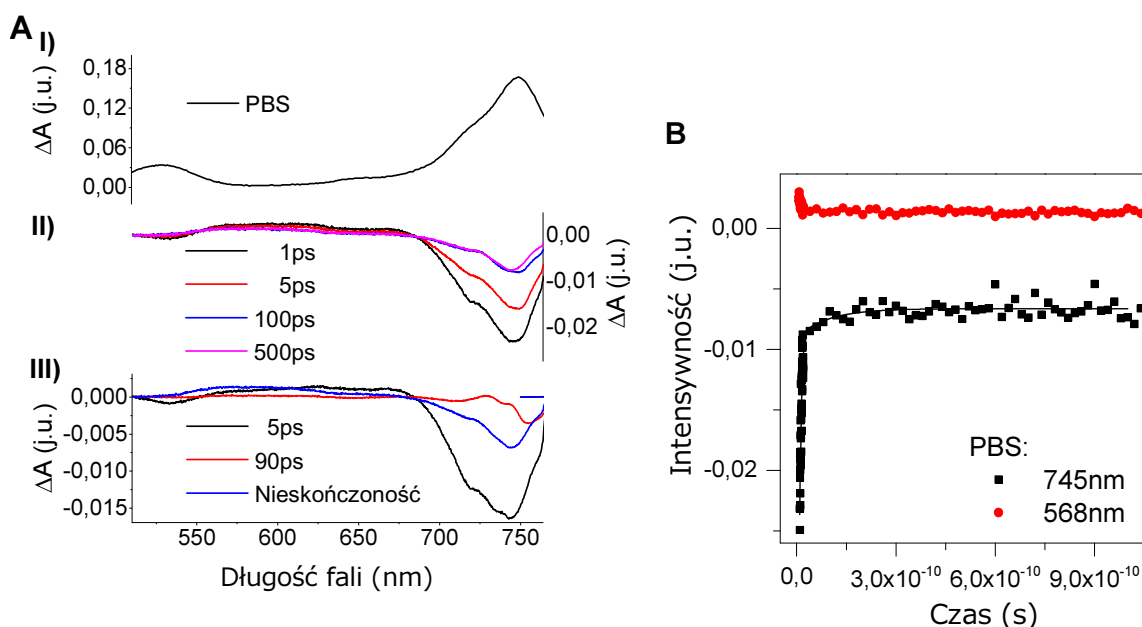
Rys.28 Zestawienie wyników dla 20μM WST11, o tej samej gęstości optycznej przy długości fali wzbudzenia 400nm, w **(A)** MeOH i **(B)** TX-100/PBS. Każdy rysunek składa się z **I)** widma absorpcji stanu podstawowego, **II)** widm różnicowych w punktach czasowych 1, 5, 100 i 500ps oraz **III)** komponent obserwowanego sygnału otrzymanych przez zastosowanie funkcji „Global Fit”. Jako „nieskończoność” oznaczono widmo różnicowe absorpcji, które pozostaje po 1,5nanosekundzie pomiaru. Próbkę wzbudzano 120fs impulsami laserowymi o długości fali 400nm i mocy 500μW. Do generacji wiązki światła próbkującego użyto kryształu CaF₂.



Rys.29 Zanik ujemnej absorpcji przejściowej przy 753nm otrzymanej dla WST11 w TX-100/PBS oraz w MeOH. Próbkę wzbudzano 120fs impulsami laserowymi o długości fali 400nm i mocy 500μW. Do generacji wiązki światła próbkującego użyto kryształu CaF₂

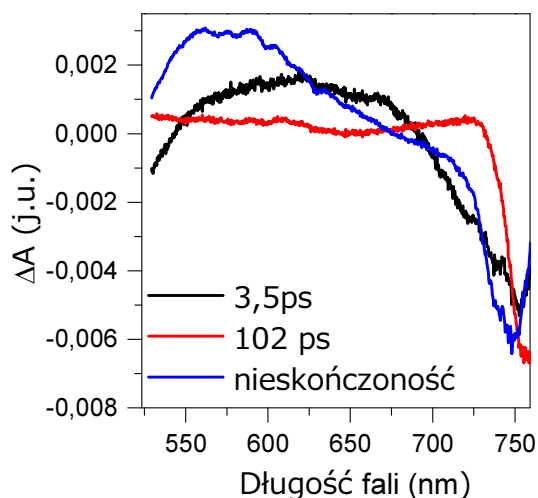
4.1.2.2. Pikosekundowa fotoliza błyskowa w środowisku wodnym

Wzbudzenie WST11, w buforze PBS, impulsem lasera o długości 400nm, przy której absorpcja tej próbki jest taka sama jak próbek w TX-100/PBS, umożliwia rejestrację widma różnicowego o niskiej intensywności i charakteryzującego się szerokimi pasmami absorpcji dodatniej i ujemnej. Jak pokazano, otrzymane widmo przypomina kształtem odwrócony przebieg absorpcji stanu podstawowego (Rys.30(A)). W czasie 0,5ns po impulsie lasera ponad 60% obserwowanego widma różnicowego zanika. Analiza kinetyki zaniku sygnału wykazała monoeksponencjalną zależność w zakresie 510-720nm, oraz dwueksponencjalną w obszarze 720-760nm (Rys.30(B)). Wyznaczone czasy zaniku wynosiły odpowiednio $(5,0 \pm 0,9)$ ps oraz $(4,8 \pm 0,7)$ i (92 ± 11) ps. Rekonstrukcję widm różnicowych stanów przejściowych umożliwiła funkcja „Global Fit” (Rys.30(A)).



Rys.30 (A) Wyniki piko-sekundowej laserowej fotolizy błyskowej dla WST11 w PBS. **I)** widmo absorpcji stanu podstawowego, **II)** widma różnicowych absorpcji obserwowanych po 1, 5, 100, 500ps po impulsie z lasera, **III)** widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych rejestrowanego sygnału otrzymane po zastosowaniu funkcji „Global Fit”. **(B)** Zanik absorpcji przejściowej przy 568 i 745nm otrzymanej dla WST11 w PBS. Źródłem światła próbującego był kryształ CaF_2 .

W wodzie destylowanej, gdzie stopień agregacji jest znacznie niższy niż w PBS, udział krótkożyjącej komponenty w obserwowanym sygnale jest znacznie mniejszy, podczas gdy rośnie udział składowej o stałej czasowej ~ 100 ps (Rys.31).

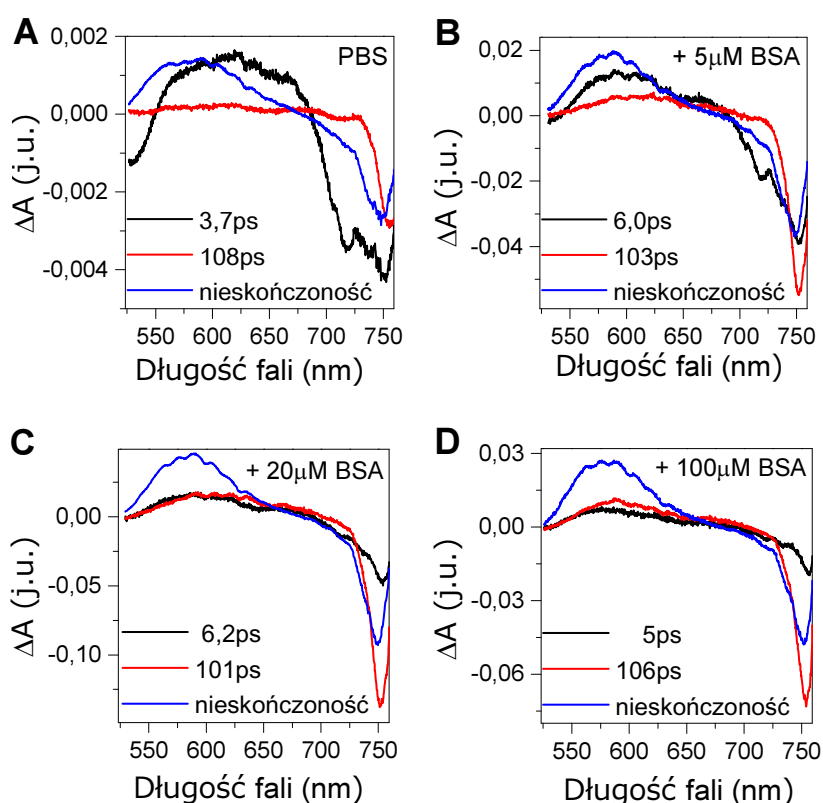


Rys.31 Widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych dla 20μM WST11 w wodzie destylowanej. Próbkę wzbudzano 120fs impulsami laserowymi o długości fali 525nm. Do generacji wiązki światła monitorującego użyto kryształu szafiru.

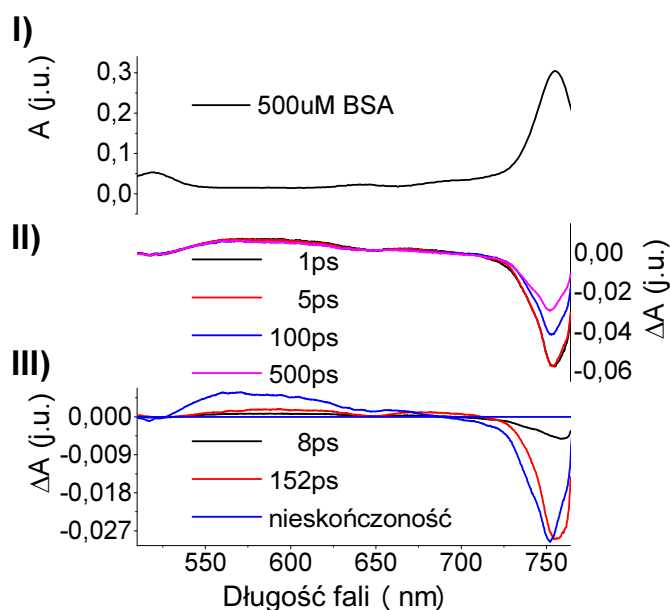
4.1.2.3. Wpływ BSA na stany przejściowe obserwowane w piko-sekundowej laserowej fotolizie błyskowej

Wprowadzenie BSA do układu WST11 + PBS oraz w wodzie destylowanej skutkowało zwiększeniem intensywności rejestrowanego sygnału, wysmukleniem ujemnej absorpcji oraz zanikiem krótkożyjącej pikosekundowej komponenty, przy jednoczesnym pojawieniu się długożyjącej komponenty obserwowanej przy około 760nm. Otrzymane wyniki, w formie widm różnicowych absorpcji poszczególnych stanów przejściowych, przedstawiono na (Rys.32).

W obecności 0,5mM BSA ewolucja widma różnicowego absorpcji przypomina zmiany obserwowane dla WST11 w MeOH lub TX-100 (Rys.33); pomimo tego udział krótkożyjącej składowej sygnału jest nadal widoczny. Wyznaczone czasy zaniku sygnału są dłuższe niż te w wodzie i wynoszą odpowiednio $(8 \pm 1)\text{ps}$ oraz $(151 \pm 13)\text{ps}$ Podobne wyniki otrzymano wprowadzając BSA do układu WST11 w środowisku wody destylowanej (wyników nie pokazano).

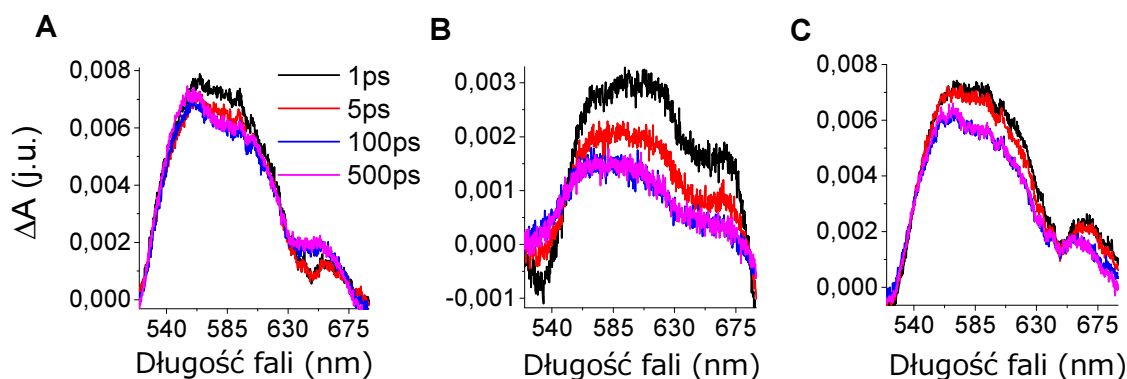


Rys.32 Widma różnicowe stanów przejściowych obserwowanych podczas pomiarów laserowej fotolizy błyskowej w pikosekundowej domenie czasowej dla 20μM WST11 **(A)** w PBS z **(B)** 5μM BSA **(C)** 20μM BSA oraz **(D)** 100μM BSA. Próbkę wzbudzano 120fs impulsami laserowymi o długości fali 525nm. Do generacji wiązki światła próbkującego/monitorującego użyto kryształu szafiru.



Rys.33 Wyniki z pikosekundowej laserowej fotolizy błyskowej dla 20μM WST11 z 0,5mM BSA w PBS. **I)** widmo absorpcji stanu podstawowego, **II)** widma różnicowe absorpcji obserwowanych po 1, 5, 100, 500ps po impulsie z lasera, **III)** widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych rejestrowanego sygnału otrzymane po zastosowaniu funkcji „Global Fit”. Próbkę wzbudzano 120fs impulsami laserowymi o długości fali 525nm i mocy 500μW. Do generacji wiązki światła próbkującego użyto kryształu CaF₂.

Bezpośrednie porównanie ewolucji absorpcji przejściowej WST11 o zakresie 520-700nm w pierwszych 500ps pokazano na Rys.34. Podczas gdy w metanolu i w BSA, absorpcja spada około 10-15%, w środowisku wodnym spadek ten wynosi blisko 60%.

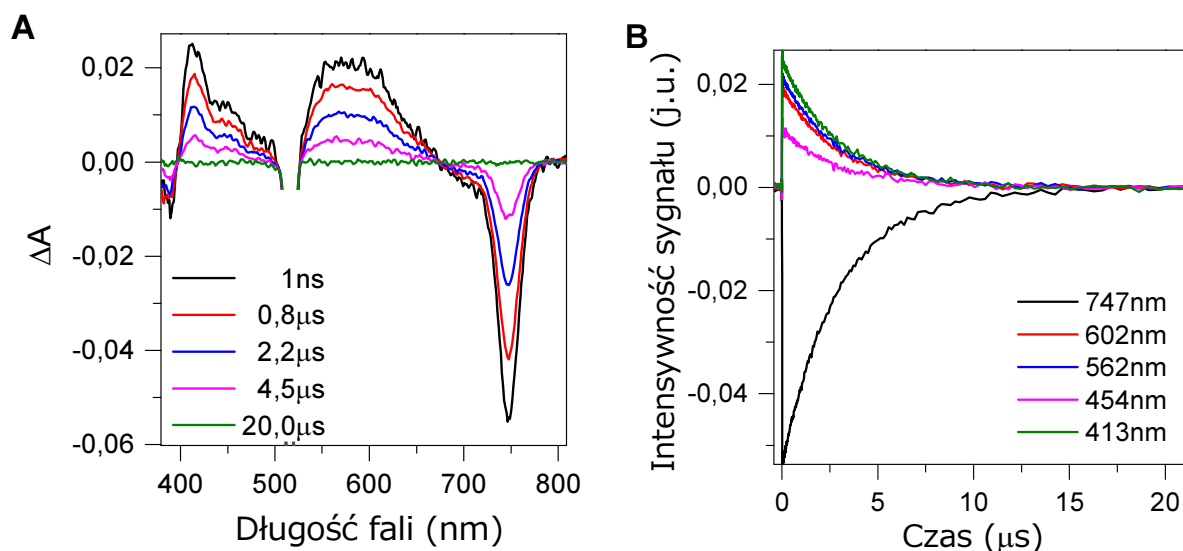


Rys.34 Widma różnicowe absorpcji dla 20μM WST11 obserwowane po 1, 5, 100, 500ps po impulsie z lasera, zarejestrowane odpowiednio w **(A)** MeOH, **(B)** PBS, **(C)** PBS + 0,5mM BSA.

4.1.3. Nano- i mikrosekundowa laserowa fotoliza błyskowa z WST11

4.1.3.1. Środowisko MeOH i TX-100

Wzbudzenie WST11 w MeOH i TX-100/PBS, w warunkach anaerobowych, w ciągu 1ns prowadzi do powstania wzbudzonego stanu trypletowego o szerokim widmie absorpcji w zakresie 390-500nm oraz 525-680nm (Rys.35(A)). Obserwowana ujemna absorpcja w obszarze <400nm oraz 680-790nm związana jest z blaknięciem stanu podstawowego. W obu badanych środowiskach stwierdzono monoeksponencjalny zanik intensywności sygnału, z czasami życia odpowiednio $(3,7 \pm 0,1)\mu\text{s}$ i $(4,5 \pm 0,3)\mu\text{s}$. Przykładowe widma różnicowe absorpcji, otrzymane w różnym czasie po wzbudzeniu WST11 w MeOH nasyconym argonem, oraz kinetyki zaniku sygnału w wybranych długościach fal pokazano na Rys.35 (B).



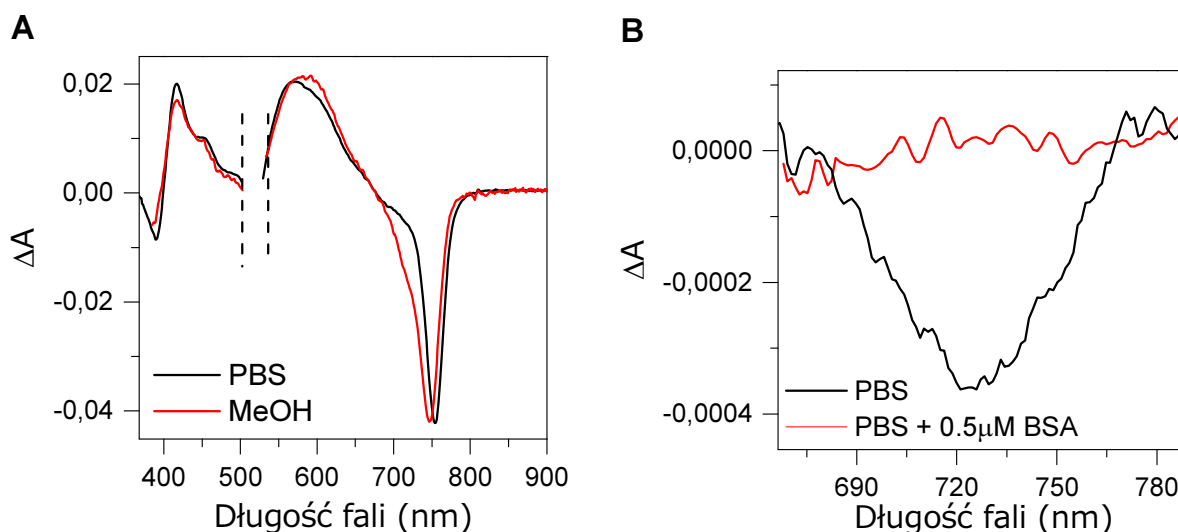
Rys.35 (A) Widmo różnicowe absorpcji dla WST11 w MeOH w warunkach beztlenowych otrzymane po 1ns, 0,8 μ s, 2,2 μ s, 4,5 μ s, 20 μ s po impulsie z lasera (525nm) **(B)** Kinetyki zaniku obserwowanej absorpcji przejściowej przy wybranych długościach fali.

Nasylenie próbek tlenem, poprzez 30-minutowe przedmuchiwanie próbki 100% tlenem, powoduje drastyczne - blisko 100-krotne-skrócenie czasu życia stanu trypletowego WST11 w MeOH, oraz 7,5-krotne w przypadku TX-100/PBS. Oszacowane stałe szybkości oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem cząsteczkowym wynoszą odpowiednio około $2,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (zakładając, że w równowadze z powietrzem $[\text{O}_2]_{\text{MeOH}} = 2,15\text{mM}$ [115]) oraz około $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (zakładając, że w równowadze z powietrzem $[\text{O}_2]_{\text{TX-100/PBS}} = 0,25\text{mM}$; chociaż znaleziono literaturowe $[\text{O}_2]_{\text{TX-100/PBS}} = 0,78\text{mM}$ [116], co skutkowało by w dodatkowym obniżeniu wyznaczonej stałej do wartości $4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Czasy życia wzbudzonego stanu trypletowego w badanych układach w warunkach beztlenowych, w równowadze z powietrzem i po nasyceniu 100% tlenem przedstawiono na końcu rozdziału w Tabeli 1.

4.1.3.2. Środowisko wodne

Wzbudzenie impulsem lasera o długości fali 525nm próbki WST11 w PBS, o absorbancji przy 525nm porównywalnej do absorbancji fotosensybilizatora w PBS, generuje około siedmiokrotnie słabszy sygnał. Porównanie znormalizowanych widm różnicowych absorpcji dla WST11 w PBS i MeOH, pokazało, że oprócz przesunięcia pasm związanych z wpływem rozpuszczalnika, ma miejsce poszerzenie pasma obszaru blaknięcia z charakterystycznym

ramieniem około 720nm, oraz trochę inny przebieg pasma absorpcji w obszarze 525-680nm (Rys.36). Obserwowany w środowisku wodnym tryplet zanika z szybkością odpowiadającą efektywnemu czasowi życia ($3,34 \pm 0,11 \mu s$), przy jednoczesnym odnawianiu się absorpcji stanu podstawowego. Wprowadzenie tlenu do próbki spowodowało ośmiokrotne skrócenie czasu życia trypletu fotosensybilizatora. Oszacowana stała szybkości oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem wynosi, $k_{PBS} \approx 2,5 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ (zakładając, że w równowadze z powietrzem $[O_2]_{PBS} = 0,25mM$ [117]). Co ciekawe, w warunkach tlenowych, po całkowitym zaniku absorpcji przejściowej wzbudzonego stanu trypletowego, wciąż obserwuje się słaby, niezanikający sygnał obszaru blaknięcia z maksimum przy około 725nm (Rys.36(B)).



Rys.36 (A) Znormalizowane widma różnicowe stanów przejściowych WST11 w PBS i MeOH otrzymane po zastosowaniu funkcji Global Fit. **(B)** Obserwowane po czasie 300 μs po impulsie lasera widmo różnicowe absorpcji w położeniu 725nm. Próbkę była wzbudzana 1mW wiązką lasera o długości fali 525nm.

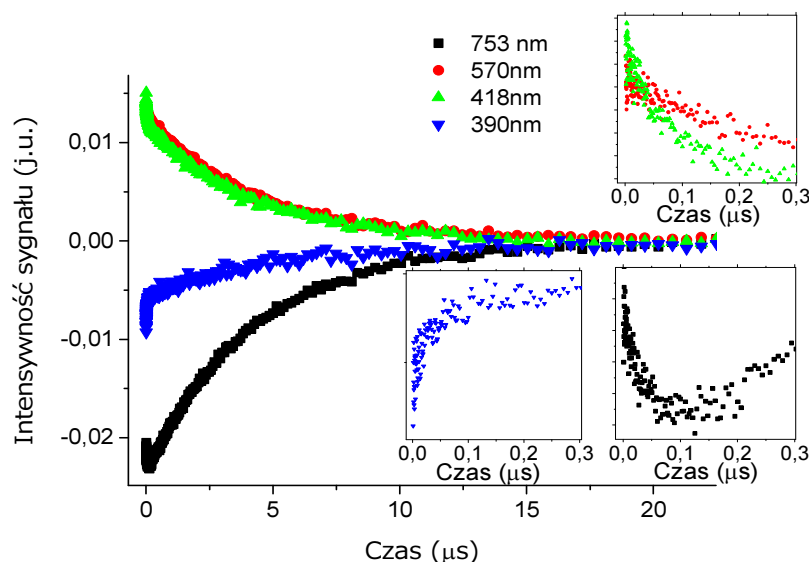
4.1.3.3. Nano- i mikrosekundowa fotoliza błyskowa dla WST11 w obecności BSA

Zbadano wpływ BSA na czas życia stanu trypletowego fotosensybilizatora. Wprowadzenie białka w wysokim stężeniu (0,5mM) do układu 20 μM WST11 + PBS spowodowało ponad trzykrotny wzrost amplitudy absorpcji wzbudzonego stanu trypletowego przy 560nm, natomiast przebieg rejestrowanego widma jest zbliżony do tego obserwowanego w środowisku micelarnym i MeOH (Rys.38). Zależność czasowa zaniku absorpcji przejściowej różni się od tej obserwowanej dla WST11 w PBS. Jest to proces dwuetapowy (Rys.37).

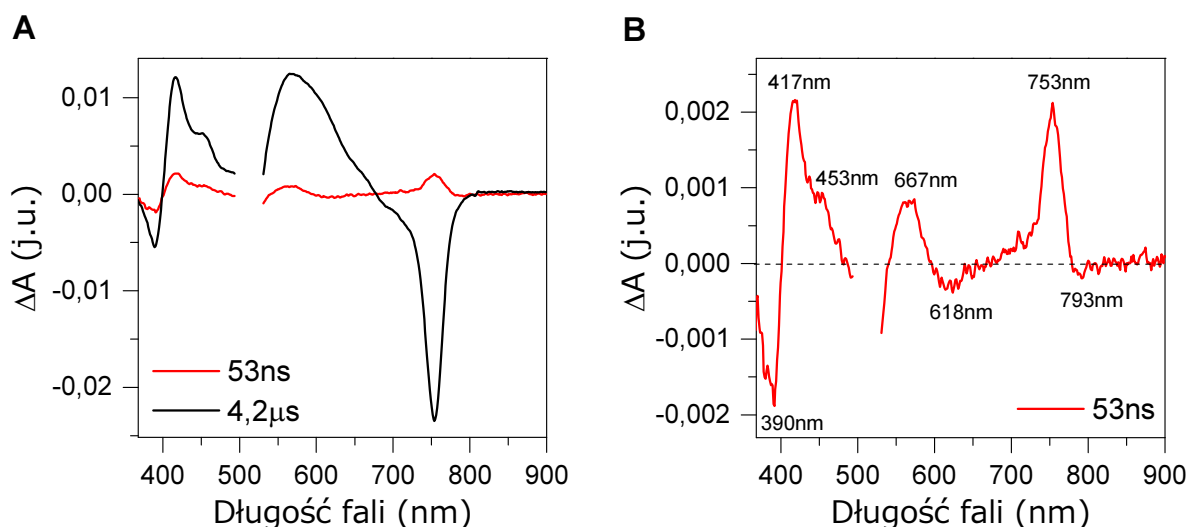
W pierwszych 200ns od impulsu lasera ma miejsce szybki proces o czasie trwania $0,05 \pm 0,01\mu\text{s}$, który tylko w niewielkim stopniu jest zależny od stężenia tlenu (Tab.1). Drugi, dłuższy proces, którego czas zaniku zależy od lokalnego stężenia tlenu, można przypisać wzbudzonemu stanowi trypletowemu WST11 (będącego w kompleksie z BSA). Rekonstrukcja widma różnicowego tego stanu przejściowego (przy użyciu funkcji Global Fit) pokazała pasma absorpcji w położeniach 417nm, 667nm i 753nm, oraz obszary blaknięcia przy 390nm, 618nm i 793nm (Rys.38(A,B)).

W szerszym zakresie czasowym obserwuje się powolny, eksponencjalny zanik trypletu kompleksu WST11-BSA ze stałą czasową $(3,34 \pm 0,11)\mu\text{s}$. W obecności tlenu następuje skrócenie czasu życia trypletu, jednak jedynie 2,6-krotnie. Oszacowana stała szybkości oddziaływania z tlenem jest zdecydowanie niższa niż we wcześniej badanych układach i wynosi $k_{\text{BSA/PBS}} \approx 3,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Po zaniku absorpcji wzbudzonego stanu trypletowego nie zarejestrowano żadnego sygnału (Rys.36B).

Podobne wyniki otrzymano w środowisku destylowanej wody. Parametry zaniku widm różnicowych absorpcji przejściowej przedstawiono w Tabeli 1.

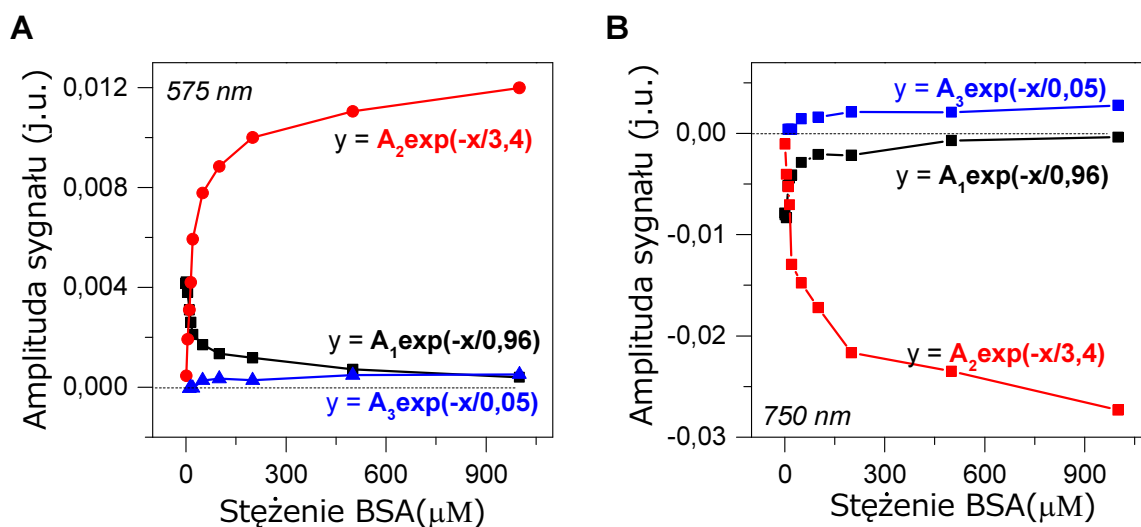


Rys.37. Dwuetapowy zanik sygnału obserwowany dla WST11 w PBS w obecności 0,5mM BSA. **Inserty** na wykresie obrazują początkowe 300ns sygnału, gdzie zaobserwowano stan przejściowy cząsteczki, o charakterystycznym czasie zaniku: 50ns. Kolory odpowiadają poszczególnym długościom fali, przy których badano kinetykę sygnału (legenda). Próbkę była wzbudzana 1mW wiązką lasera o długości fali 525nm.



Rys.38 (A) Widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych otrzymane w układzie 20μM WST11 z 0,5mM BSA w PBS metodą „Global Fit”. **(B)** Widmo różnicowe absorpcji stanu przejściowego o czasie życia 50ns obserwowanego podczas wzbudzenia WST11 w obecności BSA. Próbkę była wzbudzana 1mW wiązką lasera o długości fali 525nm.

Dodatkowo, zbadano czasy życia obserwowanych stanów przejściowych WST11 dla niskich stężeń BSA. Eksperyment przeprowadzono w warunkach równowagi z powietrzem dla 20μM stężenia badanego fotosensybilizatora. Korzystając z wcześniej otrzymanych wyników dla WST11 w PBS, w obecności i pod nieobecność BSA, dopasowano krzywą multieksponeńcjálną o trzech komponentach czasowych: 0,05μs, 0,96μs oraz 3,30μs. Krzywa wiernie odwzoruje zanik stanów przejściowych dla różnych stężeń BSA z przedziału od 0-1 mM. Śledzenie zmian amplitud poszczególnych komponent pozwoliło na obserwację formowania się kompleksu WST11-BSA oraz zaniku puli wolnych cząsteczek fotosensybilizatora. Otrzymane wyniki dla długości fali 575 oraz 750nm przedstawia Rys.39.



Rys.39 Zmiany wartości amplitud poszczególnych komponent obserwowanego zaniku widma różnicowego absorpcji otrzymanego podczas naświetlania (w 525nm) 20 μM WST11 w obecności BSA. Pokazano wyniki otrzymane przy długości fali **(A)** 575nm oraz **(B)** 750nm.

4.1.3.4. D₂O i tabela podsumowująca

Część badań przedstawionych w niniejszej pracy wykonano w środowisku ciężkiej wody, D₂O. W tym środowisku, czas życia wzbudzonego stanu trypletowego jest 1,4 krotnie dłuższy niż w środowisku H₂O. Podobnie w obecności BSA, czas życia trypletu dla kompleksu WST11-albumina w PBS(D₂O) jest dłuższy niż w PBS(H₂O) i wynosi $(5,2 \pm 0,4)\mu\text{s}$. Dodatkowo, środowisko wody deuterowanej wydłuża czas życia krótko żyjącej składowej widma różnicowego absorpcji o około 10%. Stałe oddziaływania z tlenem są nieco niższe niż w H₂O i wynoszą odpowiednio $2,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ oraz $2,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ z i pod nieobecność BSA (zakładając stężenie tlenu w próbce $[\text{O}_2]=0,28\text{mM}$ [100]).

Sprawdzono wpływ azydku sodu oraz NADH na czasy życia trypletu WST11 w różnych mikrośrodkach. Nie zauważono znaczących zmian po wprowadzeniu 5mM azydku sodu lub 1mM NADH. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela.1 Czasy życia stanów przejściowych WST11 w środowisku micelarnym 0,5%TX-100/PBS, w rozpuszczalniku organicznym MeOH, w WD, PBS i w PBS(D₂O) w obecności i pod nieobecność 0,5mM BSA, 1mM NADH, 5mM NaN₃. Doświadczenia przeprowadzono w warunkach beztlenowych, w równowadze z powietrzem oraz po nasyceniu 100% tlenem. Czasy życia wyznaczono z dopasowania pojedynczej lub podwójnej funkcji eksponentyjnej do zaniku sygnału absorpcji przejściowej w 580nm.

Rozpuszczalnik	Ar (μs)	Powietrze (μs)	O ₂ (μs)	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
TX-100/PBS	4,52 ± 0,12	1,91 ± 0,09	0,602 ± 0,021	1,2·10 ⁹
MeOH	3,74 ± 0,08	0,21 ± 0,03	0,035 ± 0,001	2,2·10 ⁹
PBS	2,34 ± 0,18	0,96 ± 0,02	0,28 ± 0,03	2,5·10 ⁹
PBS + NaN₃	2,24 ± 0,3	0,94 ± 0,2	0,33 ± 0,08	2,6·10 ⁹
PBS + NADH	2,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,29 ± 0,05	2,4·10 ⁹
PBS BSA	0,048 ± 0,010	0,052 ± 0,012	0,052 ± 0,009	3,0·10 ⁸
	4,27 ± 0,17	3,24 ± 0,11	1,62 ± 0,10	
PBS + BSA + NaN₃	0,050 ± 0,014	0,053 ± 0,017	0,050 ± 0,018	2,7·10 ⁸
	4,19 ± 0,21	3,26 ± 0,1	1,57 ± 0,1	
WD	2,36 ± 0,09	0,97 ± 0,01	0,29 ± 0,02	2,4·10 ⁹
WD + NADH	2,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,30 ± 0,03	1,9·10 ⁹
WD BSA	0,047 ± 0,008	0,051 ± 0,014	0,056 ± 0,012	2,4·10 ⁹
	4,25 ± 0,08	3,4 ± 0,2	1,95 ± 0,12	
D₂O(PBS)	3,21 ± 0,31	1,1 ± 0,1	0,35 ± 0,04	2,3·10 ⁹
D₂O(PBS) + NaN₃	3,3 ± 0,5	1,2 ± 0,1	-	2,1·10 ⁹
D₂O(PBS) + BSA	0,061 ± 0,012	0,065 ± 0,019	0,055 ± 0,014	2,1·10 ⁸
	5,2 ± 0,4	4,11 ± 0,17	2,06 ± 0,19	
D₂O BSA NaN₃	0,058 ± 0,011	0,062 ± 0,017	0,053 ± 0,017	2,0·10 ⁸
	5,32 ± 0,25	4,12 ± 0,21	1,67 ± 0,16	

4.1.4. Rozdzielczo czasowa detekcja tlenu singletowego przy 1270nm

Bakteriochlorofile charakteryzują się silną fosforescencją w bliskiej podczerwieni [118]. Dla WST09 [62], pochodnej należącej do tej samej rodziny co WST11, fosforescencja rozciąga się od ~1100 – 1500nm z maksimum przy 1170nm. Te właściwości Bakteriochlorofili komplikują interpretację wyników otrzymanych przy użyciu rozdzielczo-czasowej detekcji fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm. Problem jest szczególnie widoczny w środowiskach takich jak woda, gdzie czas życia tlenu singletowego jest krótki i zbliżony do czasu życia fosforescencji fotosensybilizatora. W takich przypadkach weryfikacji sygnału dokonano poprzez:

- pomiar luminescencji w próbce nasyconej argonem oraz nasyconej tlenem;
- użycie specyficznych wygaszaczy tlenu singletowego (takich jak NaN_3 , histydyna, DABCO). W niniejszej pracy korzystano głównie z fizycznego wygaszacza tlenu singletowego NaN_3 , którego obecność nie miała wpływu na czas życia fosforescencji fotosensybilizatora (nie pokazano);
- pomiar luminescencji w wybranych długościach fal między 1095-1355nm (co pozwoliło na porównanie obserwowanej emisji z emisją tlenu singletowego);
- wyznaczenie czasu życia komponenty fosforescencji pochodzącej od tlenu singletowego; czas życia $^1\text{O}_2$ jest charakterystyczny dla danego środowiska [110], [119] (przy założeniu braku zjawiska samowygaszania oraz braku dodatkowych akceptorów $^1\text{O}_2$ w badanym układzie).

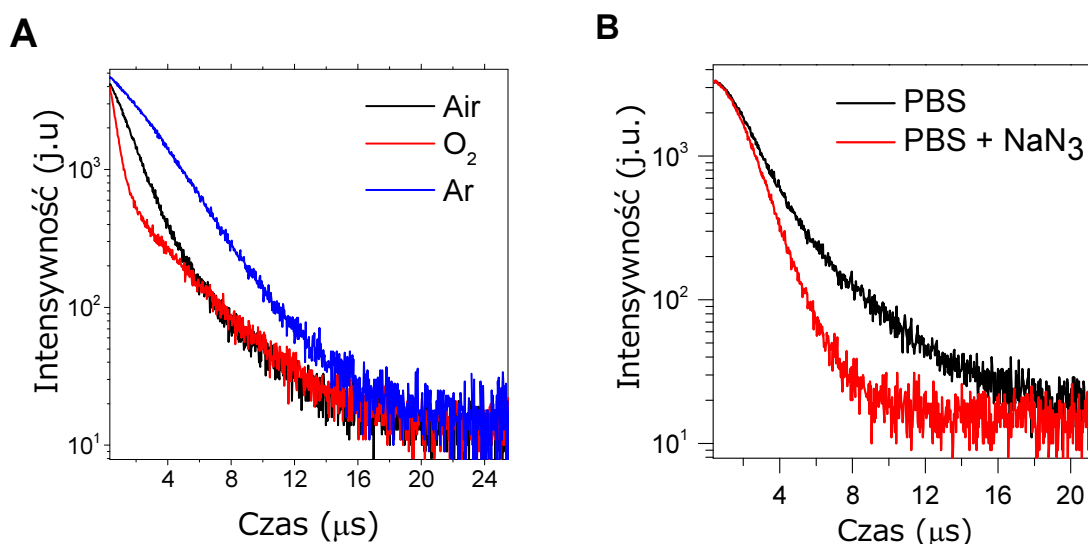
4.1.4.1. Generowanie tlenu singletowego w PBS i D_2O (PBS)

W pierwszej części pomiarów zbadano generowanie tlenu singletowego przez wzbudzenie WST11 w PBS światłem lasera o długości fali 532nm. Sygnał otrzymany w próbkach w równowadze z powietrzem w PBS pokazano na (Rys.40(A)). Silna fosforescencja związku utrudniała wydzielenie składowej pochodzącej od emisji tlenu singletowego.

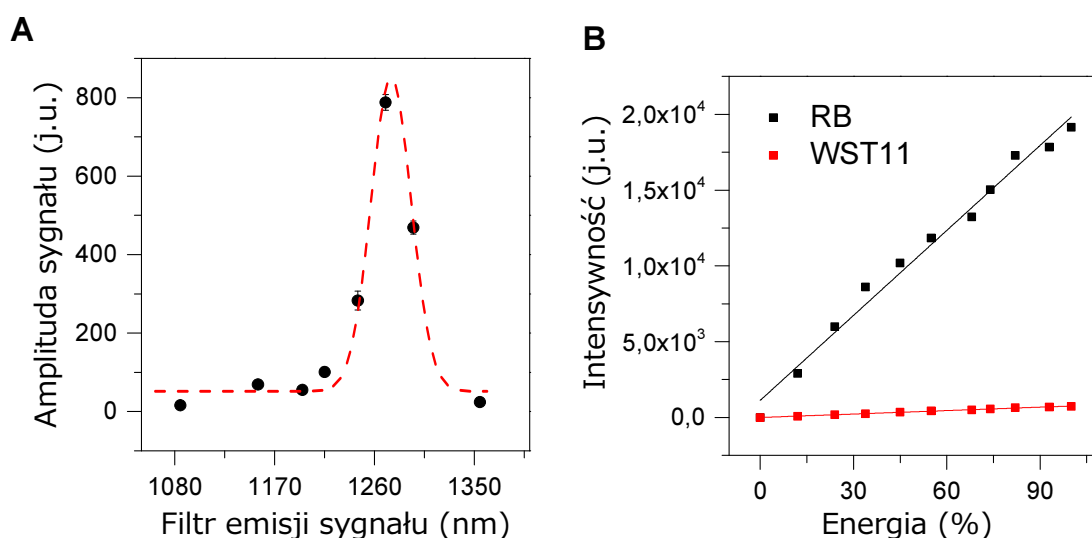
Nasycenie próbki tlenem skutkuje skróceniem czasu życia fosforescencji WST11 oraz wyodrębnieniem dłuższej składowej pochodzącej od fosforescencji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Nasycenie próbki argonem prowadzi do zaniku komponenty pochodzącej od tlenu singletowego i wzrostu czasu życia i intensywności fosforescencji fotosensybilizatora (Rys.40(A)). Stwierdzono,

że wprowadzenie 5mM azydku sodu wygasza składową sygnału luminescencji pochodzącej od tlenu singletowego (Rys.40(B)). Dopasowanie krzywej eksponencjalnej do pozostałego sygnału pozwoliło na oszacowanie czasu życia fosforescencji WST11, który w wodzie wynosi $(1,10 \pm 0,06)\mu\text{s}$. Zastosowanie większego stężenia azydku sodu nie miało dalszego wpływu na obserwowany sygnał (wyników nie pokazano). Wyznaczenie czasu życia fosforescencji WST11, pozwoliło także na wyznaczenie czasu życia tlenu singletowego w warunkach eksperymentu; do zaniku w czasie sygnału luminescencji z maksimum przy 1270nm, dopasowano funkcję będącą sumą dwóch eksponent (fosforescencji WST11 + $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$), co pozwoliło na wyznaczenie czasu życia tlenu singletowego, który wynosi $3,6 \pm 0,1\mu\text{s}$.

Detekcja luminescencji przy różnej długości fali z zakresu 1095-1355nm (w tym celu zastosowano filtry wąskopasmowe), a następnie dopasowanie do każdego sygnału funkcji będącej sumą eksponent fosforescencji WST11 i $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, pozwoliło na odtworzenie przebiegu emisyjnego fosforescencji tlenu singletowego (Rys.41(A)). Dla próbki zrównoważonej z powietrzem wyznaczona wydajność generowania tlenu singletowego wynosi $0,028 \pm 0,004$ (Rys.41(B)). Jako standardu użyto 4,5,6,7-czterochloro-2',4',5',7'-czteroiodo fluorescyny (róż bengalski, RB) o wydajności w H_2O : 0,75 [120].

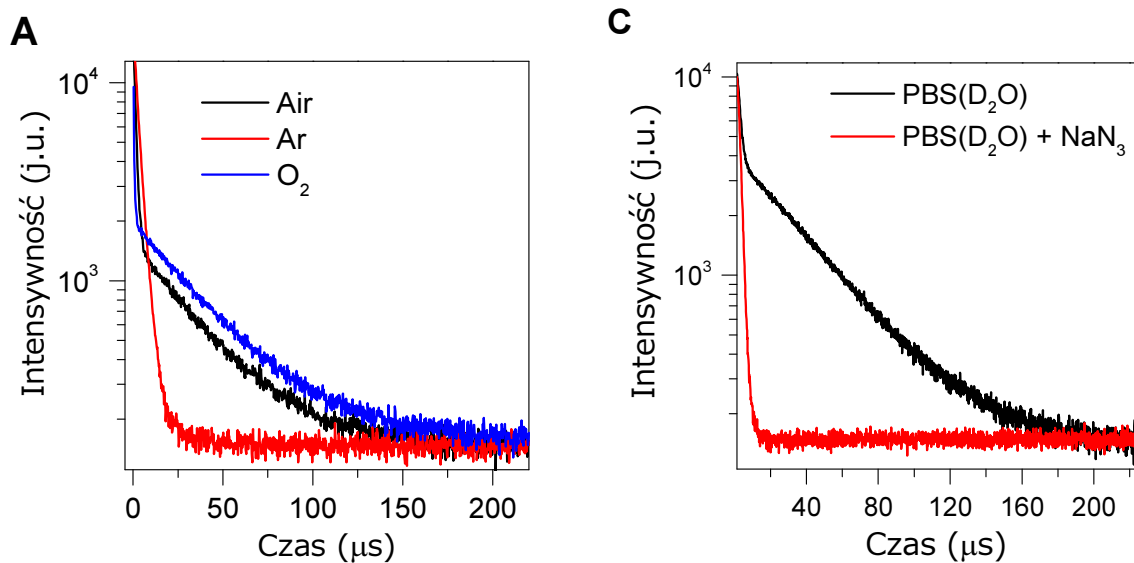


Rys.40 (A) Zanik sygnału luminescencji przy 1270nm powstałej w wyniku wzbudzenia próbki 20 μM WST11 w wodzie w równowadze z powietrzem, po nasyceniu argonem i po nasyceniu tlenem. **(B)** Wpływ 5mM NaN_3 na zanik obserwowanej przy 1270nm luminescencji.

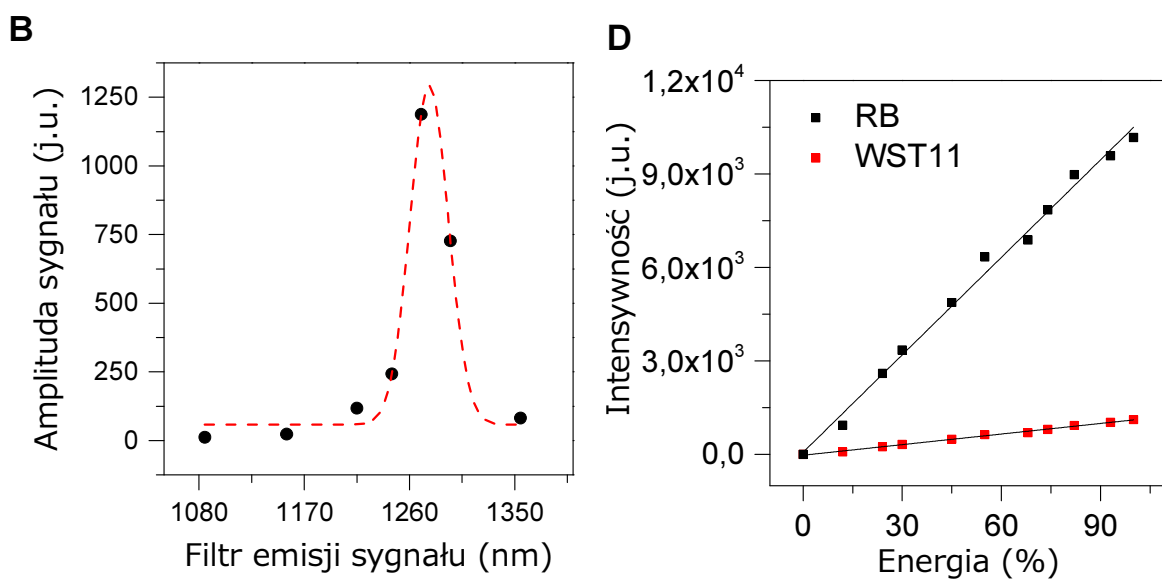


Rys.41 (A) Intensywność fosforescencji tlenu singletowego w zależności przy jakiej długości fali rejestrowano sygnał (próbki stanowi 20 μ M WST11 w PBS). **(B)** Zależność początkowej intensywności fosforescencji tlenu singletowego w 1270nm od energii promieniowania wzbudzającego (532nm) dla 20 μ M WST11 w PBS oraz dla rózu bengalskiego (RB) o tej samej absorpcji w 532nm.

Część pomiarów wykonano na próbkach, w których zwykły PBS zamieniono na PBS zawierający ciężką wodę, **PBS(D₂O)**. Wyznaczony w tym środowisku czas życia tlenu singletowego wzrasta do $(34 \pm 1)\mu$ s, natomiast czas fosforescencji fotosensybilizatora zmienia się tylko w nieznacznym stopniu i wynosi $(1,54 \pm 0,08)\mu$ s. Zarejestrowany czas życia tlenu singletowego jest w przybliżeniu o połowę niższy niż czas życia tlenu singletowego otrzymanego dla standardu, RB, w tym samym środowisku. Nasycenie próbki tlenem spowodowało wzrost, natomiast nasycenie argonem powodowało całkowity zanik sygnału charakterystycznego dla tlenu singletowego (Rys.42(A)). Na Rys.42(B), 43(A) pokazano wpływ azydku sodu oraz zależność intensywności fosforescencji tlenu singletowego od długości fali. Wydajność kwantowa fotogenerowania tlenu singletowego przez WST11 w PBS(D₂O) wynosi $0,078 \pm 0,005$ (wyznaczono względem RB, którego wydajność generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w D₂O wynosi 0,75 [120]).

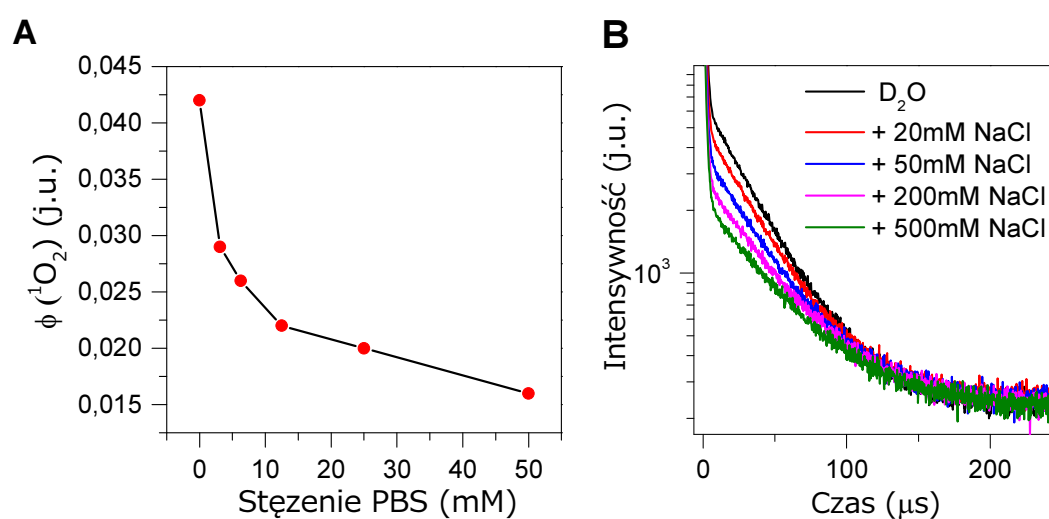


Rys.42 (A) Roztwór 20 μM WST11 w PBS(D₂O) wzbudzony impulsem lasera o długości fali 532nm. (A) Zanik fosforescencji od tlenu singletowego przy 1270nm po przedmuchaniu argonem, w warunkach równowagi z powietrzem i nasyceniu 100% O₂. (B) Efekt azydku sodu na obserwowaną luminescencję przy 1270nm.



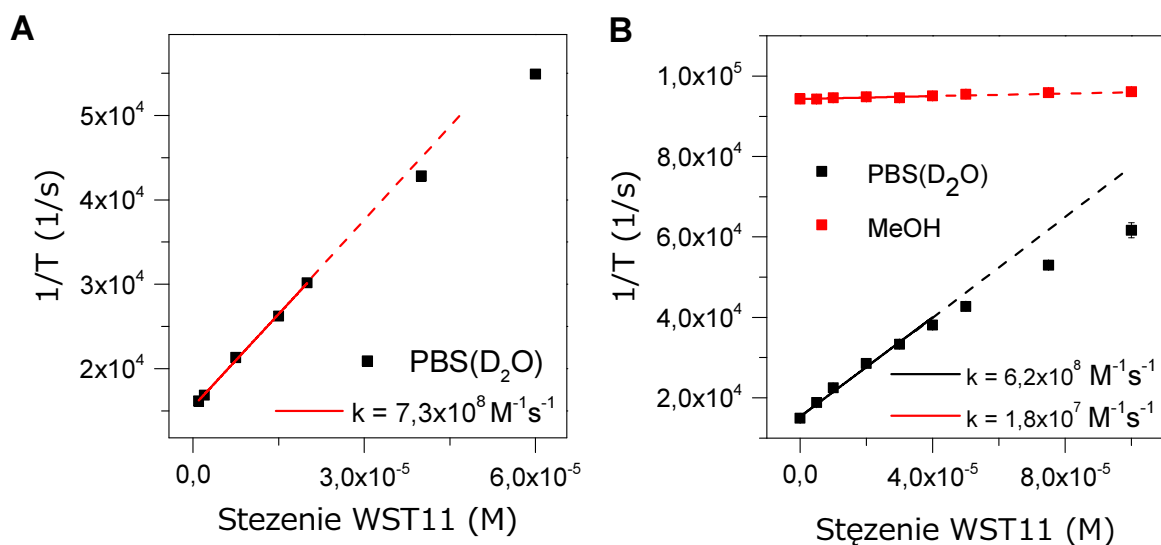
Rys.43 (A) Zależność intensywności fosforescencji tlenu singletowego w zależności od długości fali, przy której rejestrowano sygnał (próbkę stanowi 20μM WST11 w PBS) (B) Zależność początkowej intensywności fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm od energii promieniowania wzbudzającego (532nm) dla 20μM WST11 w PBS(D₂O) oraz dla RB o tej samej absorpcji w 532nm.

Sprawdzono, czy zjawisko agregacji fotosensybilizatora ma wpływ na wydajność kwantową generowania tlenu singletowego przez WST11. W tym celu przeprowadzono pomiary w środowisku wodnym o różnej sile jonowej, którą uzyskano poprzez odpowiednie rozcieńczanie stężonego (0,1M) roztworu buforu PBS (Rys.44(A)). Zaobserwowano spadek wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego wraz ze wzrostem sił jonowych. Dodatkowo pokazano, iż dodawanie NaCl, do układu 20μM WST11 w D₂O, skutkuje spadkiem intensywności rejestrowanego sygnału fosforescencji tlenu singletowego. Wyniki przedstawiono na Rys.44(B).



Rys.44 (A) Zależność wydajności generowania tlenu singletowego przy udziale 20μM WST11 wzbudzanego w 532nm od siły jonowej indukowanej poprzez rozcieńczenie stężonego (0,1M) buforu PBS. Rysunek **(B)** pokazuje wpływ NaCl na intensywność fosforescencji ¹O w 1270nm.

Podczas pomiarów z WST11 w środowisku ciężkiej wody zauważono, iż wzrost stężenia WST11, powodował skrócenie czasu życia fosforescencji ¹O₂(¹Δ_g). Wyznaczona stała auto-gaszenia wynosi $(7,3 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rys.45(A)). Przeprowadzono dodatkowe badania, gdzie źródłem tlenu singletowego był RB wzbudzany w 560nm (w celu zminimalizowania prawdopodobieństwa wzbudzenia WST11), natomiast akceptorem dodawany WST11. Zaobserwowano skrócenie czasu życia tlenu singletowego wraz ze wzrostem stężenia dodawanego WST11 w PBS(D₂O), natomiast w MeOH nie zaobserwowano znacznych zmian w czasie zaniku fosforescencji ¹O₂(¹Δ_g). Otrzymana stała gaszenia w tych warunkach wynosi $(6,2 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



Rys.45 Zależność stałej szybkości zaniku sygnału fosforescencji $^1\text{O}_2$ od stężenia WST11 (**A**) mierzona w układzie, gdzie do generowania tlenu singletowego użyto Rózu Bengalskiego (**B**) mierzona w obecności samego fotosensybilizatora WST11. W obliczeniach stałej szybkości pominięto punkty dla wysokich stężeń, które odbiegają od spodziewanej liniowej zależności, w celu otrzymania dokładniejszej wartości w obszarze niskich i pośrednich stężeń. Próbkę była naświetlana 3-4ns impulsami laserowymi o długości fali 532nm.

4.1.4.2. Wydajność kwantowa generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w różnych środowiskach

Zbadano wydajność kwantową generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w różnych układach modelowych. Wyniki zebrano w Tabeli 2. Podczas gdy w środowisku hydrofilowym wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego jest stosunkowo niska, wydajność ta wzrasta ośmiokrotnie w obecności miceli 0,5%TX-100. Wartości wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego otrzymane w środowisku zawierającym ciężką wodę są niemal dwukrotnie wyższe. Zdolność generowania $^1\text{O}_2$ wzrasta do 0,83 w MeOH, podczas gdy w acetonie wynosi 1.

Tab.2 Wydajności kwantowe fotogeneracji tlenu singletowego przez 20μM WST11 zmierzone w różnych mikrośrodkach nasyconych powietrzem. Pomiar przeprowadzono metoda rozdzielczej czasowo detekcji fosforescencji $^1\text{O}_2$ przy wzbudzeniu promieniowaniem lasera impulsowego o długości 523nm. Jako standard zastosowano róż bengalski o wydajnościach kwantowych generowania $^1\text{O}_2$ (ϕ): $\phi_{\text{PBS}} = 0,75$; $\phi_{\text{D}_2\text{O}} = 0,75$; $\phi_{\text{TX-100/PBS}} = 0,75$; $\phi_{\text{MeOH}} = 0,78$; $\phi_{\text{acetone}} = 0,79$; [120])

Rozpuszczalnik	$\phi(^1\text{O}_2)$ (j.u.)
WD	$0,042 \pm 0,004$
PBS	$0,028 \pm 0,004$
D ₂ O	$0,12 \pm 0,01$
PBS(D ₂ O)	$0,078 \pm 0,005$
TX-100/PBS	$0,27 \pm 0,02$
TX-100/PBS(D ₂ O)	$0,52 \pm 0,03$
MeOH	$0,83 \pm 0,02$
Aceton	$1,04 \pm 0,05$

4.1.4.3. Wpływ lokalnego stężenia tlenu na wydajności generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$

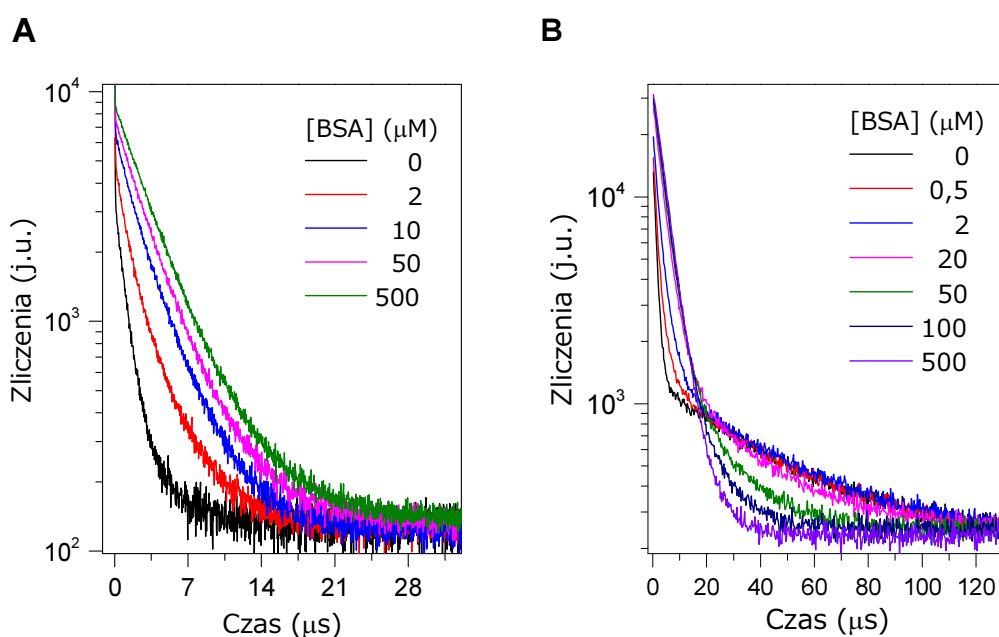
Sprawdzono wpływ stężenia tlenu na wydajność kwantową fotogenerowania tlenu singletowego przez WST11. Pomiary wykonano dla 20μM WST11 w PBS(D₂O), oraz w TX-100/PBS(D₂O). Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 3. W obu badanych układach zauważono gwałtowny spadek wydajności kwantowej fotogeneracji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w niskich stężeniach tlenu, podczas gdy nasycenie próbki tlenem nie przynosi już tak dużego efektu.

Tab.3 Wydajności kwantowe fotogeneracji tlenu singletowego przez 20μM WST11w **(A)** PBS(D₂O) oraz **(B)** TX-100/ PBS(D₂O), zmierzone przy różnym stężeniu tlenu. Jako stężenie tlenu rozumie się tu procentową zawartość O₂ w mieszance gazowej, którą przedmuchiwano próbkę (patrz– podrozdział 3.2.8.) Pomiar przeprowadzono metodą rozdzielczej czasowo detekcji fosforescencji $^1\text{O}_2$ przy wzbudzeniu promieniowaniem lasera impulsowego o długości 523nm. Jako standard zastosowano RB.

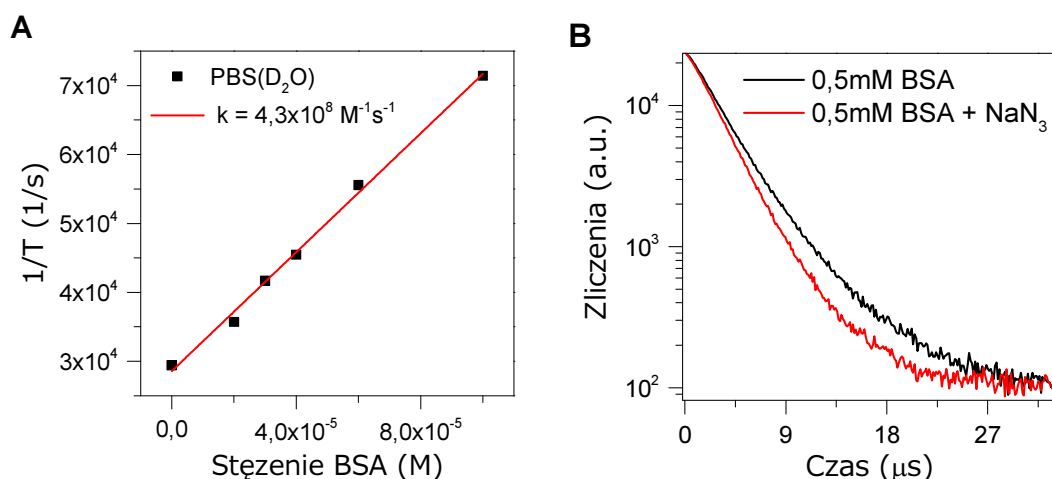
A	20μM WST11 w PBS(D ₂ O)		B	20μM WST11 w TX-100/PBS(D ₂ O)	
	Stężenie tlenu	$\phi(^1\text{O}_2)$ (j.u.)		Stężenie tlenu	$\phi(^1\text{O}_2)$ (j.u.)
	100%	$0,122 \pm 0,012$		100%	$0,85 \pm 0,02$
	22%	$0,078 \pm 0,09$		22%	$0,57 \pm 0,03$
	8%	$0,051 \pm 0,08$		8%	$0,30 \pm 0,01$
	1%	$0,012 \pm 0,04$		1%	$0,06 \pm 0,01$

4.1.4.4. Wpływ BSA na fotogenerację tlenu singletowego

Na Rys.46(A) pokazano zmiany w sygnale luminescencji przy 1270nm generowanej przez WST11 w PBS po wprowadzeniu BSA w różnych stężeniach. Obecność białka powoduje wzrost sygnału fosforescencji samego związku oraz wydłuża jego czas życia z $(1,21 \pm 0,02)\mu\text{s}$ do $(2,43 \pm 0,03)\mu\text{s}$. Identyfikacja i wyodrębnienie kilka rzędów słabszej luminescencji tlenu singletowego staje się przez to bardzo utrudnione czy wręcz niemożliwe. Analogiczne pomiary w PBS(D₂O) pozwoliły zaobserwować, że oprócz wzrostu intensywności i czasu życia fosforescencji WST11 ma miejsce skrócenie czasu życia komponenty sygnału pochodzącej od luminescencji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Rys.46(B)). Wyznaczona stała reakcji tlenu singletowego z BSA w PBS(D₂O), wynosi $(4,3 \pm 0,2) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rys.47). Przy wysokich stężeniach albuminy (0,5mM), czas życia tlenu singletowego jest zbliżony do czasu zaniku fosforescencji kompleksu WST11-BSA, co uniemożliwia wyodrębnienie komponenty pochodzącej od $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ z rejestrowanego sygnału luminescencji. Wciąż obserwuje się niewielki wpływ NaN_3 .



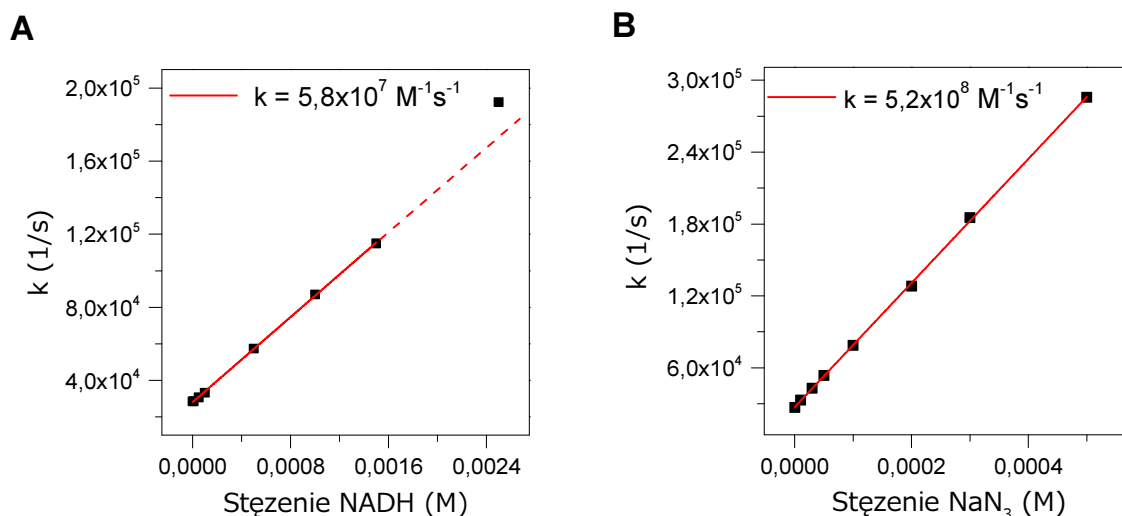
Rys.46 Zanik emisji w podczerwieni (1270nm) po wzbudzeniu **(A)** 15 μM WST11 w PBS, oraz **(B)** 20 μM WST11 w PBS(D₂O), w obecności różnych stężeń BSA impulsem z lasera o długości 532nm. Próbkę były nasycone powietrzem.



Rys.47 (A) Zależność stałej szybkości zaniku sygnału fosforescencji $^1\text{O}_2$ od stężenia BSA zmierzona w PBS(D₂O). **(B)** Wpływ azydku sodu (5mM) na zanik fosforescencji tlenu singletowego mierzonego przy 1270nm dla 20 μM WST11 z 0,5mM BSA wzbudzonych impulsami lasera o długości 532nm.

4.1.4.5. Wyznaczenie stałych gaszenia $^1\text{O}_2$ dla NADH i NaN₃

W obecności wzrastających stężeń NADH, często stosowanego w tej pracy donora elektronu, czas życia tlenu singletowego fotogenerowanego przez 20 μM WST11 w PBS(D₂O) skraca się, a wyliczona stąd stała szybkości oddziaływania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ z NADH wynosi $(5,8 \pm 0,1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ i jest zbliżona do wartości podanej w literaturze [121]. Dodatkowo, wyznaczono stałą gaszenia tlenu singletowego przez azyd sodu: $(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, która jest nieco większa niż podano w literaturze [109]. Wyniki przedstawiono na rysunku (Rys. 48).



Rys.48 Zmierzona w PBS(D₂O) zależność stałej szybkości zaniku sygnału fosforescencji ¹O₂ od stężenia **(A)** NADH oraz **(B)** NaN₃. Próbkę była naświetlana 3-4ns impulsami laserowymi o długości fali 532nm. Wykonując regresję liniową celowo opuszczono punkt pomiarowy wykonany przy wysokim stężeniu NADH, gdyż znacznie odstaje od spodziewanej zależności i wprowadzałby dodatkowy błąd w wyniku.

4.1.5. Pomiary fotokonsumpcji tlenu

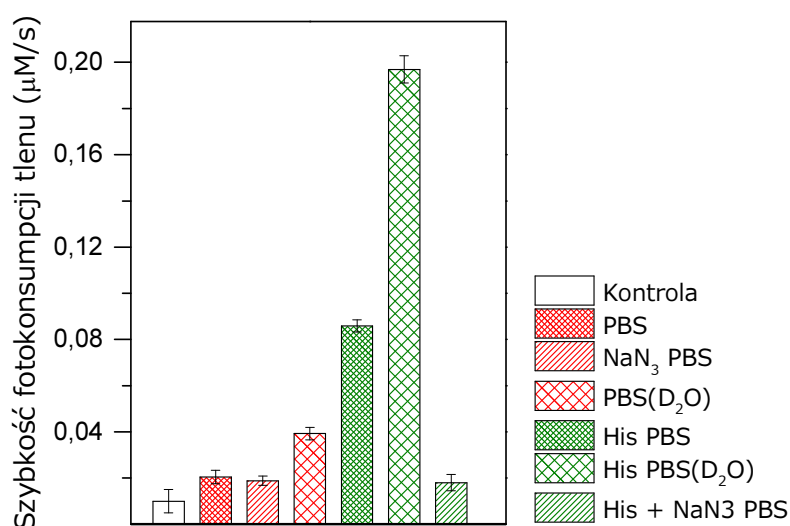
Do badania fotoreaktywności WST11 w wybranych środowiskach modelowych wykorzystano także metodę oksymetrii EPR z zastosowaniem sondy spinowej mHCTPO. Wpływ wygaszaczy tlenu singletowego bądź wolnych rodników na obserwowane tempo konsumpcji tlenu miało na celu identyfikację generowanych reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za obserwowaną fotokonsumpcję.

4.1.5.1. Konsumpcja tlenu indukowana naświetlaniem WST11 w środowisku wodnym

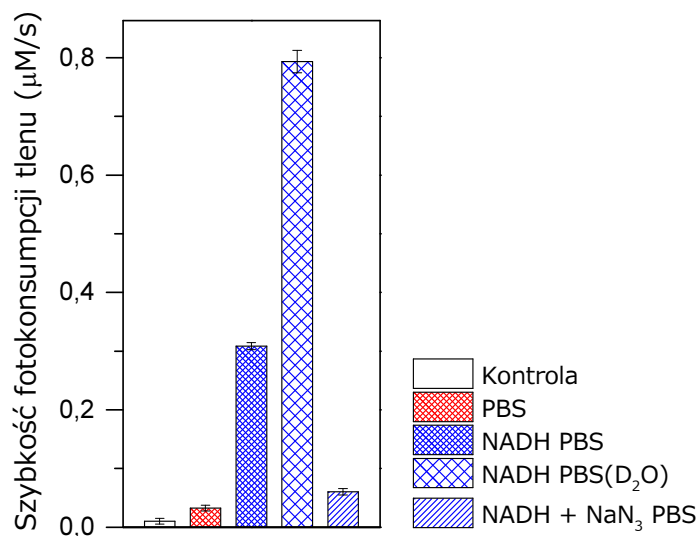
Podczas naświetlania 20μM WST11 światłem zielonym (516-585nm) w samym buforze PBS, nie zaobserwowano znacznego ubytku tlenu w badanym układzie. Wiedząc z bezpośrednich pomiarów fosforescencji ¹O₂(¹Δ_g) przy 1270nm, że w takim układzie jest on generowany, sprawdzono wpływ histydyny i azydku sodu – znanych wygaszaczy tlenu singletowego – na kinetykę fotokonsumpcji tlenu w próbce. Podczas gdy wprowadzenie 5mM NaN₃ nie wpływa na tempo procesu, histydyna ponad 4-krotnie przyspiesza konsumpcję tlenu. Jej efekt jest 2,3-krotnie silniejszy po zamianie lekkiej wody na deuterowaną. W obecności 100μM histydyny i 5mM azydku sodu tempo konsumpcji spada do poziomu, jaki obserwowano

w próbce z samym fotosensybilizatorem. Po wymianie H_2O na D_2O w PBS zaobserwowano dwukrotny wzrost fotokonsumpcji tlenu w obecności WST11. Wyniki przedstawiono na Rys. 49.

Wprowadzenie do układu $20\mu M$ WST11 w PBS $1mM$ NADH spowodowało znaczny wzrost tempa konsumpcji tlenu indukowanej naświetlaniem WST11 (Rys.50). Aby sprawdzić rolę tlenu singletowego w tym procesie wykonano pomiary z fizycznym wygaszaczem tlenu singletowego, azydkiem sodu, oraz w środowisku, w którym zwykłą wodę zamieniono na wodę deuterowaną. Zaobserwowano, że konsumpcja tlenu wzrasta dwukrotnie w ciężkiej wodzie, podczas gdy azydek sodu hamuje ten proces.



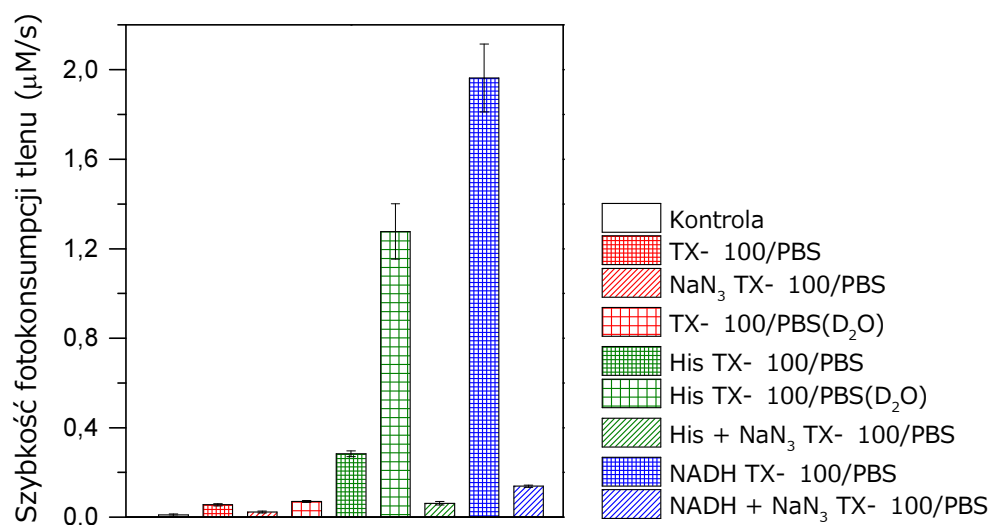
Rys.49 Wpływ histydy (100 μM), azydku sodu (5mM) oraz zamiany środowiska wodnego (PBS) na ciężkowodne ($PBS(D_2O)$) na szybkość konsumpcji tlenu indukowanej światłem zielonym (516-585nm) w obecności 20 μM WST11. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu 20 μM WST11 w PBS w ciemności



Rys.50 Wpływ azydku sodu (5mM) oraz środowiska deuterowanej wody na szybkość fotokonsumpcji tlenu indukowanej światłem (516-585nm) i 20μM WST11 w obecności 1mM NADH. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu w układzie zawierającym 20μM WST11 i 1mM NADH w PBS w ciemności.

4.1.5.2. Fotokonsumpcja tlenu dla WST11 w środowisku micelarnym

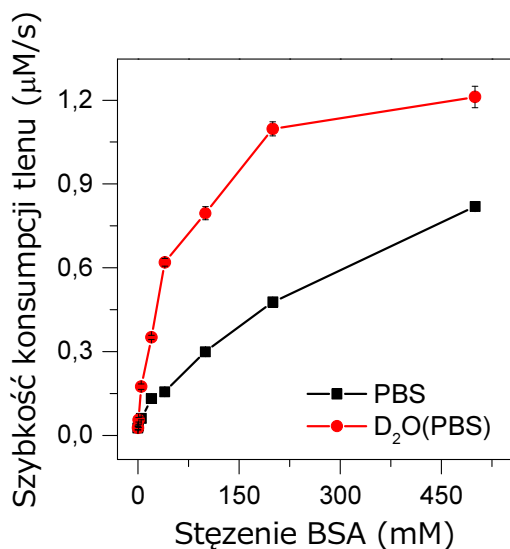
Następnie zbadano fotokonsumpcję tlenu w micelach 0,5% TX-100 przygotowanych w PBS. Naświetlanie samego fotosensybilizatora skutkowało powolnym ubytkiem tlenu, jednak szybszym niż to miało miejsce w samym PBS. Obecność 5mM azydku sodu spowalniała nieco tempo konsumpcji tlenu w badanej próbce. Wprowadzenie do układu 100μM histydyliny skutkowało gwałtownym wzrostem szybkości fotokonsumpcji tlenu, która dodatkowo wzrosła 4,5 krotnie po zamianie środowiska wodnego na ciężkowodne. Dodanie azydku sodu, do próbki zawierającej także histydylinę, spowodowało spadek szybkości ubytku tlenu do poziomu obserwowanego w samym TX-100/PBS. Zaobserwowano znaczne przyspieszenie fotokonsumpcji w obecności NADH. Dodatkowo wprowadzone 5mM NaN₃ spowodowało silne zahamowanie tempa ubytku tlenu. Wyniki podsumowano na Rys.51.



Rys.51 Szybkość konsumpcji tlenu w układzie zawierającym 20μM WST11 i 0,5% TX-100 oraz różne reagenty wymienione w legendzie. W pomiarach użyto 5mM NaN₃, 100μM histydyny oraz 1mM NADH. Pomiar kontrolny (skrajny lewy słupek) stanowi szybkość konsumpcji tlenu 20μM WST11 z 0,5% TX-100 w PBS w ciemności.

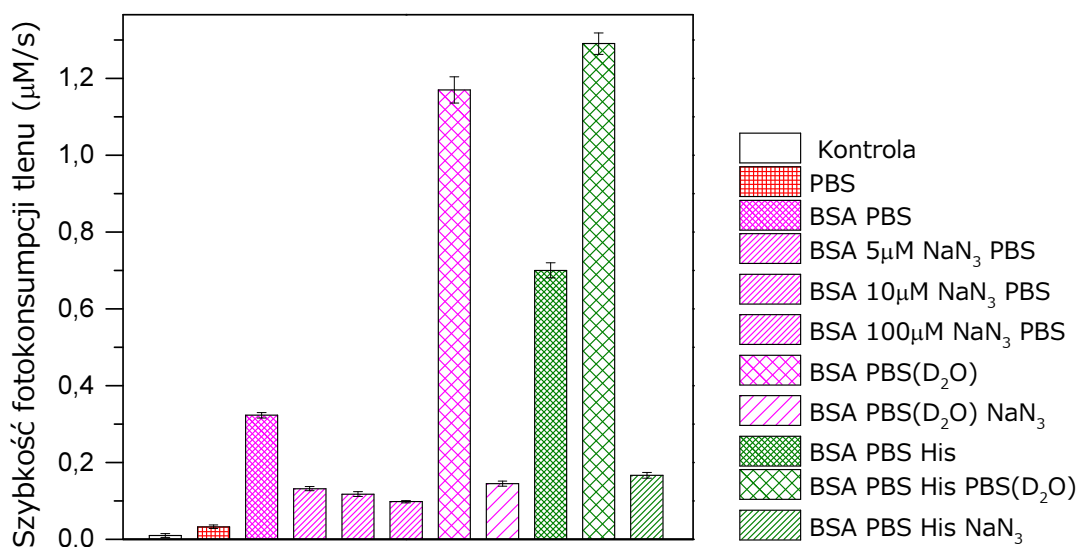
4.1.5.3. Wpływ BSA na fotokonsumpcję tlenu z WST11

Sprawdzono również konsumpcję indukowaną naświetlaniem WST11 w obecności BSA. Zaobserwowano wzrost tempa konsumpcji tlenu wraz z ze wzrostem stężenia wprowadzanego białka, patrz Rys.52. Obserwowany efekt jest szybszy po zamianie środowiska PBS na PBS(D₂O). Należy zauważyć, iż zależność szybkości fotokonsumpcji tlenu od stężenia BSA ma liniowy przebieg tylko dla małych stężeń BSA. Efekt jest szczególnie wyraźny w środowisku ciężkowodnym.



Rys.52 Zależność szybkości fotokonsumpcji tlenu przy udziale 20μM WST11 w PBS i PBS(D₂O) od stężenia białka. Każda z próbek zawiera 100μM mHCTPO i była wzbudzana światłem zielonym (516-585nm).

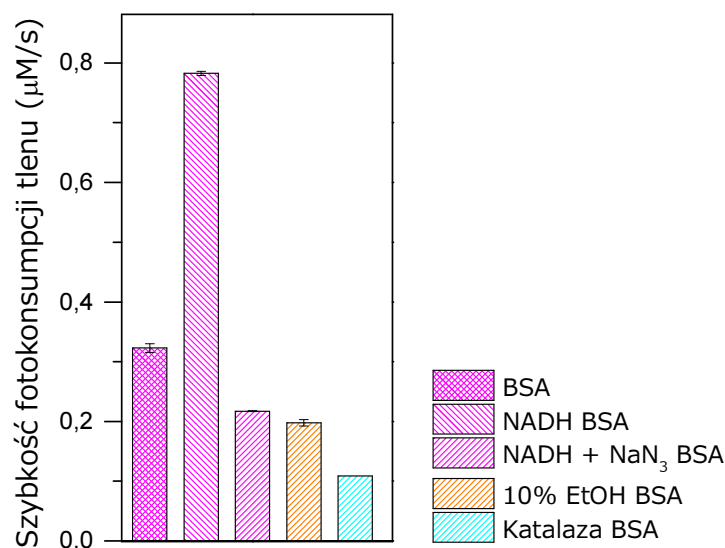
W celu weryfikacji, czy ubytek tlenu indukowany naświetlaniem WST11 w obecności BSA jest zależny od tlenu singletowego, przeprowadzono szereg dodatkowych pomiarów. Tę część badań przeprowadzono w układzie zawierającym 20 μ M WST11 oraz 100 μ M BSA. Obserwowana w tych warunkach fotokonsumpcja tlenu została znacznie spowolniona po wprowadzeniu 5mM NaN₃, przy czym nawet przy większych stężeniach azydki nie zaobserwowano całkowitego zaniku fotokonsumpcji (Rys. 53). Ponadto, efekt azydki sodu był taki sam w układzie, gdzie PBS zastąpiono przez PBS(D₂O). W dalszych pomiarach zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost szybkości fotokonsumpcji tlenu po wprowadzeniu 100 μ M histydyny do próbki przygotowanej w wodzie lekkiej. Zamiana środowiska na ciężkowodne nieznacznie przyspieszyła obserwowany proces natomiast azydek sodu skutkował znaczącym jego zahamowaniem (Rys. 53).



Rys.53 Wpływ azydki sodu(5mM), histydyny(100 μ M) oraz PBS(D₂O) na szybkość fotokonsumpcji 20 μ M WST11 w obecności 100 μ M BSA. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu 20 μ M WST11 z 1mM BSA w PBS w ciemności.

Sprawdzono wpływ 1mM NADH na tempo zużycia tlenu w układzie zawierającym fotosensybilizator i białko. Szybkość konsumpcji wzrosła ponad dwukrotnie, natomiast obecność azydki sodu w stężeniu 5mM znacznie spowolniła proces. Zaobserwowano

nieznaczny wzrost szybkości ubytku tlenu po dodaniu do badanego układu 10% EtOH. Ponadto, katalaza (200 jednostek) spowodowała nieznaczne przyspieszenie konsumpcji w układzie WST11, 100uM BSA, 5mM NaN₃. Wyniki zebrano na Rys.54.



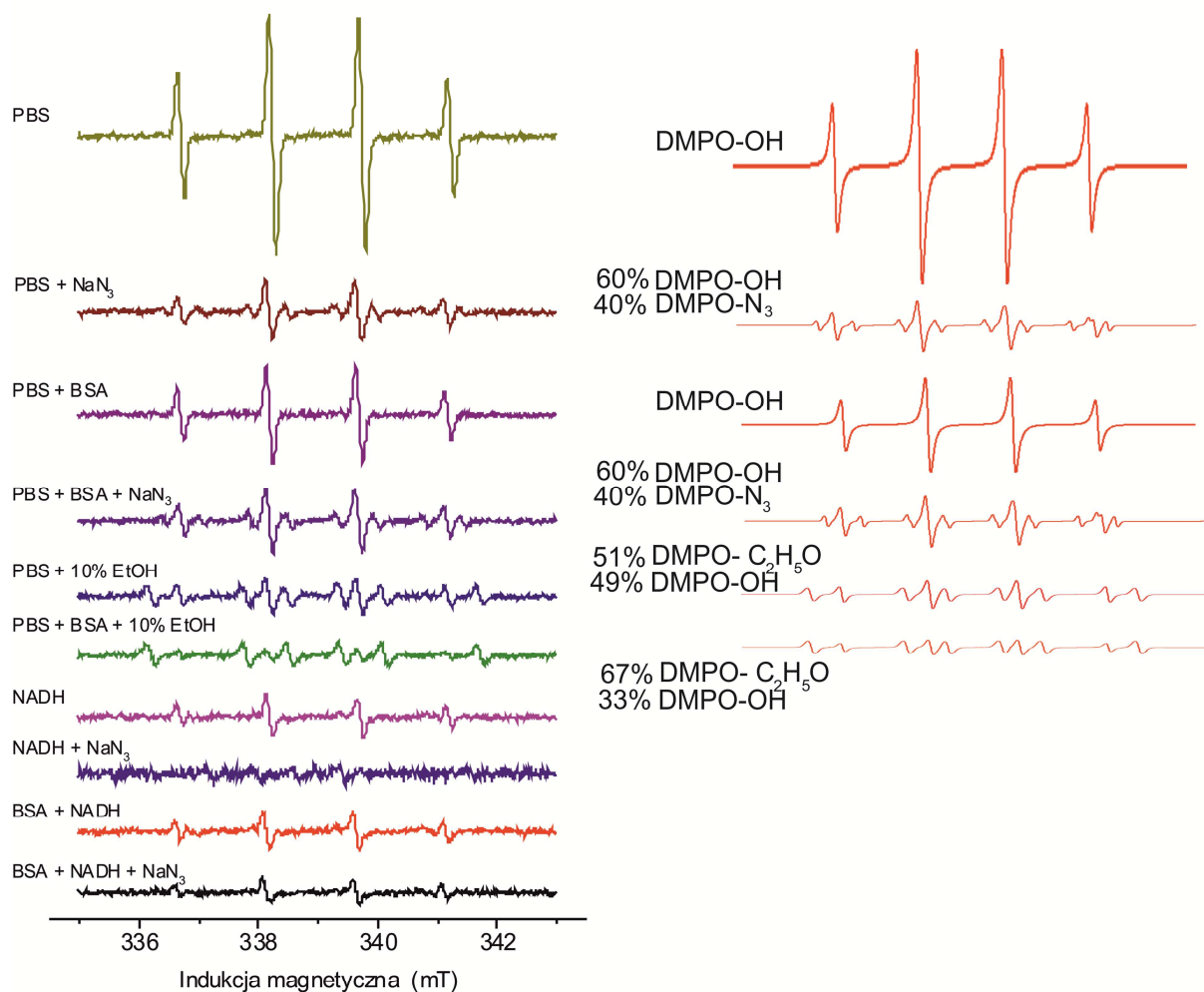
Rys.54 Szybkość fotokonsumpcji tlenu wyznaczona w układzie 20μM WST11 i 100μM BSA w obecności dodatkowych reagentów wymienionych w legendzie. W pomiarach użyto 5mM NaN₃, 1mM NADH oraz 100 jednostek katalazy.

4.1.6. Identyfikacja generowanych wolnych rodników metodą pułapkowania spinowego.

Metodą pułapkowania spinowego EPR wykonano serię pomiarów z zastosowaniem DMPO jako pułapki spinowej, celem identyfikacji częściowo zredukowanych form tlenu generowanych przez WST11.

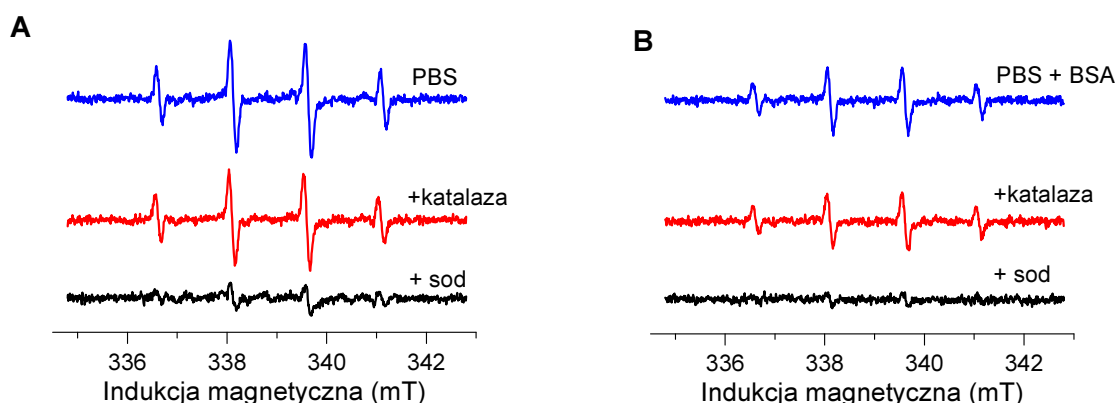
Naświetlanie 20μM WST11 światłem zielonym (516-585nm) w obecności i pod nieobecność BSA w PBS prowadzi do akumulacji adduktu DMPO-•OH przy czym tempo akumulacji jest trzykrotnie wolniejsze w obecności białka (Rys.55). Wyznaczone w symulacji widma EPR parametry stałych rozszczepienia struktury nadsubtelnej wynoszą: $A_N = 1,50\text{mT}$ oraz $A_H = 1,47\text{mT}$ i są zgodne z danymi literaturowymi, które identyfikują addukt jako DMPO-•OH [103]. W celu dalszej identyfikacji natury reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych

za obserwowany addukt spinowy sygnału wykonano pomiary w obecności 5mM NaN_3 . W obu przypadkach zaobserwowano znaczny spadek w intensywności sygnału oraz pojawienie się charakterystycznego adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{N}_3$ o parametrach rozczepienia: $A_N = 1,48\text{mT}$, $A_H^{\beta} = 1,42\text{mT}$, $A_N = 0,31\text{mT}$ (Rys.55). Przeprowadzono dodatkowe pomiary w obecności 10% EtOH oraz 10%DMSO. Zaobserwowano spadek intensywności adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ oraz pojawienie się nowego adduktu węglcentrowego o parametrach $A_H^{\beta} = 2,28\text{mT}$, $A_H^{\gamma} = 1,59\text{mT}$ (Rys.55). W celu weryfikacji, czy $\text{O}_2^{\bullet-}$ powstaje w wyniku bezpośredniego transferu elektronu z fotosensybilizatora na cząsteczkę tlenu, wykonano pomiary z NADH, znanym biologicznym donorem elektronów. Jednak zaobserwowano wyłącznie spadek sygnału adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ bez tworzenia charakterystycznego adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$. Co więcej, dodanie azydku do układu, w którym znajduje się NADH, spowodowało dodatkową redukcję intensywności sygnału.



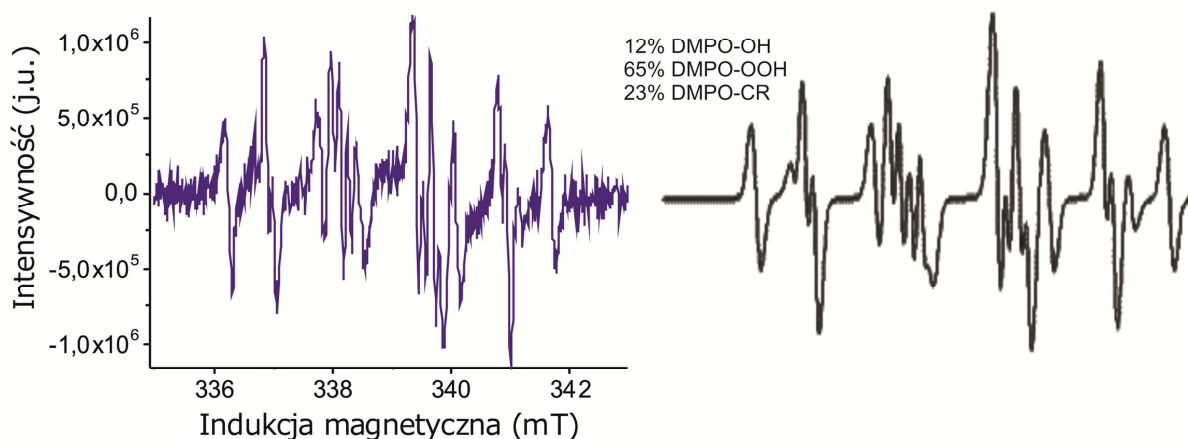
Rys.55 Po lewej: widma EPR adduktów spinowych generowanych w trakcie naświetlania światłem zielonym (516-585nm) 20μM WST11 w PBS w obecności dodatkowych reagentów opisanych nad każdym widmem. **Po prawej:** symulowane (programem WinSim) widma EPR do otrzymanych w eksperymencie sygnałów. W pomiarach użyto: 5mM NaN₃, 100μM BSA, 100μM Histydyny oraz 1mM NADH.

W dalszych pomiarach zaobserwowano redukcję intensywności sygnału w obecności SOD. Wprowadzenie katalazy do układu zawierającego 20μM WST11 w obecności i pod nieobecność BSA spowodowało tylko niewielkie zmiany w intensywności widma adduktu DMPO-[•]OOH (Rys.56).



Rys. 56 Widma ESR adduktów spinowych generowanych w trakcie naświetlania światłem zielonym (516-585nm) próbki zawierającej katalazę (100 jednostek) lub SOD (200 jednostek) oraz odpowiednio: **(A)** 20μM WST11 w PBS oraz **(B)** 20μM WST11 oraz 100uM BSA w PBS.

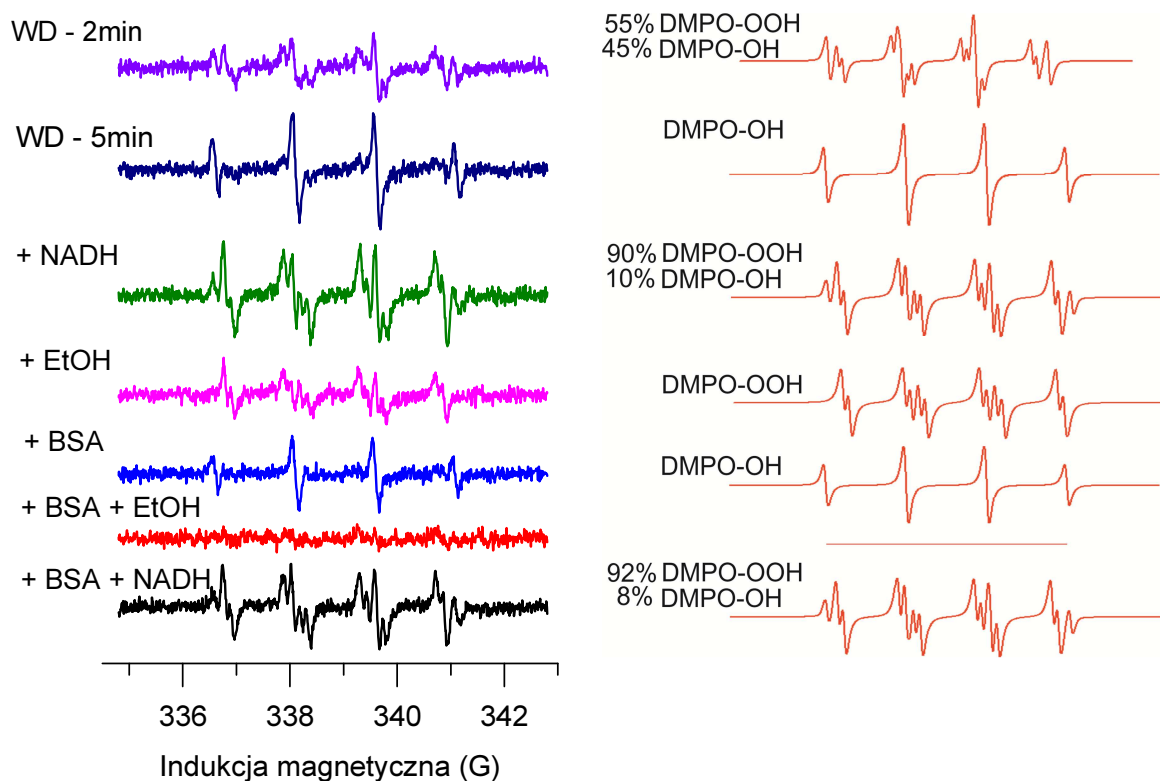
W celu weryfikacji produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w środowisku wodnym wykonano dodatkowe pomiary z wysokim stężeniem WST11 (200μM). W czystym PBS oraz po wprowadzeniu NADH sygnał adduktu $\text{DMPO}^{\cdot}\text{OOH}$ jest przykrywany przez silny sygnał adduktu $\text{DMPO}^{\cdot}\text{OH}$. Dopiero dodanie 10% EtOH pozwoliło na wyodrębnienie szukanego sygnału, a jego obecność potwierdzono poprzez symulację widma (Rys.57).



Rys.57 Widmo doświadczalne EPR (po lewej) wraz z przeprowadzoną symulacją (po prawej) w celu identyfikacji poszczególnych adduktów spinowych generowanych podczas naświetlania światłem zielonym (516-585nm) 200μM WST11 w obecności 10% EtOH.

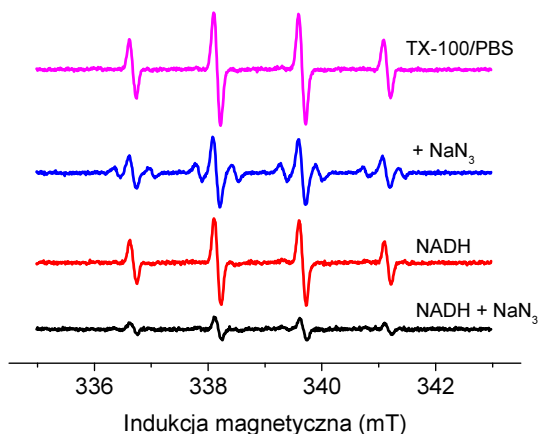
Na Rys.58 przedstawiono dodatkowe wyniki pomiarów w wodzie destylowanej. Miało to zmniejszyć agregację próbki a co za tym idzie zwiększyć wydajność fotogenerowania reaktywnych form tlenu przez fotosensybilizator. W celu identyfikacji obserwowanych adduktów, przeprowadzono symulację widm EPR. Otrzymane stałe rozszczepienia struktury nadsubtelnej wynoszą odpowiednio : $A_N = 1,50\text{mT}$, $A_H = 1,47\text{mT}$ dla $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$, $A_N = 1,42\text{mT}$, $A_H^{\beta} = 1,13\text{mT}$, $A_H^{\gamma} = 0,122\text{mT}$ dla $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$, $A_N = 1,48\text{mT}$, $A_H^{\beta} = 1,42\text{mT}$, $A_N = 0,31\text{mT}$ dla $\text{DMPO}^{\bullet}\text{N}_3$ i są zbliżone do danych literaturowych [103].

Pierwsza minuta naświetlenia próbki zawierającej wyłącznie $20\mu\text{M}$ WST11 z $0,1\text{M}$ DMPO prowadzi do akumulacji adduktów $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ oraz $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$. W następnych minutach, addukt $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$ ulega zanikowi; jednocześnie pojawia się sygnał, który można przypisać adduktowi $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$. Dodanie 10% EtOH skutkowało wygaszeniem adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ z zachowaniem adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$. Gdy do próbki wprowadzono NADH intensywność sygnału obserwowanych adduktów wzrosła dwukrotnie, natomiast przeprowadzona symulacja pokazała jednoczesne występowanie obu adduktów: $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ i $^{\bullet}\text{OOH}$. Bezpośrednia detekcja widma adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$ nie była możliwa po wprowadzeniu do próbki $100\mu\text{M}$ BSA. Charakterystyczny dla anionorodnika ponadtlenkowego sygnał pojawił się dopiero po wprowadzeniu do układu NADH.



Rys.58 Po lewej: Widma EPR adduktów spinowych generowanych po 6-cio minutowym naświetlaniu światłem zielonym (516-585nm) fotosensybilizatora WST11 (20 μ M) w środowisku wodnym WD i w obecności 0,1M DMPO. Dodawane reagenty opisano nad widmami EPR. **Po prawej:** symulowane widma EPR do otrzymanych w eksperymencie sygnałów. Nad widmem zaznaczono obserwowany addukt lub superpozycję adduktów, które tworzą widmo.

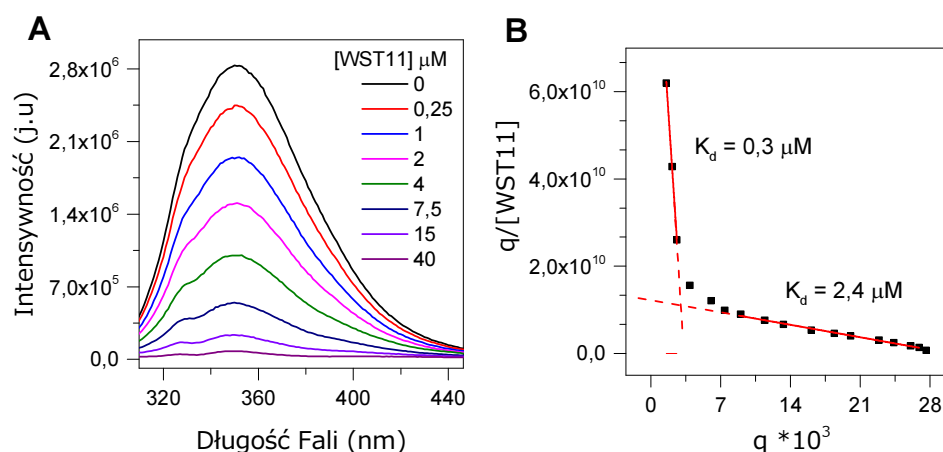
Zmierzono również widma EPR w trakcie naświetlania światłem zielonym (516-585nm) próbki zawierającej fotosensybilizator WST11 w środowisku micelnym TX-100/PBS. Zaobserwowano szybkie narastanie sygnału adduktu DMPO. Azydek sodu spowalnia tempo produkcji adduktu z jednoczesną akumulacją adduktu azydkowego. Podobnie jak dla fotosensybilizatora w PBS, obecność NADH hamuje produkcję DMPO- $\cdot$ OH, natomiast dodany NaN₃ dodatkowo obniża rejestrowany sygnał bez pojawienia się charakterystycznego adduktu DMPO- $\cdot$ N₃.



Rys. 59 Widma EPR adduktów spinowych generowanych po 6-cio minutowym naświetlaniu światłem zielonym (516-585nm) fotosensybilizatora WST11 (20 μ M) w środowisku micelarnym TX-100/PBS.

4.1.7. Fluorescencja tryptofanu

Zaobserwowano gaszenie fluorescencji reszt tryptofanu BSA pod wpływem dodawanego WST11 (Rys.60(A)). Stałą dysocjacji oraz ilość miejsc wiążących fotosensybilizatora do albuminy wyznaczono za pomocą metody Scatcharda [122], [123]. Sporządzając wykres będący stosunkiem związanego ligandu do niezwiązanego ligandu ($q/[WST11]$) w funkcji związanego ligandu q (w omawianym przypadku wielkość q jest frakcją fluorescencji, która została wygaszona $q = (F_0 - F)/100$; gdzie F_0 to fluorescencja początkowa białka, F – fluorescencja po dodaniu WST11) otrzymuje się liniowy przebieg funkcji, której współczynnik nachylenia wynosi $1/K_d$, gdzie K_d jest stałą dysocjacji. Otrzymane wyniki wykazały dwuetapowy przebieg wykresu Scatcharda (Rys. 60(B)), skąd wyznaczono przybliżone stałe dysocjacji (K_d) dla tworzenia kompleksu WST11-BSA, które wynoszą odpowiednio 0,3 i 2,4 μ M.



Rys.60 (A) Zmiany w widmie emisji fluorescencji tryptofanu dla 1μM BSA wraz ze zwieszaniem stężenia oraz **(B)** wykres Scatcharda wiązania się WST11 z BSA.

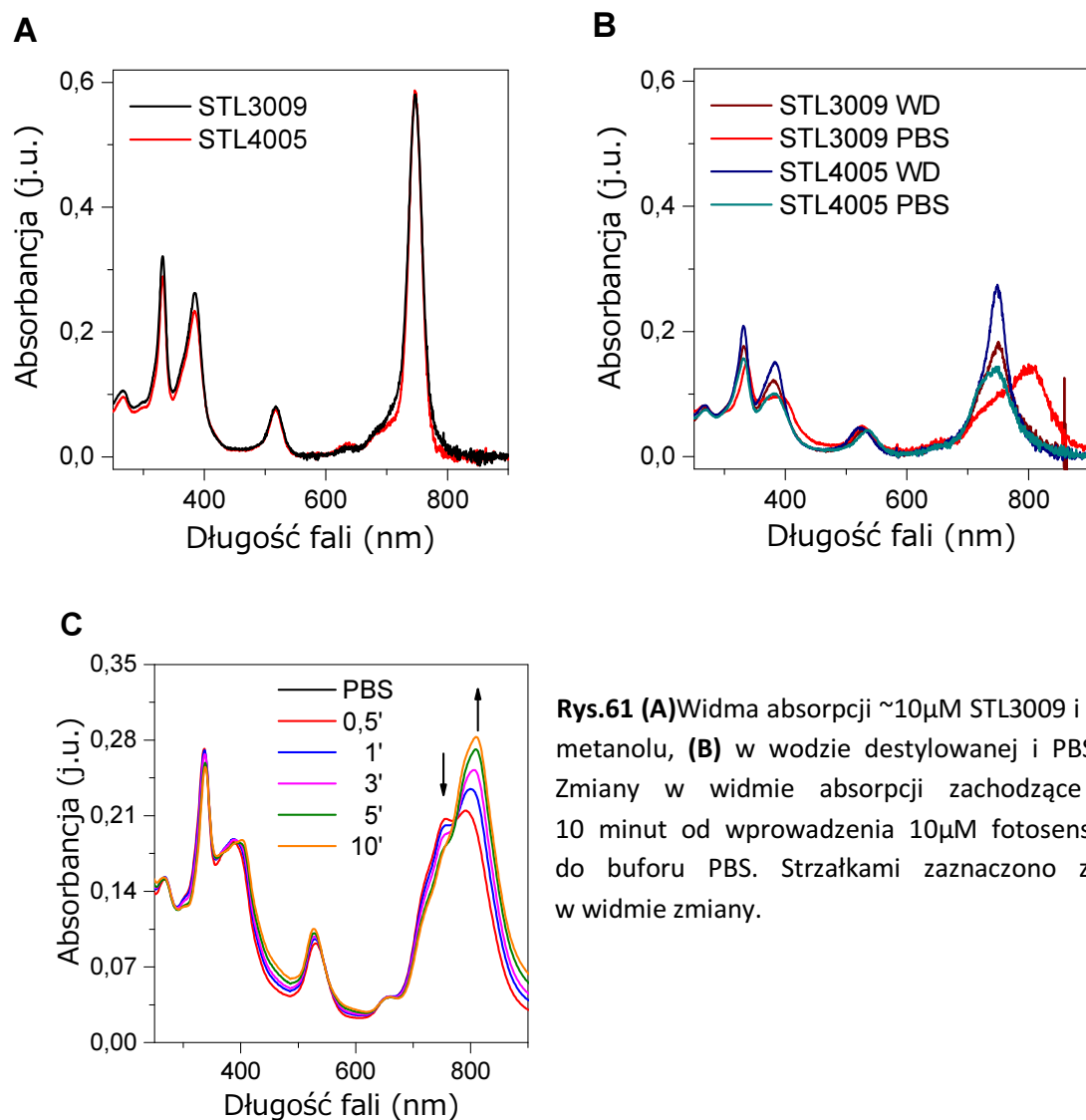
4.2. Wyniki otrzymane dla STL3009 i STL4009

Tę część rozprawy poświęcono charakterystyce podstawowych właściwości fotofizycznych i fotochemicznych dwóch, dodatnio naładowanych pochodnych bakteriochlorofilu *a*, podstawionych jonami palladu – STL3009 i STL4005. Fotosensybilizatory otrzymano w ramach współpracy z Instytutem Weizmanna w Izraelu i stanowią nowe, jeszcze nie przebadane związki. Ograniczona ilość otrzymanego materiału pozwoliła na przeprowadzenie jedynie wybranych eksperymentów w kilku układach modelowych.

4.2.1. Właściwości spektralne

Widma absorpcji fotosensybilizatorów STL3009 i STL4005 w MeOH są typowe dla bakteriochlorofilu. Posiadają intensywne pasma absorpcji w obszarze Soreta B_y (332nm) i B_x (384nm), niewielkie pasmo Q_x (517nm) oraz intensywne i przesunięte ku podczerwieni pasmo Q_y (746nm) (Rys.61(A)). Widmo absorpcji obu fotosensybilizatorów różni się w niewielkim stopniu w obszarze pasma Q_y, gdzie dla STL3009 jest ono bardziej rozmyte.

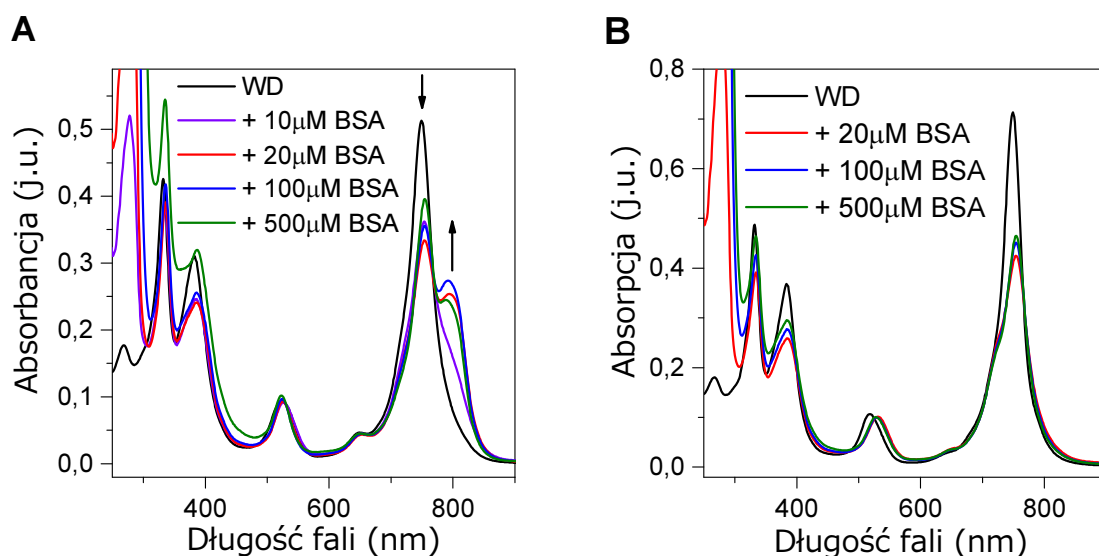
Dla obu fotosensybilizatorów, zamiana na środowisko wody destylowanej skutkuje spadkiem intensywności poszczególnych pasm absorpcji oraz przesunięciem położenia ich maksimów, przy czym efekt ten jest znacznie silniejszy dla STL3009. Wprowadzając fotosensybilizatory do buforu PBS zaobserwowano jeszcze silniejszy spadek intensywności absorpcji dla STL4005, podczas gdy dla STL3009 stwierdzono pojawienie się zupełnie nowego pasma absorpcji w obszarze 810nm (Rys.61(B)) Ewolucja nowego pasma absorpcji jest powolna i stan równowagi wymaga odczekania około 20min (Zmiany zachodzące w ciągu 10min pokazano na Rys.61(C)). Dodanie w środowisku hydrofilowym 0,5% TX-100 prowadzi do pełnej monomeryzacji obu związków (nie pokazano).



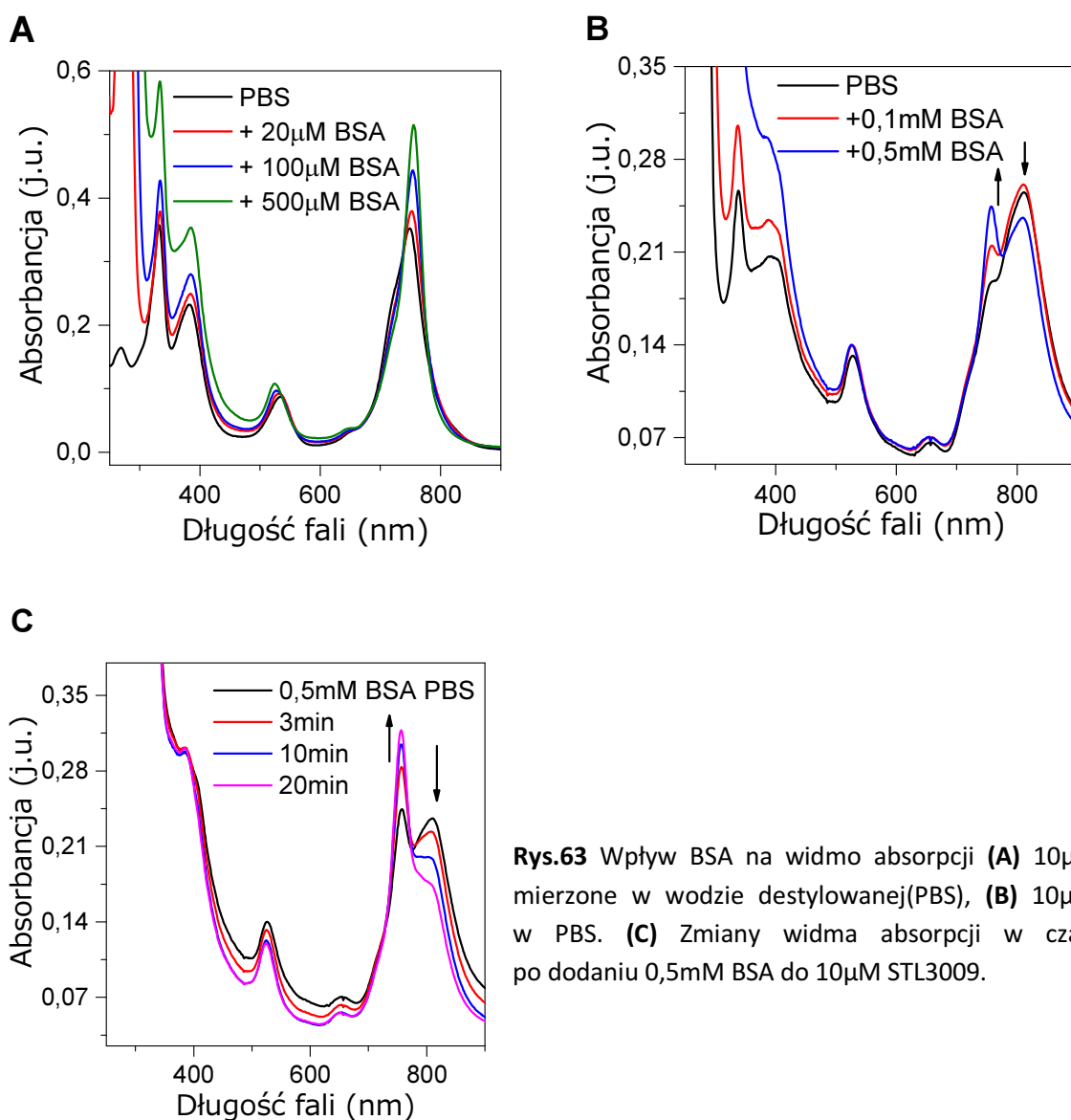
Rys.61 (A)Widma absorpcji $\sim 10\mu\text{M}$ STL3009 i STL4005 w metanolu, **(B)** w wodzie destylowanej i PBS, oraz **(C)** Zmiany w widmie absorpcji zachodzące w ciągu 10 minut od wprowadzenia $10\mu\text{M}$ fotosensybilizatora do buforu PBS. Strzałkami zaznaczono zachodzące w widmie zmiany.

Sprawdzono też wpływ BSA na widmo absorpcji badanych pochodnych bakteriochlorofilów. Dla STL3009 w wodzie destylowanej, małe stężenia albuminy obniżają intensywność pierwotnego pasma Q_y kosztem formacji nowego, przesuniętego w kierunku fal dłuższych pasma z maksimum przy 790nm. Duże stężenie albuminy powoduje proces odwrotny i ponowne odbudowywanie pasma Q_y w 750nm (Rys.62(A)). Dodanie do wodnego roztworu STL4005, BSA w stężeniu 20 μ M, powoduje obniżenie absorpcji, której jednak nie towarzyszy powstawanie dodatkowego pasma. Przy wyższych stężeniach białka absorpcja fotosensybilizatora w nieznacznym stopniu wzrasta (Rys.62(B)).

Inną zależność zaobserwowano w środowisku buforu PBS (Rys.63(A)). Wraz ze wzrostem stężenia albuminy pasmo absorpcji STL3009 przy 810nm zanika, podczas gdy przy 746nm obserwuje się przyrost absorpcji. Efekt ten jest powolny, co pokazano na Rys.63(C). Ten sam eksperyment dla STL4005 pokazał zanik charakterystycznego „ramienia” w 720nm i towarzyszące temu narastanie pierwotnej absorpcji w Q_y przy długości fali 746nm (Rys.63(B)).



Rys.62 Wpływ BSA na widmo absorpcji **(A)** 10 μ M STL3009 mierzone w wodzie destylowanej(WD), **(B)** 10 μ M STL4005 w WD

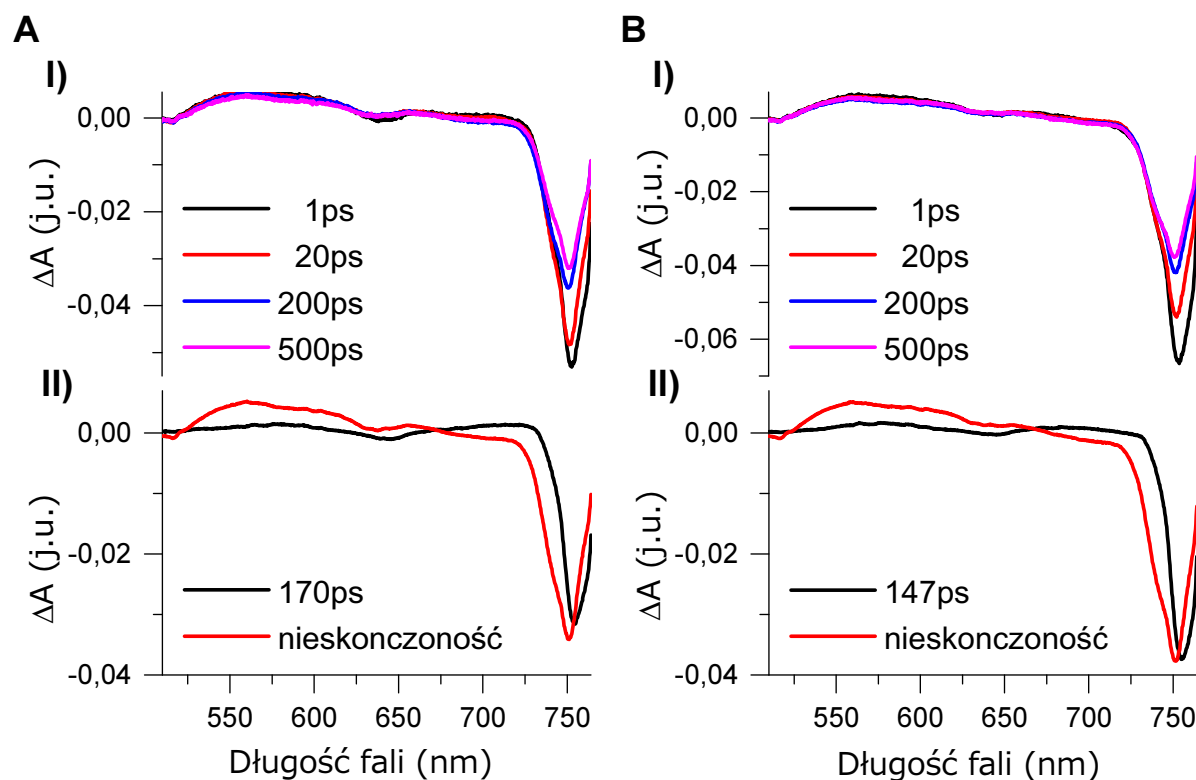


Rys.63 Wpływ BSA na widmo absorpcji **(A)** 10 μ M STL3009 mierzone w wodzie destylowanej(PBS), **(B)** 10 μ M STL4005 w PBS. **(C)** Zmiany widma absorpcji w czasie 20min po dodaniu 0,5mM BSA do 10 μ M STL3009.

4.2.2. Femto- i piko-sekundowa fotoliza błyskowa

Wzbudzenie STL3009 i STL4005 900fs impulsem lasera w anaerobowych warunkach w TX-100/PBS oraz metanolu prowadzi do generacji indywiduów o szerokim widmie absorpcji w obszarze 520-630nm oraz ujemnej absorpcji z maksimum przy 753nm. Przykładowe widma różnicowe absorpcji badanych fotosensybilizatorów, otrzymane w różnych punktach czasowych w obecności miceli, pokazano na Rys.64 (A,B). Analiza kinetyki zmian sygnału oraz zastosowanie funkcji „Global Fit” wykazały mono-eksponencjalny zanik sygnału głównie w obszarze ujemnej absorpcji z niewielkimi zmianami w pozostałym zakresie długości fal.

Wyliczone stałe czasowe wynoszą odpowiednio (170 ± 23) ps oraz (147 ± 18) ps dla STL3009 i STL4005. Zrekonstruowane widmo absorpcji stanu przejściowego jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do pozostałej po 0,5-1 nanosekundzie pomiaru, ujemnej absorpcji stanu podstawowego (Rys.64 (B)). W MeOH otrzymano podobne przebiegi widm, natomiast ich zmiany zachodzą ze stałą czasową wynoszącą (108 ± 13) ps oraz (67 ± 8) ps odpowiednio dla STL3009 i STL4005.

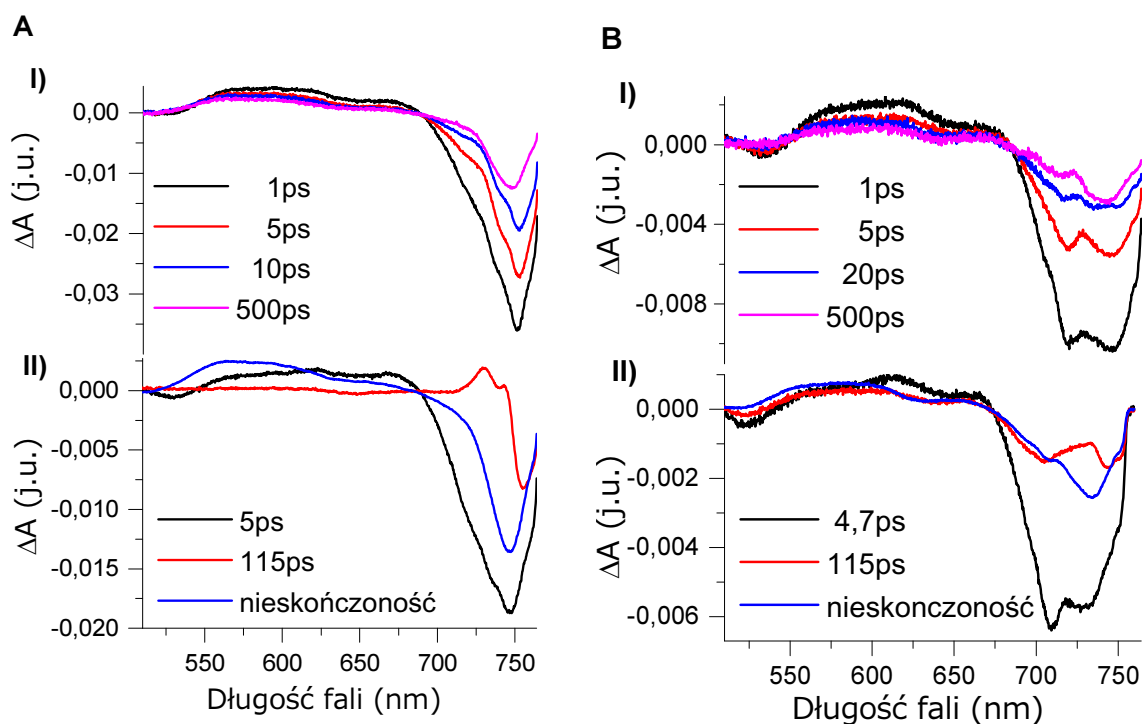


Rys.64 Wyniki z pikosekundowej fotolizy błyskowej uzyskane dla 20μM **(A)** STL3009 i **(B)** STL4005 w TX-100/PBS. **I)** Widma różnicowe absorpcji obserwowane po 1, 12, 100 i 500ps po impulsie z lasera. **II)** Widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych rejestrowanego sygnału zrekonstruowane przy pomocy funkcji „Global Fit”. Widmo różnicowe absorpcji, które pozostaje po 0,5-nanosekundowym pomiarze oznaczono jako „nieskończoność”. Moc wiązki wzbudzającej lasera o długości fali 400nm wynosiła 500μW, natomiast w celu uzyskania wiązki próbującej, użyto kryształu CaF₂.

W środowisku hydrofilowym intensywność sygnału widma różnicowego absorpcji badanych fotosensybilizatorów, o tej samej gęstości optycznej przy długości fali wzbudzenia (400nm) co próbka przygotowana w TX-100/PBS, spada ponad 3-krotnie w wodzie destylowanej i ponad 10-krotnie w PBS dla STL3009, oraz około 2-krotnie w wodzie destylowanej i ponad 7-krotnie

w PBS w przypadku STL4005. Zarejestrowane widma charakteryzują się znacznym poszerzeniem pasm absorpcji przejściowej w stosunku do tej obserwowanej w środowisku miceli TX-100.

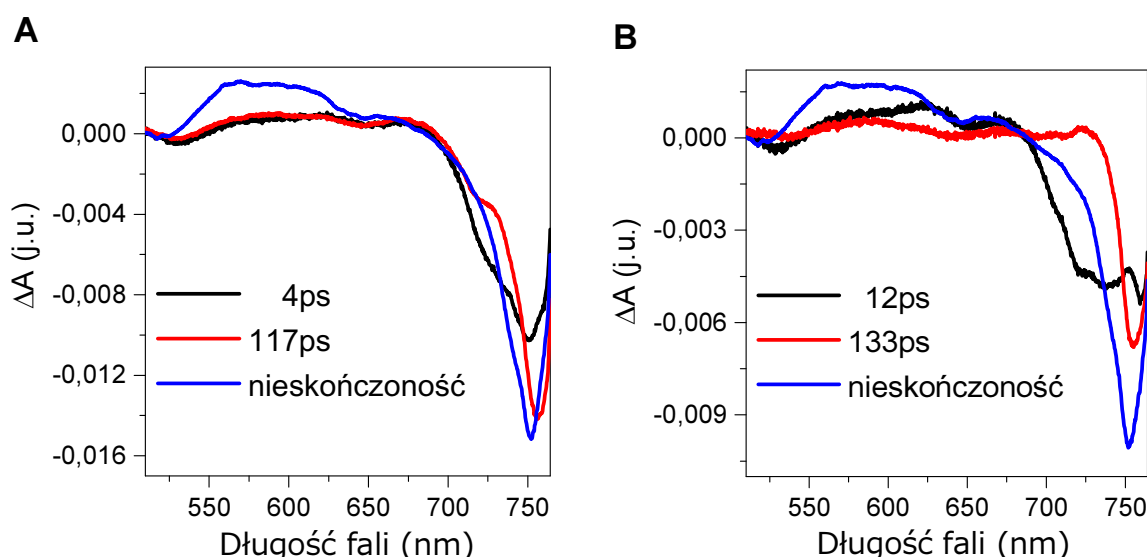
Zmiany w widmie absorpcji w czasie zachodziły dwuetapowo. Krótkożyjącą komponentę, o czasie zaniku około 5ps, obserwuje się w całym zakresie długości fal rejestrowanego widma różnicowego absorpcji obu fotosensybilizatorów. Druga długowieczna składowa zaniku absorpcji przejściowej w WD ma ujemne pasmo absorpcji w obszarze 760nm. Ta sama składowa w PBS wydaje się mieć zupełnie inny przebieg. Jako przykład pokazano wyniki otrzymane dla fotosensybilizatora STL4005 (Rys.65). Dla obu fotosensybilizatorów czas życia tego stanu przejściowego wynosi w przybliżeniu 115ps.



Rys.65 Czasowo zależne zmiany widm różnicowych absorpcji zachodzące w pierwszej 1ns pomiaru. Wyniki z piko-sekundowej fotolizy błyskowej dla $\approx 25\mu\text{M}$ STL4005 w **(A)** WD i **(B)** PBS . Poszczególne części rysunku pokazują: **I)** Widma różnicowe obserwowane po 1, 5, 10 i 500ps po impulsie z lasera. **II)** zrekonstruowane widma obserwowanych stanów przejściowych otrzymane po zastosowaniu funkcji „Global Fit”. Widmo różnicowe absorpcji, które pozostaje po 1,5ns pomiarze oznaczono jako „nieskończoność”. Moc wiązki wzbudzającej lasera o długości fali 400nm wynosiła $500\mu\text{W}$, natomiast w celu uzyskania wiązki próbkującej, użyto kryształu CaF_2 .

Wprowadzenie 0,5mM BSA spowodowało podobne zmiany w obserwowanym widmie różnicowym absorpcji obu fotosensybilizatorów. Widma charakteryzują się wyższą intensywnością niż pod nieobecność białka oraz przybierają kształt zbliżony do tego obserwowanego w środowisku micelnym. Ich analiza z zastosowaniem funkcji „Global Fit” wskazuje na zmniejszenie udziału krótko-żyjącego stanu przejściowego w obu przypadkach (Rys.66).

Po upływie 1ns, we wszystkich rozważanych przypadkach z wyjątkiem próbki w PBS, obserwuje się widmo absorpcji różnicowej bardziej stabilnego stanu przejściowego o podobnym, niezależnym od środowiska przebiegu. Występują znaczne różnice w intensywności pozostałego sygnału, które przedstawiono w Tabeli 4., jako procentowa część intensywności końcowego widma otrzymanego w MeOH i TX-100.



Rys.66 (A) Widma różnicowe absorpcji stanów przejściowych dla 20μM STL3009 w obecności 0,5mM BSA w **A)** WD i **B)** PBS otrzymane po zastosowaniu funkcji „Global Fit”. Widmo różnicowe absorpcji, które pozostaje po 1 ns pomiarze oznaczono jako „nieskończoność”. Moc wiązki wzbudzającej lasera o długości fali 400nm wynosiła 500μW, natomiast w celu uzyskania wiązki próbującej, użyto kryształu CaF₂.

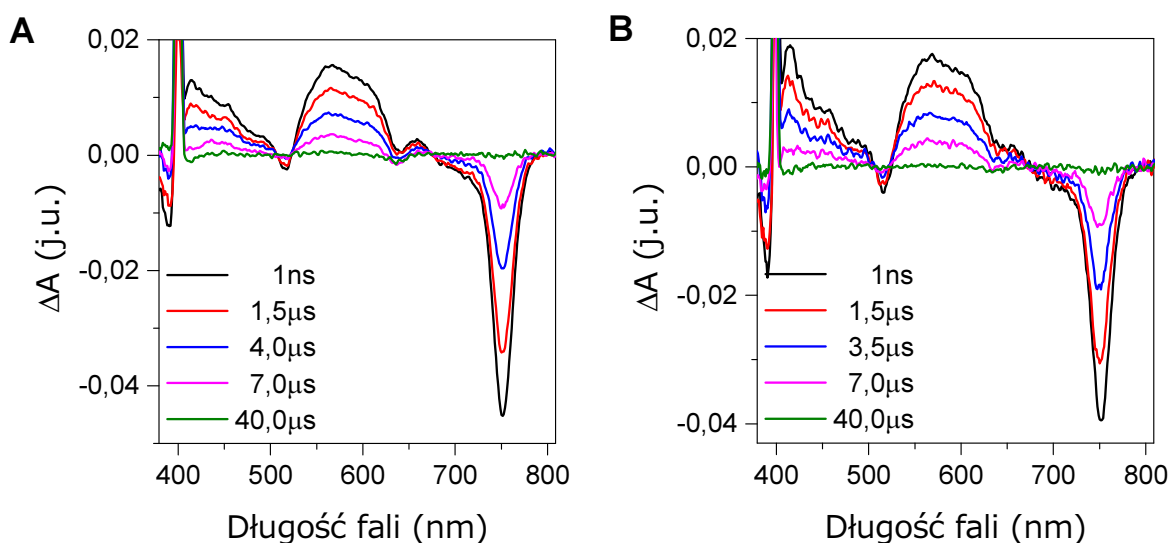
Tab.4 Procentowy udział sygnału absorpcji przejściowej po upływie 1ns od impulsu lasera zakładając próbki w MeOH i TX-100 jako punkt odniesienia.

	MeOH/TX-100	WD	PBS	WD + BSA	PBS + BSA
STL3009	100%	20%	7%	36%	10%
STL4005	100%	43%	15%	51%	45%

4.2.3. Nano- i mikro-sekundowa laserowa fotoliza błyskowa

Wzbudzenie STL3009 i STL4005 w TX-100/PBS w anaerobowych warunkach, po upływie 1ns od impulsu laserowego, prowadzi do powstania stanu przejściowego, którego widmo absorpcji w zakresie 400-505 oraz 525-675nm, pokazane jest na Rys.67. Pierwszy fotosensybilizator charakteryzuje się słabiej rozwiniętą absorpcją w obszarze fal krótkich (Rys.67(A)), oraz wyraźnym zniekształceniem w obszarze 635-675nm prawdopodobnie wynikającym z obecności zanieczyszczeń w próbce (wg. Aleksandra Brandisa, odpowiedzialnego za syntezę badanych fotosensybilizatorów w Instytucie Nauki Weizmanna). Obserwowana dla obu Pd-pochodnych bakteriochlorofilu ujemna absorpcja w obszarze <400nm, 505-525 oraz 675-800nm związana jest z blaknięciem stanu podstawowego.

Zanik obserwowanej absorpcji przejściowej w obu przypadkach jest mono-eksponencjalny (przebiegów nie pokazano; są analogiczne jak obserwowano dla WST11, ze stałymi czasowymi $(4,6 \pm 0,2)\mu\text{s}$ oraz $(4,3 \pm 0,2)\mu\text{s}$, odpowiednio, dla STL3009 i STL4005, patrz Rys.35(B)). Nasycenie próbki tlenem powoduje około 8-krotne skrócenie czasu życia absorpcji przejściowej obu fotosensybilizatorów. Przez analogię do wyników otrzymanych przy pomiarach WST11, obserwowane stany przejściowe można utożsamić ze wzbudzonym stanem trypletowym.



Rys.67 Widma różnicowe absorpcji fotosensybilizatora **(A)** STL3009 oraz **(B)** STL4005 w TX-100/PBS w warunkach beztlenowych, otrzymane w różnych punktach czasowych po impulsie z lasera (400nm)

Przebieg widma absorpcji przejściowej stanu wzbudzonego trypletowego nie ulega większym zmianom w innych badanych środowiskach modelowych z wyjątkiem PBS, jednak zbyt słaby sygnał nie pozwalał na jego dokładną analizę (nie pokazano). Dodatkowo, we wszystkich analizowanych przypadkach zaobserwowano mono-eksponencjalny zanik widma różnicowego absorpcji.

W dalszej części pracy skupiono się na stabilności wzbudzonego stanu trypletowego fotosensybilizatorów w zależności od mikrośrodowiska i obecności tlenu. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 5. Dla obu Pd-pochodnych bakteriochlorofilu czas życia wzbudzonego stanu trypletowego w środowisku hydrofilowym jest nieznacznie krótszy od tego obserwowanego w MeOH i wynosi odpowiednio 2,0 μs i 2,3 μs dla STL3009 i STL4005. Stabilność trypletu wzrosła blisko dwukrotnie w obecności 0,5mM BSA. Co więcej, oszacowana stała szybkości oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem w obecności BSA jest około 6-krotnie niższa niż dla samych fotosensybilizatorów w wodzie. Wzbudzony stan trypletowy STL3009 i STL4005 w MeOH charakteryzuje się podobną stałą oddziaływania z tlenem co w wodzie i w przybliżeniu wynosi $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tab.5 Czasy życia wzbudzonego stanu trypletowego **(A)** STL3009 i **(B)** STL4005 w wybranych układach modelowych w warunkach beztlenowych, w równowadze z powietrzem oraz po nasyceniu 100% tlenem. Ostatnia kolumna tabeli zawiera oszacowane wartości stałej oddziaływania trypletu fotosensybilizatora z tlenem. Czasy życia wyznaczono z dopasowania funkcji eksponencjalnej do zaniku absorpcji przejściowej stanu trypletowego w 570nm.

A

Rozpuszczalnik	τ_{Ar} (μs)	$\tau_{Powietrze}$ (μs)	τ_{O_2} (μs)	$\sim k_{O_2}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
MeOH	$(2,7 \pm 0,1)$	$(0,19 \pm 0,02)$	$(0,042 \pm 0,004)$	$2,3 \cdot 10^{10}$
DDW	$(2,0 \pm 0,5)$	$(1,0 \pm 0,2)$	$(0,31 \pm 0,03)$	$2 \cdot 10^9$
PBS	brak sygnału	brak sygnału	brak sygnału	-
TX-100/PBS	$(4,6 \pm 0,2)$	$(1,91 \pm 0,04)$	$(0,56 \pm 0,02)$	$1,2 \cdot 10^9$
PBS BSA	$(3,7 \pm 0,8)$	$(2,8 \pm 0,5)$	$(1,3 \pm 0,3)$	$3,5 \cdot 10^8$
DDW BSA	$(3,5 \pm 0,4)$	$(2,6 \pm 0,2)$	$(1,7 \pm 0,4)$	$3,9 \cdot 10^8$

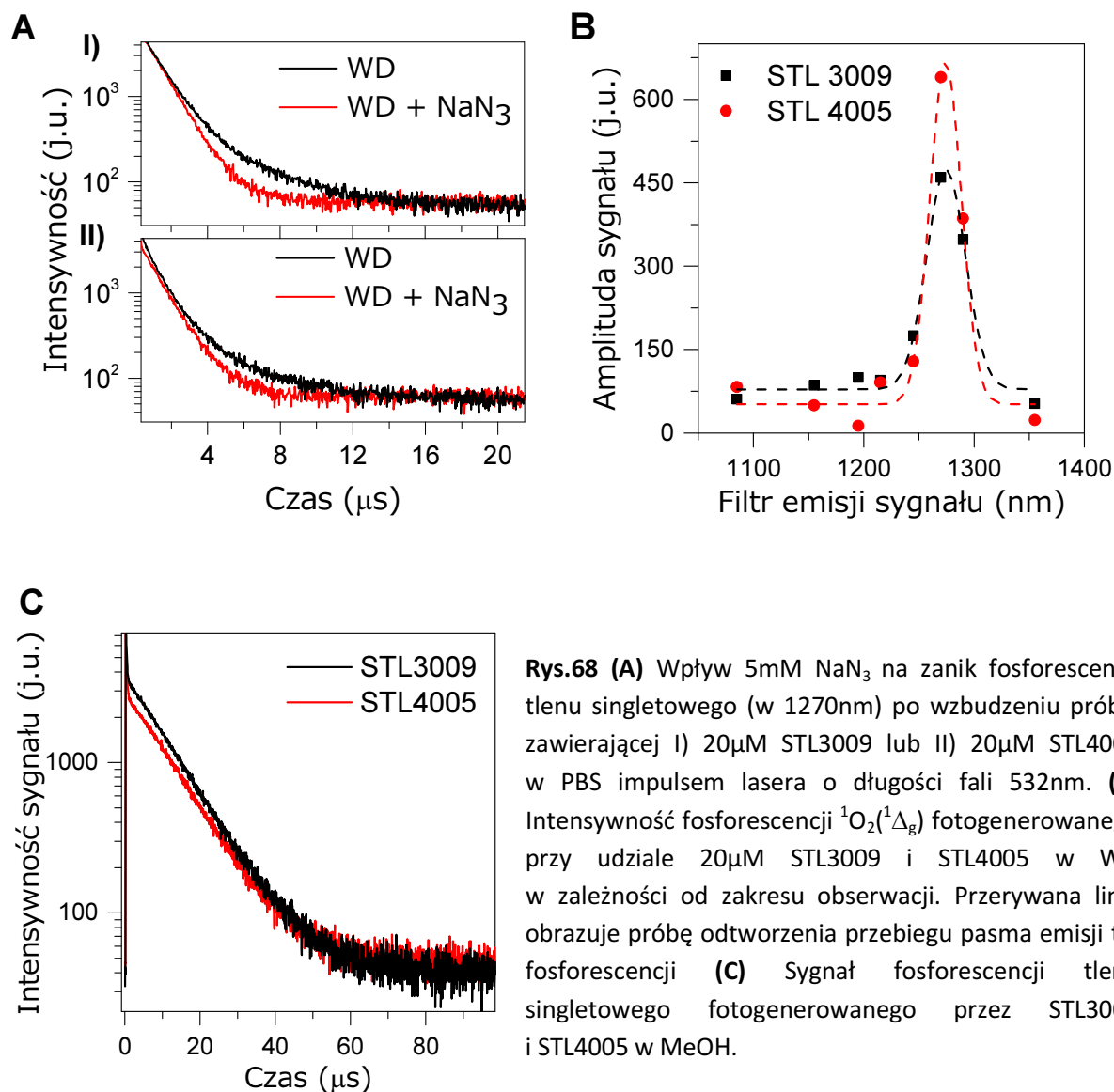
B

Rozpuszczalnik	τ_{Ar} (μs)	$\tau_{Powietrze}$ (μs)	τ_{O_2} (μs)	$\sim k_{O_2}$ [$M^{-1}s^{-1}$]
MeOH	$2,8 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,02$	$0,049 \pm 0,003$	$2,0 \cdot 10^9$
DDW	$2,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,05$	$2,3 \cdot 10^9$
PBS	$2,4 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$	brak sygnału	$2,3 \cdot 10^9$
TX-100/PBS	$4,3 \pm 0,2$	$1,90 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,03$	$1,2 \cdot 10^9$
PBS BSA	$3,6 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$3,7 \cdot 10^8$
DDW BSA	$3,4 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$	brak sygnału	$2,1 \cdot 10^8$

4.2.4. Czasowo rozdzielcza detekcja fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm

Zbadano zdolność fotogenerowania tlenu singletowego przez fotosensybilizatory STL3009 i STL4005. W środowisku wodnym słaby sygnał fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm jest zakłócony przez kilkakrotnie intensywniejszą fosforescencję samego fotosensybilizatora. Fosforescencja samych fotosensybilizatorów jest szczególnie widoczna po wprowadzeniu do badanego układu 5mM azydku sodu – wydajnego wygaszacza 1O_2 (Rys.68(A)). Wyznaczony czas zaniku fosforescencji dla STL3009 i STL4005 wynosi odpowiednio $(1,23 \pm 0,04)\mu s$ i $(1,26 \pm 0,05)\mu s$, podczas gdy tlenu singletowego w obu przypadkach $(3,7 \pm 0,1)\mu s$. Użyto dodatkowej metody w celu weryfikacji czy reaktywna forma tlenu powstaje w próbkach wodnych, stosując odpowiednie filtry wąskopasmowe, dzięki której odtworzono spektralny przebieg fosforescencji tlenu singletowego (Rys.68(B)). W innych badanych środowiskach, komponenta fosforescencji tlenu singletowego jest przesunięta w czasie w stosunku

do szybciej zanikającej fosforescencji wzbudzonego stanu trypletowego badanych fotosensybilizatorów (Rys.68(C)).



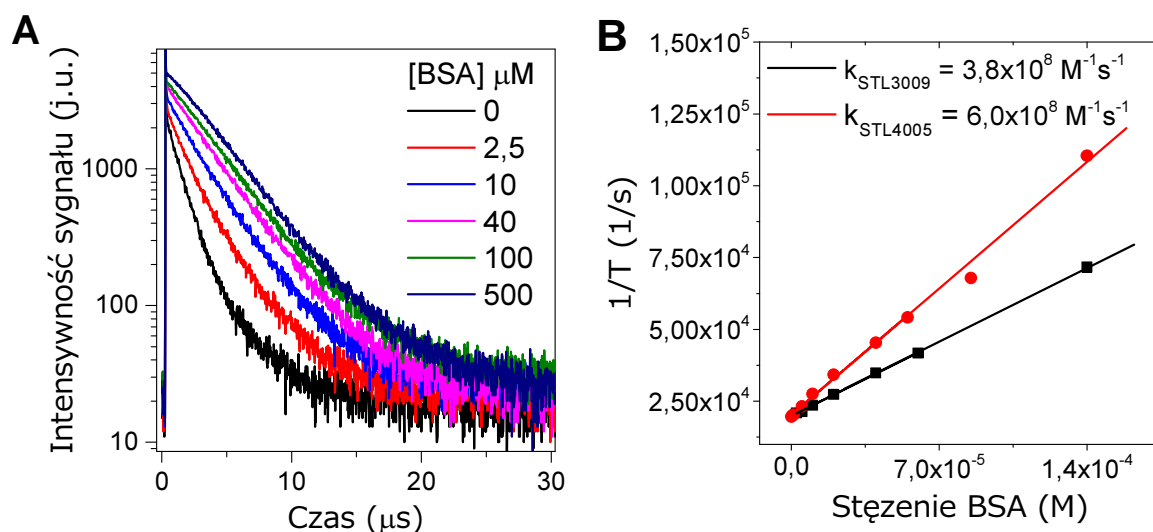
Wyznaczono wydajność kwantową generacji tlenu singletowego w próbkach zrównoważonych z powietrzem. Wyniki dla obu fotosensybilizatorów zebrano w Tab.6. W wodzie destylowanej ta wydajność wynosiła odpowiednio $0,041 \pm 0,004$, oraz $0,053 \pm 0,006$ dla STL3009 i STL4005, podczas gdy w buforze PBS zaledwie $0,004 \pm 0,002$ i $0,022 \pm 0,004$. Zamiana środowiska wodnego na ciężkowodne skutkowała dwukrotnym wzrostem wydajności kwantowej

fotogenerowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ przez STL3009 ($0,084 \pm 0,006$), oraz trzykrotnym wzrostem dla fotosensybilizatora STL4005 ($0,15 \pm 0,02$). W środowisku micelarnym TX-100/PBS wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez STL4005 jest ponad dwukrotnie wyższa niż przez STL3009. W bardziej polarnym otoczeniu rozpuszczalników organicznych MeOH i acetonu wydajności STL3009 są o około 25% wyższe niż STL4005 i wynoszą odpowiednio $0,81 \pm 0,02$ oraz $1,05 \pm 0,04$.

Tab.6 Wydajności kwantowe fotogeneracji tlenu singletowego przez 20 μM STL3009 zmierzone w różnych mikrośrodkach nasyconych powietrzem. Pomiar przeprowadzono metodą rozdzielczej czasowo detekcji fosforescencji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w 1270nm przy wzbudzeniu promieniowaniem lasera impulsowego o długości 523nm. Jako standard zastosowano RB [120].

Rozpuszczalnik	Φ_{STL3009}	Φ_{STL4005}
WD	$0,041 \pm 0,004$	$0,053 \pm 0,006$
PBS	$0,004 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,004$
D2O	$0,084 \pm 0,006$	$0,15 \pm 0,02$
D2O(PBS)	$0,014 \pm 0,005$	$0,050 \pm 0,005$
TX-100/PBS	$0,094 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$
MeOH	$0,81 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,02$
Aceton	$1,05 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,03$

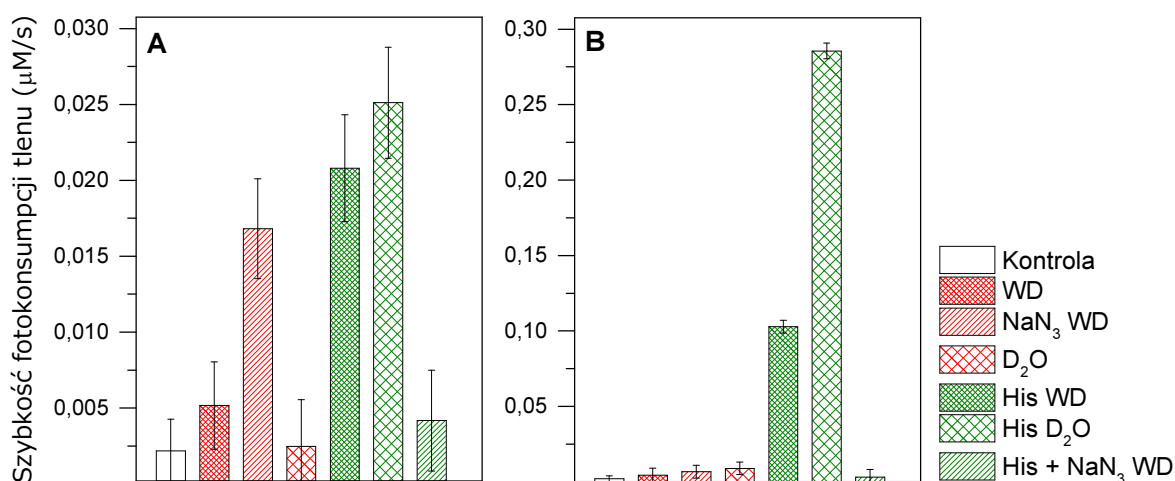
W dalszych badaniach sprawdzono wpływ BSA na fosforescencję tlenu singletowego fotogenerowanego przez STL3009 i STL4005. W środowisku wody destylowanej, dodawanie białka skutkuje gwałtownym wzrostem intensywności oraz wydłużeniu czasu życia fosforescencji fotosensybilizatorów, co uniemożliwia analizę słabej komponenty sygnału fosforescencji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Przykładowe sygnały rejestrowanej luminescencji przy 1270nm podczas dodawania BSA, pokazano dla STL4005 na Rys.69(A). Przeprowadzono analogiczne badania w środowisku ciężkowodnym. W obecności wzrastających stężeń BSA w D₂O czas życia komponenty odpowiadającej fosforescencji tlenu singletowego skraca się, a wyliczona stąd stała szybkości oddziaływania $^1\text{O}_2$ z BSA wynosi $3,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ oraz $6,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, odpowiednio, dla pomiarów z udziałem STL3009 i STL4005 (Rys.69(B)).



Rys.69 (A) Wpływ BSA na kinetykę zaniku fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm fotogenerowanego przez STL3009 w środowisku wodnym. **(B)** Zależność stałej szybkości zaniku sygnału fosforescencji $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ od stężenia BSA zmierzona w PBS(D_2O). Próbkę była naświetlana impulsami laserowymi o długości fali 532nm.

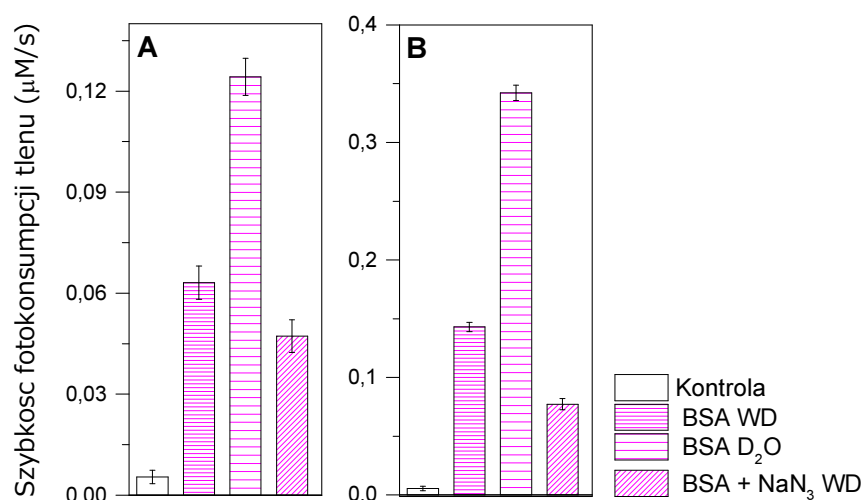
4.2.5. Fotokonsumpcja tlenu indukowana naświetlaniem STL3009 i STL4005

W wybranych układach modelowych zbadano konsumpcję tlenu indukowaną naświetlaniem światłem zielonym fotosensybilizatorów STL3009 i STL4005. Dla obu związków szybkość ubytku tlenu w wodzie i D_2O jest zaniedbywalna. Podczas gdy wprowadzenie 5mM NaN_3 do wodnego roztworu STL4005 nie wywołało większych zmian, konsumpcja tlenu wzrosła około trzykrotnie dla roztworu STL3009. Obecność histydyny przyspiesza tempo ubytku tlenu obu naświetlanych fotosensybilizatorów, przy czym efekt jest 5-krotnie wyższy dla STL4005. Podobnie, przyspieszenie ubytku tlenu w wyniku zamiany środowiska na ciężkowodne w obecności aminokwasu jest znacznie mniejsze dla STL3009. W obu przypadkach 5mM azydek sodu hamuje fotokonsumpcję obserwowaną w układzie z histydyną. Wyniki podsumowano na Rys.70.



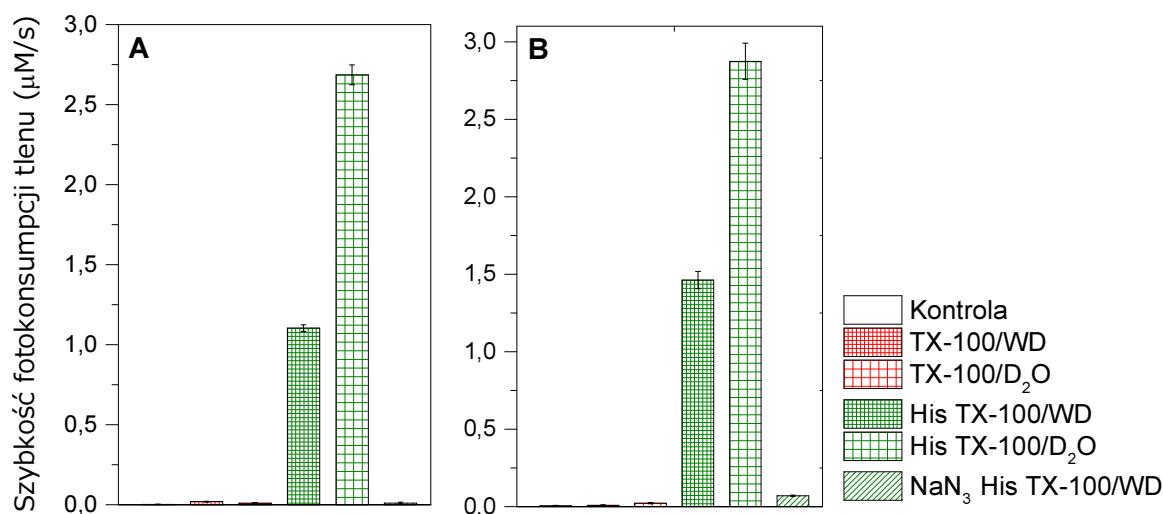
Rys.70 Wpływ histydyny ($100\mu\text{M}$), azydku sodu (5mM) oraz zamiany środowiska wodnego (wody destylowanej - WD) na ciężkowodne (D_2O) na szybkość konsumpcji tlenu indukowanej światłem zielonym w obecności $\sim 20\mu\text{M}$ **(A)** STL3009 oraz **(B)** STL4005. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu odpowiednio STL3009 i STL4005 dla (A) i (B) w WD w ciemności.

W obecności $100\mu\text{M}$ BSA fotokonsumpcja tlenu przy udziale STL3009 wzrasta około dziesięciokrotnie podczas gdy ten sam eksperyment z fotosensybilizatorem STL4005 pokazał trzykrotnie silniejszy efekt białka. Aby sprawdzić, czy w obserwowanym w tym układzie ubytku tlenu bierze udział stan $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, przeprowadzono badania z udziałem histydyny i azydku sodu. Zaobserwowano odpowiednio wzrost i spowolnienie fotokonsumpcji tlenu dla obu fotosensybilizatorów (Rys.71).



Rys.71 Wpływ azydku sodu (5mM) oraz D₂O na szybkość fotokonsumpcji tlenu indukowanej przez naświetlanie światłem zielonym około 20μM (A) STL3009 oraz (B) STL4005 w obecności 100μM BSA w wodzie destylowanej. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu odpowiednio dla STL3009 i STL4005 dla (A) i (B) z 100μM BSA w WD w ciemności.

W środowisku miceli 0,5% TX-100/WD szybkość konsumpcji tlenu indukowana naświetlaniem STL3009 lub 4005 jest zaniedbywalna (Rys.72). W celu pośredniej weryfikacji czy w układach generowany jest tlen singletowy, sprawdzono wpływ azydku sodu i histydyliny na tempo konsumpcji tlenu. W obecności obu fotosensybilizatorów wprowadzenie chemicznego wygaszacza tlenu singletowego spowodowało drastyczny wzrost tempa konsumpcji, który dodatkowo wzrósł około 2-krotnie po zamianie środowiska wodnego na ciężko-wodne. Dodany azydek sodu do próbek z histydyną w TX-100/WD, zgodnie z przewidywaniami, zahamował obserwowany proces.



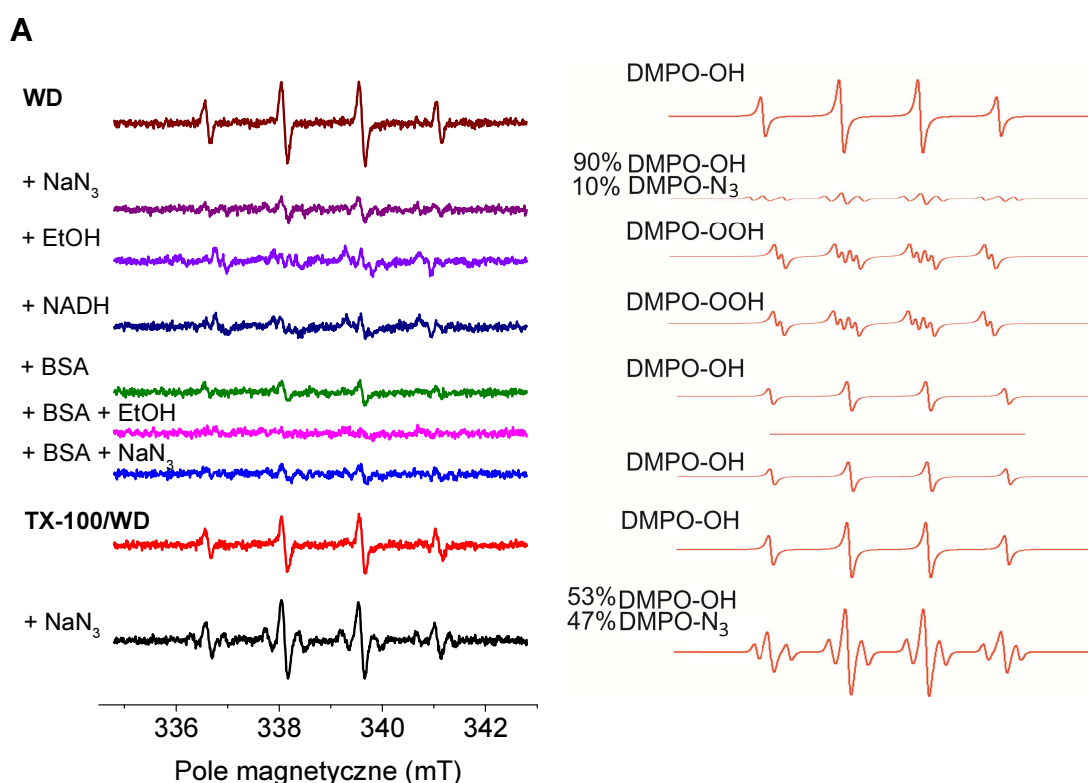
Rys.72 Szybkość fotokonsumpcji tlenu w fotosensybilizatorach **(A)** STL3009 oraz **(B)** STL4005 w środowisku miceli 0,5% TX-100/WD oraz reagentami wymienionymi w legendzie. W pomiarach użyto 5mM NaN₃ oraz 100μM histydy. Konsumpcja tlenu w układzie była indukowana światłem zielonym. Pomiar kontrolny stanowi szybkość konsumpcji tlenu odpowiednio STL3009 lub STL4005 dla (A) i (B) w 0,5% TX-100/WD w ciemności.

4.2.6. Pułapkowanie spinowe

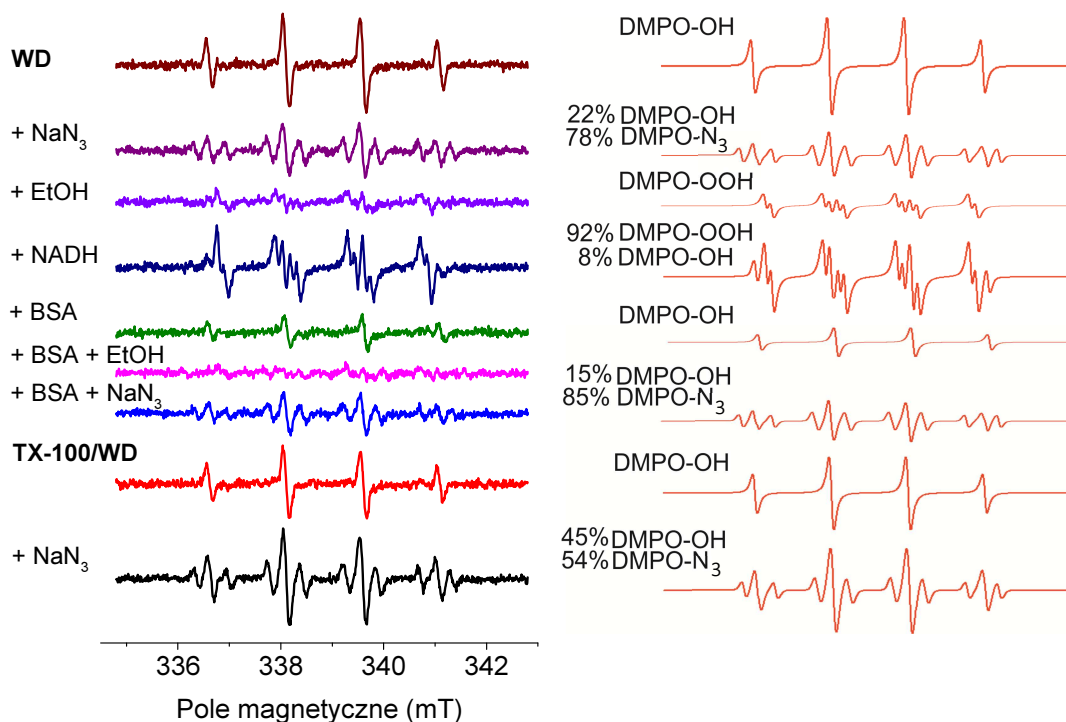
Otrzymane stałe rozszczepienia struktury nadsubtelnej wynoszą odpowiednio : $A_N = 1,50\text{mT}$, $A_H = 1,47\text{mT}$ dla DMPO-OH, $A_N = 1,42\text{mT}$, $A_H^\beta = 1,13\text{mT}$, $A_H^\gamma = 0,122\text{mT}$ dla DMPO-OOH, $A_N = 1,48\text{mT}$, $A_H^\beta = 1,42\text{mT}$, $A_N = 0,31\text{mT}$ dla DMPO-N₃ i są zbliżone do danych literaturowych [103].

Nie zaobserwowano żadnego sygnału w buforze PBS. W wodzie destylowanej 6-cio minutowe naświetlanie obu fotosensybilizatorów prowadzi do powstania adduktu DPMO-OH (Rys.73). Azydek sodu hamuje powstawanie tego sygnału, przy czym obserwuje się wyraźne nagromadzenie adduktu DMPO-N₃ w układzie z STL4005. Dodanie 10% EtOH, dla obu badanych pochodnych bakteriochlorofilu powoduje słabą akumulację adduktu DMPO-OOH. Naświetlanie STL4005 w obecności NADH prowadzi do pojawienia się stosunkowo wyraźnego sygnału będącego superpozycją adduktów DMPO-OOH i DMPO-OH w stosunku 92:8, podczas gdy ten sam eksperyment dla STL3009 pokazał jedynie słaby sygnał adduktu DMPO-OOH (Rys.73(B)). Dla obu fotosensybilizatorów otrzymane widmo EPR w obecności BSA charakteryzuje się

słabszą intensywnością niż pod nieobecność białka oraz wskazuje na generowanie adduktu DMPO-OH. Wprowadzenie azydku sodu nie wywołało znacznego efektu w układzie z STL3009, podczas gdy z STL4005 zaobserwowano dodatkową akumulację adduktu DMPO-N₃. Dla obu badanych pochodnych bakteriochlorofilu przeprowadzone badania w środowisku micelarnym TX-100/WD pokazały generowanie adduktu DMPO-OH. Wprowadzenie azydku sodu do badanych układów prowadzi do akumulacji zarówno adduktu DMPO-OH jak i silnego sygnału DMPO-N₃ (Rys.73).



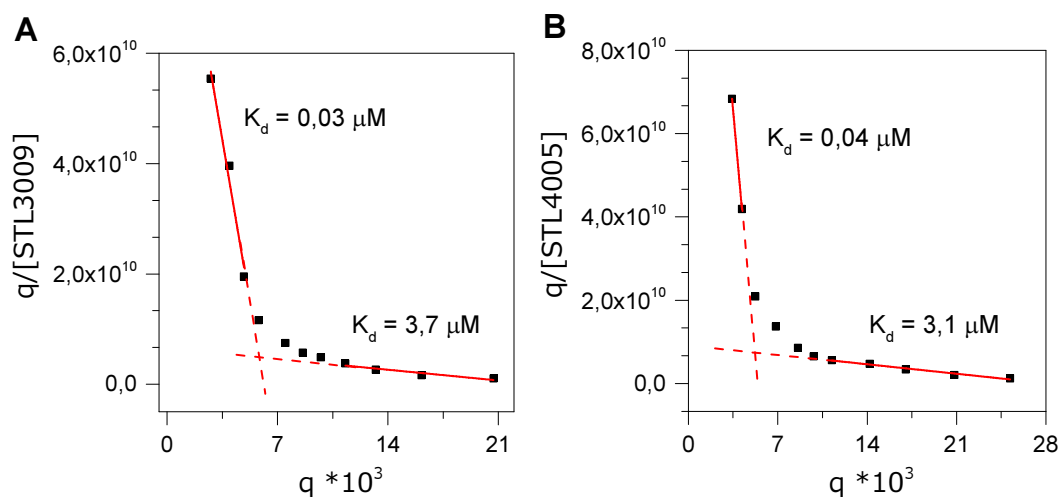
Rys. 73 (A) Widma EPR adduktów spinowych generowanych po 6-cio minutowym naświetlaniu światłem zielonym fotosensybilizatora STL3009 w środowisku wodnym WD i micelarnym TX-100/WD w obecności 0,1M DMPO. Próbkę opisano z lewej strony nad sygnałami widm EPR. Symulowane widma EPR do otrzymanych w eksperymencie sygnałów wraz z opisem obserwowanych adduktów pokazano po prawej stronie.

B

Rys. 73 (B) Widma EPR adduktów spinowych generowanych po 6-cio minutowym naświetlaniu światłem zielonym fotosensybilizatora STL4005 w środowisku wodnym WD i micelarnym TX-100/WD w obecności 0,1M DMPO. Próbkę opisano z lewej strony nad sygnałami widm EPR. Symulowane widma EPR do otrzymanych w eksperymencie sygnałów wraz z opisem obserwowanych adduktów pokazano po prawej stronie.

4.2.7. Pomiary fluorescencyjne

Podobnie jak w przypadku WST11, zaobserwowano spadek fluorescencji BSA (jego reszt tryptofanowych) po wprowadzeniu badanych fotosensybilizatorów. Wyniki przedstawiono w formie wykresów Scatcharda (Rys.74). Wyznaczone stałe dysocjacji dla STL3009 i STL4005 wynoszą odpowiednio: 0,03 i 3,7μM oraz 0,04 i 3,1μM



Rys.74 (B) Zmiany w widmie emisji fluorescencji tryptofanu dla 1 μ M BSA wraz ze zwieszaniem stężenia (A) STL3009 oraz (B) STL4005. Pomiar przeprowadzony w WD zgodnie z parametrami przedstawionymi w podrozdziale 3.2.2. q jest frakcją fluorescencji, która została wygaszona; odpowiada związanemu ligandowi. K_d oznacza stałą dysocjacji.

5. Dyskusja

5.1. WST11

5.1.1. Właściwości fotofizyczne WST11

Tendencja fotosensybilizatora do agregacji, oraz procesy zachodzące w pierwszych nanosekundach po zaabsorbowaniu fotonów, determinują wydajność reakcji fotochemicznych zachodzących przy udziale danego fotosensybilizatora w konkretnym mikrośrodowisku.

W polarnych rozpuszczalnikach organicznych, albo w obecności miceli TX-100/PBS, WST11 występuje w postaci zmonomeryzowanej [37], co potwierdzają wyniki pomiarów przeprowadzonych w ramach tej pracy (Rys. 5, 18). W niniejszej rozprawie pokazano ponadto widma absorpcji WST11 w kilku rozpuszczalnikach o różnej polarności (Rys.18). Część wyników wskazuje, iż pasmo Q_y fotosensybilizatora wykazuje właściwości pozytywnego solwatochromizmu – wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika, położenie maksimum pasma przesuwają się w stronę fal dłuższych. Oznaczałoby to, że stan wzbudzony związku jest bardziej polarny niż stan podstawowy; tak więc polarne rozpuszczalniki powinny go stabilizować [124], [125]. Efekt solwatochromizmu byłby o tyle istotny, że w określonych warunkach umożliwiałby charakterystykę mikrośrodowiska, na przykład ocenę lokalnej polarności w miejscu przyłączenia do białka. Z drugiej strony, położenie maksimum dla MeOH i DMSO nie jest spójne z proponowaną zależnością. Może to wynikać z dodatkowej zależności położenia maksimum absorpcji od protyczności środowiska [126]; o ile o ile DMSO charakteryzuje się znacznie wyższą wartością momentu dipolowego (3,96 D) niż metanol (1,70 D), DMSO jest rozpuszczalnikiem aprotycznym, którego cząsteczki nie uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych, podczas gdy metanol jest rozpuszczalnikiem protycznym zdolnym do udziału w wiązaniach wodorowych.

Jedną z najważniejszych właściwości efektywnego fotosensybilizatora jest duża wydajność przejścia międzysystemowego, które w efekcie prowadzi do generowania stanu trypletowego. Wzbudzony stan trypletowy charakteryzuje się dłuższym czasem życia ($\sim 10^{-6}$ - 10^{-3} s) niż mało stabilny wzbudzony stan singletowy (czas życia $\sim 10^{-12}$ - 10^{-9} s), co zwiększa prawdopodobieństwo

wykorzystania energii wzbudzenia w reakcjach chemicznych, prowadzących do powstania między innymi RFT. Niektóre metalo-pochodne bakteriochlorofili charakteryzują się wyjątkowo wydajnym przejściem międzysystemowym (interkombinacyjnym) ze wzbudzonego stanu singletowego do trypletowego. W pracy Mausewald'a [64] zauważono, że pochodne bakteriochlorofilu podstawione ciężkim atomem metalu jak np. Pd, w porównaniu do innych metalo-podstawionych pochodnych, np. Zn- albo Mg-, charakteryzują się bliską jednością wydajnością przejścia międzysystemowego (dla przykładu Pd-BChl w toluenie wydajność przejścia międzysystemowego sięga 0,994), przy czym czas życia wzbudzonego stanu trypletowego wynosi parę mikrosekund, natomiast czas życia wzbudzonego stanu singletowego wynosi zaledwie 65ps. Podobne wyniki otrzymano dla WST09, gdzie wydajność przejścia w MeOH oszacowano na 1 [62] oraz postulowano dla WST11 [37]. Wysoką wydajność przejścia międzysystemowego przypisuje się efektowi otwartej powłoki ciężkiego jonu centralnego, Pd^{2+} [64].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pomiarów przeprowadzonych przy użyciu femto- i pikosekundowej laserowej fotolizy błyskowej wykazują, że wzbudzenie WST11 w MeOH i w TX-100/PBS, prowadzi do niemal natychmiastowego (w czasie około 900fs) powstania formy przejściowej o absorpcji w zakresie 525-675nm, która tylko nieznacznie zmniejsza się podczas 1,5 nanosekundowego pomiaru (~10%) (Rys.34). Czas zaniku, 70 i 170ps dla środowiska rozpuszczalnika organicznego i miceli, odpowiednio, odpowiada prawdopodobnemu czasowi życia najniżej leżącego wzbudzonego stanu singletowego. Podobną wartość otrzymano dla Pd-BChl w pracy Musewalda i in. [64]. Blisko 3-krotnie dłuższy czas życia w TX-100/PBS niż w MeOH wynika z innego oddziaływania fotosensybilizatora z otoczeniem. Ponadto, wydłużony czas życia stanu wzbudzonego może wskazywać, iż fotosensybilizator znajduje się wewnątrz apolarnej części miceli [127]. Otrzymane dla MeOH i TX-100/PBS widma absorpcji przy 525-675nm po czasie 1ns od impulsu lasera można traktować jako widmo różnicowe w pełni utworzonego wzbudzonego stanu trypletowego. Co więcej, nasze badania pokazały silne zmiany w obserwowanym widmie różnicowym w obszarze blaknięcia, które charakteryzowały się tymi samymi czasami życia, co opisane zmiany absorpcji (Rys.28). Prawdopodobnie, obserwuje się zanik wzbudzonego stanu singletowego i tworzenie trypletowego, jednak znaczące nakrywanie się obu widm utrudnia

śledzenie procesu. Nie można wykluczyć, iż istotne informacje o stanie trypletowym fotosensybilizatora znajdują się w zakresie długości fal poniżej 500nm, (oraz powyżej 760nm). Niestety, specyfika dostępnego układu pomiarowego, czyli słaba intensywność światła monitorującego w 400-500nm oraz słaba czułość detektora przy tychże długościach fal, nie pozwoliły na obserwację produktu o absorpcji przejściowej poniżej 500nm. Stosując funkcję „Global Fit” odtworzono widmo różnicowe absorpcji tego stanu przejściowego (Rys.28). Położenie jego głównego maksimum przy około 760nm oraz czas zbliżony do czasu fluorescencji tej grupy fotosensybilizatorów [64], prowadzą do wniosku, że za obserwowane zjawisko w dużej mierze odpowiada emisja wymuszona [128]. Podobne wnioski wysunięto na podstawie pomiarów z Pd-Bchl [64]. W pracy Ashura [37], pomimo iż pokazano analogiczne zmiany, potraktowano je w całości jako odnawianie się stanu podstawowego WST11, co doprowadziło do błędnego wniosku, że zaledwie 70% molekuł z wzbudzonego stanu singletowego przechodzi w stan wzbudzony trypletowy.

WST11 zupełnie inaczej zachowuje się w środowisku wodnym. Nasze wyniki pokazują spadek intensywności pasm absorpcji, ich poszerzenie i przesunięcie położenia w stronę fal dłuższych względem położenia pasm obserwowanych w rozpuszczalniku organicznym (Rys.19-20). Obserwowane zjawisko związane jest z agregacją fotosensybilizatora. Jak wynika z niezależnych badań Brandisa [46], wraz ze wzrostem stężenia WST11 w PBS, tworzą się dimery fotosensybilizatora, co z kolei prowadzi do rozszczepienia pasma Q_y odpowiadającego dwu nowym przejściom elektronowym o wyższej i niższej energii. Widmo absorpcji dimerów pokazano jako rozmyte pasmo Soreta, przesunięte w kierunku fal dłuższych pasmo Q_x , oraz symetryczne do pasma przy 750nm dublet Q_y . Niestety, autorzy wspomnianej pracy nie pokusili się o dokładniejsze zbadanie i analizę zjawiska dimeryzacji tego związku; prawdopodobnie ma miejsce tworzenie dwóch rodzajów dimerów : „Typu H”, które tworzą rodzaj kanapki (tzw. „sandwich-type”) oraz Typu J, które traktuje się jako linowe agregaty (tzw. „Head-to-Tail”) [129]. Ich obecność może mieć istotne znaczenie w analizie stanów wzbudzonych zagregowanych próbek, a także w analizie produktów fotochemii fotosensybilizatora. W pracy Brandisa [46] zauważono również, że dalszy wzrost stężenia WST11 w buforze powodował tworzenie się oligomerów. Oligomery WST11 charakteryzują się jeszcze wyraźniejszym rozszczepieniem w Q_y z silniejszym pasmem przy ~720nm, a także

rozmytym obszarem Soreta i przesunięciem w kierunku fal dłuższych pasmem Q_x . Własne obserwacje wykazały tę samą zależność agregacji od stężenia fotosensybilizatora (nie pokazano). Pokazaliśmy natomiast wpływ dodatkowych czynników zewnętrznych na proces agregacji związku. W wodzie destylowanej widmo absorpcji 20 μ M WST11 wykazuje głównie symetryczne poszerzenie pasma Q_y oraz niewielkie przesunięcie pasma Q_x , co wskazywałoby na udział frakcji dimerów. Zwiększanie siły jonowej roztworu powodowało spadek pierwotnego pasma Q_y oraz narastanie charakterystycznego ramienia przy 720nm, co można wiązać z tworzeniem się oligomerów WST11 (Rys.19). Stężenie powyżej 0,01M PBS powoduje powstawanie nowego, przesuniętego w kierunku podczerwieni pasma absorpcji, które odpowiada słabszemu pasmu Q_y oligomeru bądź kolejnemu, wyższemu stanowi agregacji fotosensybilizatora (taki mechanizm agregacji stwierdzono dla innych fotosensybilizatorów z tej grupy [46]). Co więcej, pokazano, iż efekt agregacji zachodzi dla każdego ze składników PBS – NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (Rys.19(B)). Wpływ sił jonowych i dodawanych soli na agregację innych fotosensybilizatorów opisano w literaturze [130], [131].

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń ultraszybkiej fotolizy błyskowej próbki WST11 w PBS wykazały, że w ciągu pierwszych kilku pikosekund ponad połowa sygnału absorpcji różnicowej zanika (Rys.30), co można tłumaczyć rozpraszaniem energii wzbudzenia w obrębie agregatów. Nie zaobserwowano natomiast towarzyszącej spadkowi wzrostu absorpcji w obszarze trypletu, co sugeruje, iż energia zaabsorbowanych fotonów zostaje bezpowrotnie utracona nie prowadząc do powstania długożyjących wzbudzonych stanów cząsteczek. Nie znaleziono doniesień literaturowych opisujących to zjawisko dla pochodnych bakteriochlorofilu, jednak podobne badania przeprowadzono na porfirynie TPPS4 (5,10,15,20- tetra-(4-sulfofenylo)porfiryna) [132]. Utożsamianie niestabilnego stanu przejściowego z agregacją próbki zdaje się znajdować potwierdzenie w pomiarze wykonanym w wodzie destylowanej, gdzie próbka jest zagregowana w mniejszym stopniu i gdzie zaobserwowano mniejszy udział szybkiej komponenty (Rys.31). Obecność szybko zanikającej komponenty sygnału w pikosekundowej fotolizie błyskowej dla WST11 pokazali uprzednio inni badacze [37], jednak nie zaproponowali oni żadnego wytłumaczenia tej zależności. Ashur i in. wnioskowali natomiast, że w badanym zakresie czasowym, tworzą się dodatkowe stany przejściowe utożsamiane z kationową formą WST11 [37]. Należy podkreślić, że badania przeprowadzone

przez nas nie potwierdzają tych obserwacji. W innej pracy, w której badano właściwości fotofizyczne bakteriochloryny A w różnych mikrośrodkach [133], postulowano, że w wodzie, gdzie fotosensybilizator ten występuje jako mieszanina dimerów i monomerów, tylko pojedyncze cząsteczki są zdolne efektywnie utworzyć wzbudzony stan trypletowy. Nie można jednak wykluczyć, iż cząsteczki będące w formie dimeru również mogą utworzyć wzbudzony stan trypletowy, (ekscymer), chociaż zapewne z mniejszą wydajnością kwantową aniżeli cząsteczki fotosensybilizatora w formie monomerycznej. Nie znaleziono doniesień literaturowych o tym procesie dla badanej grupy pochodnych bakteriochlorofili, jednak opisywano wzbudzone stany trypletowe dla dimerów „typu J” TPPS4 [132]. Niestety, w przypadku WST11 zbyt mała wiedza o stanach agregacji fotosensybilizatora oraz warunkach, które mogą sprzyjać tworzeniu konkretnych form agregacyjnych, oraz brak dostępu do odpowiedniej aparatury umożliwiającej przeprowadzenie niezbędnych pomiarów, uniemożliwiły dogłębną analizę i zrozumienie zjawiska.

Wyniki obecnej pracy wykazują, iż czynnikiem silnie ograniczającym wydajność wzbudzenia WST11 w wodzie jest jego agregacja. Sytuacja zmienia się w obecności BSA, która sprzyja monomeryzacji WST11 (Rys.23). Świadczą o tym obserwowane zmiany widm absorpcji fotosensybilizatora ze wzrostem stężenia BSA w wodzie destylowanej i w PBS. Należy jednak podkreślić, iż nawet przy wysokim stężeniu białka, około 0,5mM, widmo absorpcji nie posiada charakterystyki typowej dla widma formy w pełni zmonomeryzowanej jak w środowisku rozpuszczalników organicznych lub miceli TX-100 (nie pokazano). Nie wyklucza się tworzenia kompleksów dimerów WST11 z BSA. Takie zjawisko obserwowano dla porfiryn [134]. Wyniki pomiaru absorpcji korelują z bardziej szczegółowymi badaniami przeprowadzonymi przez grupę z Instytutu Weizmanna, gdzie między innymi wyznaczono powinowactwo fotosensybilizatora do albuminy i postulowano tworzenie się niekowalencyjnych kompleksów WST11-albumina [37], [46]. Brak jednak szczegółowych informacji odnośnie charakteru miejsc przyłączenia fotosensybilizatora do białka.

Tworzenie kompleksów z albuminą zaobserwowano też dla innych fotosensybilizatorów takich jak bakteriochloryny [135], chlorofile [136], róż bengalski [137], czy porfiryny [138], [139]. W innych badaniach zlokalizowano kilka możliwych miejsc w lub na powierzchni biopolimeru

albuminy, które mogą przyłączyć cząsteczkę fotosensybilizatora, między innymi dwie tzw. kieszenie (z ang. „Binding pockets”). Konformacja tych miejsc jest podobna, jednak residua wiążące są różne. I tak, (I) miejsce wiążące zawiera reszty aminokwasowe lizyny i histydyny; natomiast (II) miejsce zawiera argininę i tyrozynę. Ich wnętrze jest w większości apolarne, jednak znajdują się też wewnętrzne i zewnętrzne grupy polarne. Postuluje się, że w procesie tworzenia kompleksu i stabilizacji obcej cząsteczki uczestniczą wiązania wodorowe [135], [140].

Wyniki własne (Rys. 60), oraz otrzymane wcześniej przez grupę z Instytutu Weizmanna [37] pokazały spadek fluorescencji reszt tryptofanowych, towarzyszący dodawaniu WST11 do roztworu białka. Podczas gdy autorzy z Weizmanna poprzestali na tym wyniku, w obecnej pracy dokonaliśmy dalszej analizy zachodzących zmian fluorescencji. Poprzez przedstawienie wyników w formie wykresu Skatcharda (Rys.60) [141], [142] wykazano, iż istnieją co najmniej dwa miejsca wiążące WST11 z albuminą.

Zgodnie z postulatem monomeryzacji indukowanej obecnością białka, dodawanie BSA zmniejsza udział krótkożyjącego stanu przejściowego (Rys.32). Rośnie natomiast udział składowej odpowiadającej prawdopodobnie za wymuszoną emisję. Dla 0,5mM BSA, wciąż obserwuje się obecność krótkożyjącej komponenty (Rys.33), co może wskazywać na niepełną monomeryzację związku. Wniosek ten jest zgodny z wynikami analizy widm absorpcji omówionych w sekcji 4.1.1. Na podstawie porównania różnicowej absorpcji początkowej i po upływie 1ns, można przypuszczać, mniej cząsteczek znajdujących się w kompleksie z BSA, przeszło w stabilniejszy stan trypletowy (Rys.34), niż dla WST11 w MeOH. Zmierzone czasy zaniku, zarówno krótkiej komponenty jak i dłuższej komponenty, są dwukrotnie dłuższe co można tłumaczyć stabilizacją cząsteczki fotosensybilizatora po utworzeniu kompleksu z białkiem. W pracy grupy indyjskiej zwracano uwagę na sztywny charakter wiązania albumina-fotosensybilizator [143]. W innej pracy Zhong’a pokazano iż geometria oraz sztywna struktura wokół miejsca wiążącego ligandu, zmniejsza prawdopodobieństwo bezemisyjnej utraty energii wzbudzenia a także wydłuża czasy życia wzbudzonych stanów cząsteczki [144].

5.1.2. Stabilność wzbudzonego stanu trypletowego i jego oddziaływanie z tlenem

We wszystkich badanych układach modelowych, w nanosekundowych pomiarach laserowej fotolizy błyskowej, zaobserwowano zależne od tlenu indywidua cząsteczkowe z absorpcją przy 390-500nm oraz 690-790nm (Rys.35(A)), które można utożsamiać ze stanem trypletowym WST11 [37]. Występujące drobne różnice w kształcie bądź położeniu poszczególnych pasm to prawdopodobnie wpływ środowiska, w którym cząsteczka WST11 się znajduje (nie pokazano). Największe różnice w przebiegu rejestrowanego widma różnicowego odnotowano dla WST11 w PBS (Rys.36(A)). Przypuszcza się, iż związane jest to z udziałem wzbudzonych stanów trypletowych dimerów oraz z dodatkowym udziałem niezaniikającego pasma przy około 720nm (Rys.36(B)), które prawdopodobnie jest następstwem trwałego blaknięcia formy zagregowanej WST11 [62], [128]. Sygnał ten znika pod nieobecność tlenu co sugeruje, iż obserwowany proces to utlenianie. Ponadto nie zaobserwowano tego sygnału w środowiskach, gdzie WST11 występuje w formie zmonomeryzowanej (np. w obecności BSA). W oparciu o dostępną literaturę, uzasadnione wydaje się zapostulowanie, że obserwowane trwałe blaknięcie zachodzi w obrębie oligomerów i dimerów WST11 typu „H” [145]–[147].

Otrzymane przez nas wyniki wykazują zależność czasu życia stanu trypletowego WST11 od rozpuszczalnika, w którym się znajduje (Tab.1). W wodzie, gdzie występuje mieszanina monomerów, dimerów i oligomerów fotosensybilizatora, można oczekiwać otrzymania więcej niż jednego czasu zaniku. Zgodnie z wynikami brazylijskiej grupy badawczej [132], czas zaniku wzbudzonego stanu ekscymerowego dimeru powinien być krótszy niż wzbudzony stan trypletowy monomeru. Nasze wyniki nie wskazują na obecność dodatkowej składowej zaniku sygnału absorpcji przejściowej, jednak ze względu na niski stosunek sygnału do szumu nie wyklucza się iż są one poza możliwością detekcji na obecnym układzie pomiarowym. Przyjęto więc, że obserwowany zanik sygnału jest związany wyłącznie z zanikiem trypletu formy monomerycznej WST11. I tak, wzbudzony stan trypletowy w wodzie, niezależnie od stopnia zagregowania, czyli zarówno w wodzie destylowanej jak i w wodnym roztworze soli fizjologicznej PBS, cechuje się stosunkowo krótkim czasem życia $2,3\mu s$, co prawdopodobnie związane jest z dezaktywacją wzbudzonego stanu trypletowego w wyniku silnych oddziaływań

rotacyjnych i oscylacyjnych z cząsteczkami H_2O . W metanolu takie oddziaływania są znacznie słabsze, dzięki czemu obserwowany czas życia wzbudzonego stanu trypletowego jest dłuższy i wynosi $3,4\mu s$.

Uzyskane wyniki dobrze korelują z danymi literaturowymi [148]. Stałe gaszenia wzbudzonego stanu trypletowego przez tlen są dla MeOH i wody są zbliżone i wynoszą około $2,2-2,5 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$. W środowisku micelarnym dłuższy czas życia wzbudzonego stanu trypletowego można tłumaczyć przemieszczeniem się cząsteczek fotosensybilizatora do fazy apolarnej miceli, gdzie oddziaływania z rozpuszczalnikiem są zmniejszone, co przyczynia się do stabilizacji wzbudzonego stanu trypletowego WST11 [127]. Z drugiej strony, zaobserwowano dwukrotnie słabsze gaszenie wzbudzonego stanu trypletowego tlenem cząsteczkowym, podczas gdy spodziewano się nieco silniejszego gaszenia w wyniku wyższego stężenia tlenu w fazie apolarnej miceli $[O_2] = 0,78mM$ [116]. Nie można wykluczyć, iż wypadkowy efekt ma również związek z różną dyfuzją tlenu w fazie wodnej i w micelach.

Wyniki badań metodą laserowej fotolizy błyskowej dla próbek w obecności BSA sugerują stabilizujące właściwości albuminy. Wydłużenie czasu życia wzbudzonego stanu trypletowego, oraz 2,6-krotnie niższa stała oddziaływania z tlenem mogą oznaczać, że kompleksowanie fotosensybilizatora z albuminą przynajmniej częściowo izoluje go od otoczenia. Co więcej, zanik stanu trypletowego ma charakter eksponencjalny, co może świadczyć o obecności tylko jednego miejsca determinującego przyłączenia WST11 do BSA. Taki wniosek jest zgodny z wynikami pracy Vayi i in. [149], którzy obserwowali różne czasy życia kompleksu z fulbiprofenem w zależności od miejsca jego przyłączenia do albuminy.

Warto zwrócić uwagę na wydłużenie o połowę czasu życia trypletu w D_2O w stosunku do lekkiej wody. Najprawdopodobniej związane jest to ze słabszym oddziaływaniem wzbudzonego stanu trypletowego WST11 ze stanami wibracyjnymi /rotacyjno-oscylacyjnymi rozpuszczalnika [150]–[153]. Analogiczny efekt, 50% wzrost czasu życia stanu trypletowego w środowisku deuterowanym, został opisany dla fotosensybilizatora o innej strukturze chemicznej - błękitu metylenowego (MB) w pracy Alarcona i in. [153]. Efekt ciężkiej wody zaobserwowano również w przypadku kompleksu WST11-BSA, co może oznaczać, iż cząsteczka WST11 w tym kompleksie nie jest całkowicie izolowana od otoczenia. Brakuje doniesień

literaturowych opisujących właściwości podobnego kompleksu fotosensybilizatora z białkiem w D_2O , jednak analogiczne zjawisko obserwowano i dyskutowano dla kompleksu MB z związkami makrocyklicznymi złożonymi z elementów $=C_4H_2N_4O_2=$ (ang. Cucurbiturils) [153]. Ważną obserwacją obecnej pracy jest brak większego wpływu zmiany środowiska H_2O na D_2O na stałą szybkości oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem. Podobną zależność obserwowano podczas pomiarów w środowisku wodnym i deuterowanym z pochodną ftalocyjaniny [152].

Wyniki badań, otrzymanych w obecności albuminy, wykazały istnienie dodatkowego stanu przejściowego cząsteczki WST11 o czasie życia 50ns (Rys.38). Identyfikacja tego indywiduum chemicznego nie jest trywialna, jednak kształt obserwowanego widma wskazuje na duże podobieństwo do superpozycji widm otrzymanych w wyniku jednoelektronowego elektrochemicznego utlenienia i redukcji WST11 [37]. Można więc postulować, iż za obserwowany stan przejściowy odpowiadają kationo-rodnik i aniono-rodnik WST11. Jest bardzo prawdopodobne, że donorami i ewentualnie akceptorami elektronu, zaangażowanymi w tworzenie tych rodnikowych form fotosensybilizatora są reszty aminokwasowe w miejscu przyłączenia WST11. W pracy Kobori'ego zaobserwowano fotoindukowany, sprzężony z protonami, transfer elektronów (z ang. 'proton-coupled electron transfer') między przyłączonym do albuminy fotosensybilizatorem a resztą aminokwasową tryptofanu [84].

Podsumowując, wyniki obecnej pracy wyniki pokazują, iż monitorowanie czasów życia trypletu laserową fotolizą błyskową może być wygodną metodą śledzenie procesu kompleksowania WST11 z białkiem (Rys.39).

5.1.3. Zdolność WST11 do generowania tlenu singletowego

Wydajność generowania tlenu singletowego zależy od energii wzbudzonego stanu trypletowego [154], potencjału redoks fotosensybilizatora [155], oraz od polarności rozpuszczalnika [156], [157]. Dodatkowo, szczególnie gdy czas życia trypletu jest stosunkowo krótki (rzędu mikrosekund), można się spodziewać silnej zależności wydajności generowania tej reaktywnej formy tlenu od lokalnego stężenia tlenu.

Generowanie tlenu singletowego przez badany sensybilizator wykazaliśmy zarówno metodą bezpośrednią, rejestrując charakterystyczną fosforescencję $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ przy 1270nm, jak i pośrednią, na drodze pomiarów fotokonsumpcji tlenu w obecności akceptorów i wygaszaczy tlenu singletowego. Przedstawione wyniki badań sugerują, że tlen singletowy jest generowany wydajnie w roztworach z relatywnie polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak MeOH i aceton (Tab.2). Za wysoką wydajność kwantową generowania tlenu singletowego – 0,83 i 1 w MeOH i acetonie, odpowiednio, odpowiedzialna jest polarność rozpuszczalnika oraz wysokie stężenie tlenu w takich roztworach (2,19mM w MeOH, [115]), co z kolei zwiększa prawdopodobieństwo przekazu energii ze wzbudzonego WST11 na cząsteczkę tlenu. Warto podkreślić, że w micelach wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego jest znacznie niższa niż w rozpuszczalnikach organicznych, co może być częściowo związane z gorszym dostępem cząsteczki fotosensybilizatora do tlenu, jak postulowano w poprzednim paragrafie. Pośrednim dowodem na generowanie tlenu singletowego w tym układzie był gwałtowny wzrost fotokonsumpcji tlenu po dodaniu silnego chemicznego wygaszacza tlenu singletowego, histydyny (Rys.51), przy czym proces ten ulegał zahamowaniu po wprowadzeniu fizycznego wygaszacza $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, azydku sodu.

Otrzymane wyniki rozdzielczo-czasowej detekcji tlenu singletowego przy 1270nm wykazały, że tlen singletowy generowany jest przez WST11 również w wodzie (Rys.42, 43). Jest to ważna obserwacja, gdyż dotychczas uważano [37], iż fotosensybilizowane utlenianie przy udziale WST11 zachodzi wyłącznie poprzez mechanizm Typu I, czyli na drodze przekazu elektronu i produkcji wolnych rodników. Należy jednak podkreślić, że pomiary fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm zostały przeprowadzone w powyższej pracy przy użyciu układu pomiarowego opartego na detektorze germanowym oraz laserze wzbudzającym, generującym

milidżulowe błyski z małą częstotliwością. Taki układ charakteryzuje się znacznie mniejszą rozdzielczością czasową oraz niższą czułością detekcji tlenu singletowego i dlatego nie była możliwa rejestracja słabego sygnału luminescencji tlenu singletowego, który dodatkowo maskowany był przez intensywną fosforescencję samego fotosensybilizatora. Ponadto, układ pomiarowy wykorzystany w tamtej pracy nie był przystosowany do badania mało stabilnych fotosensybilizatorów takich jak WST11, czego wynikiem była znaczna degradacja fotosensybilizatora w trakcie pomiaru. System do pomiaru rozdzielczej czasowo fosforescencji tlenu singletowego użyty obecnie, jest znacznie lepiej przystosowany do badania tego typu fotosensybilizatorów (podrozdział 3.2.5). Stosując ten bardziej zaawansowany układ pomiarowy dokonano separacji słabej komponenty tlenu singletowego, co umożliwiło wyznaczenie wydajności kwantowej generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ przez $20\mu\text{M}$ WST11, zarówno w buforze PBS jak i w wodzie destylowanej, która wynosi około 0,028 i 0,043 (Rys.43(B), Tab.2). Wyznaczona w ten sposób wartość wydajności kwantowej jest jednak zaniżona, między innymi dlatego, że – jak wyżej wykazano - badana próbka ulega agregacji w roztworach wodnych. Ponadto, obecne wyniki wyraźnie wskazują, że zwiększenie siły jonowej roztworu powoduje spadek wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego. I tak, dla $20\mu\text{M}$ WST11 wydajność kwantowa generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ spada z 0,043 w WD do 0,016 w 50mM PBS (Rys.44). Wpływ siły jonowej buforu na wydajność kwantową fotogenerowania tlenu singletowego można tłumaczyć wzmożoną agregacją fotosensybilizatora w środowisku o zwiększonym stężeniu jonów. Dodatkowym czynnikiem, który może obniżać mierzoną efektywność generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ jest oddziaływanie tlenu singletowego z samym sensybilizatorem oraz jego agregatami (Rys.45).

Wyniki badania procesu fotodegradacji WST11, sekcja 4.1.4.4, prowadzą do wniosku, iż głównym produktem naświetlania jest Pd-Chloryna. Wydaje się jednak, że związek ten nie jest wynikiem oddziaływania fotosensybilizatora z tlenem singletowym, gdyż zamiana środowiska na D_2O a także dodanie azydki sodu nie przyniosło spodziewanych zmian w przebiegu fotodegradacji sensybilizatora (Rys.25). Można więc przypuszczać, iż oddziaływanie tlenu singletowego z agregatami ma głównie charakter fizyczny. Stała szybkości oddziaływania WST11 z $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w $\text{D}_2\text{O}(\text{PBS})$ wynosiła $(7,3 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, gdy tlen

singletowy generowany był przez samo WST11, oraz $(6,2 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, przy generacji przez zewnętrzny fotosensybilizator, jakim był róż bengalski (Rys.45).

Dodatkowym, pośrednim, dowodem na generowanie tlenu singletowego w układzie wodnym są wyniki pomiarów oksymetrii EPR (Rys.49). Zaobserwowano, między innymi, dwukrotny wzrost fotokonsumpcji po zamienieniu środowiska na ciężkowodne, znaczne przyspieszenie procesu w obecności histydyny, a także gaszący efekt azydku sodu.

Stwierdzono dwukrotnie wyższą wydajność generowania tlenu singletowego w środowisku deuterowanym niż w zwykłej wodzie (Rys.42-43, Tab.2), co można tłumaczyć mniejszą efektywnością oddziaływań wzbudzonego WST11 z poziomami oscylacyjno-rotacyjnymi rozpuszczalnika, przez co wydłuża się czas życia wzbudzonego stanu trypletowego fotosensybilizatora, jak również nieco niższą polarnością i wyższą rozpuszczalnością tlenu. Część pomiarów przeprowadzono w środowisku PBS(D₂O), ze względu na dłuższy czas życia fosforescencji tlenu singletowego, który pozwala na jego swobodną separację od szybciej zanikającej fosforescencji samego fotosensybilizatora (Rys.42). Fakt ten wykorzystano przy badaniu wpływu BSA na fosforescencję $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Wyniki sugerują, iż nawet w obecności wysokich stężeń BSA, generowany jest tlen singletowy, który zanika w wyniku efektywnego oddziaływania z cząsteczką albuminy (Rys.46). Wyznaczona stała gaszenia tlenu singletowego przez białko wynosi $(4,3 \pm 0,2) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rys. 47) i jest zbliżona do wartości literaturowej, $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [139]. Oddziaływanie ma charakter chemiczny, co pokazano w pomiarach oksymetrii EPR w sekcji 4.1.5.3 (Rys.53).

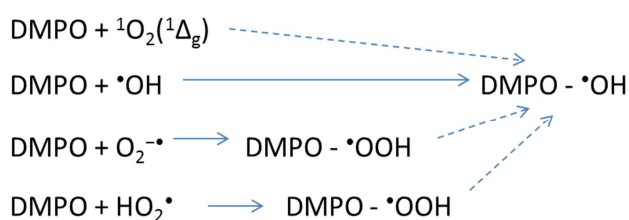
Ponadto, otrzymane wyniki pokazały szybki ubytek tlenu w obecności białka. Wzrost szybkości tego procesu po wprowadzeniu histydyny lub zamianie środowiska buforu PBS na PBS(D₂O) sugeruje obecność tlenu singletowego w badanym układzie. Co więcej, zaobserwowano znaczne zahamowanie konsumpcji po wprowadzeniu azydku sodu. Sugeruje to, iż przynajmniej część obserwowanej fotokonsumpcji ma związek z oddziaływaniem BSA z $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Wynik jest niezwykle istotny, gdyż dotychczas fotokonsumpcję tlenu w obecności albuminy traktowano jako proces wyłącznie wolnorodnikowy [37]. Jednocześnie fakt, iż nawet w obecności azydku sodu obserwuje się większy ubytek tlenu niż dla samego WST11 w PBS, wskazuje na prawdopodobny udział innych form tlenu w procesie (utleniania białka) (Rys.53).

Nie znaleziono literatury, ani odnośników do niej, opisującej utlenianie albumin przez pochodne bakteriochlorofili. Z drugiej strony, zjawisko utleniania białka na drodze mechanizmu I i II typu fotosensybilizowanego utleniania indukowanego porfiryną DDP(V)TPP (z ang.: di (3,6-dioxadecyloxo) Tetraphenyl PorphyrinatoPhosphorus(V) Chloride) opisano w niedawnej pracy [158]. Autorzy ci postulują ponadto, iż w obu mechanizmach celem reaktywnych form tlenu jest głównie tryptofan.

5.1.4. Fotogenerowanie wolnych rodników przy udziale WST11

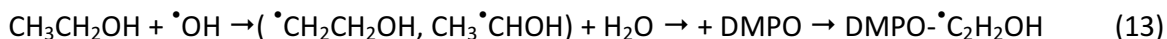
W dotychczas opublikowanych pracach postulowano, iż WST11 w środowisku wodnym tworzy wyłącznie wolne rodniki. Sugerowano również, iż w obecności albuminy, WST11 łączy się w niekowalencyjny kompleks, który działa niczym aktywowana światłem oksydoreduktaza zdolna do wielokrotnego transferu elektronu na cząsteczkę tlenu [37]. Aby zweryfikować mechanizm fotosensybilizowanego utleniania przy udziale WST11, przeprowadziliśmy serię pomiarów metodą pułapkowania spinowego EPR oraz oksymetrii EPR.

Chociaż podczas naświetlania światłem zielonym WST11 w PBS w obecności i pod nieobecność BSA, zarejestrowano sygnał adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$, obserwacja ta nie pozwala na jednoznaczne ustalenie mechanizmu powstania adduktu (Rys.55). I tak, pojawienie się tego adduktu można przypisać oddziaływaniu pułapki spinowej z $^{\bullet}\text{OH}$ ($3,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), utlenieniu DMPO przy pomocy $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) [159], [160], jak również rozkładowi adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$, który w pierwotnym procesie powstał w wyniku oddziaływania pułapki spinowej $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) lub $\text{O}_2\text{H}^{\bullet}$ ($6,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), przy czym $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$, jako mało stabilny addukt, w wodzie szybko przekształca się do długożyjącego $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ (okres półtrwania adduktu $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OOH}$ wynosi ok. 50s, podczas gdy $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ 23min). Procesy, które mogą prowadzić do powstania $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ przedstawiono na schemacie poniżej, patrz Rys.75. Słabszą intensywność rejestrowanego sygnału w obecności BSA można tłumaczyć antyoksydacyjnymi właściwościami białka skompleksowanego z fotosensybilizatorem [161]–[164]. Można oczekiwać, że w takich warunkach reszty aminokwasowe albuminy konkurują z DMPO o rodniki $^{\bullet}\text{OH}$.



Rys.75 Schemat powstawania adduktu DMPO-OH.

Uzyskane w tych pomiarach wyniki sugerują, że widmo adduktu DMPO- $\cdot\text{OH}$ zarejestrowane w badanych próbkach może powstawać w wyniku wszystkich czterech wspomnianych procesów. Z jednej strony, spadek sygnału DMPO- $\cdot\text{OH}$ po wprowadzeniu azydku sodu może wskazywać na rolę tlenu singletowego, który powinien być gaszony przez azydek. Z drugiej strony, spadek sygnału adduktu DMPO- $\cdot\text{OH}$ i obserwacja sygnałów DMPO- $\cdot\text{N}_3$ oraz DMPO- $\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{OH}$, odpowiednio po dodaniu NaN_3 oraz EtOH, wydajnych zmiataczy rodnika hydroksylowego (stałe oddziaływania z rodnikiem hydroksylowym wynoszą odpowiednio: $1.2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [165] oraz $7,2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [15]), przemawia za obecnością $\cdot\text{OH}$ w naświetlanych układach (Rys.55).



Rodnik azydkowy może też powstać na drodze bezpośredniego przekazu energii ze wzbudzonego stanu trypletowego fotosensybilizatora na anion azydkowy, co pokazano w niezależnych badaniach w przypadku błękitu metylenowego, jako fotosensybilizatora [166]. Jednak w przeciwieństwie do wyników cytowanej pracy, naświetlanie próbki zawierającej $20\mu\text{M}$ WST11 i 5mM NaN_3 w warunkach beztlenowych nie prowadziło do akumulacji adduktu azydkowego (wyniku nie pokazano).

Sygnały otrzymanego adduktu DMPO- $\cdot\text{N}_3$ są jednakowe dla układu z $100\mu\text{M}$ BSA i pod jej nieobecność (Rys.55). Biorąc pod uwagę wysoką stałą oddziaływania $\cdot\text{OH}$ z BSA ($2,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [15]) rzeczywiste generowanie rodnika hydroksylowego powinno być więc wyższe w próbce zawierającej albuminę. Brak całkowitego wygaszenia adduktu DMPO- $\cdot\text{OH}$ po dodaniu azydku sodu można tłumaczyć pozostałością z przekształcenia mało stabilnego adduktu DMPO- $\cdot\text{OOH}$

[167], natomiast obecność adduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ w próbce zawierającej WST11, PBS i 10%EtOH może być związane z generowaniem $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) bądź $\text{O}_2^{\cdot-}$. Dalsze wyniki otrzymane dla WST11 w PBS z i pod nieobecność BSA pokazały wygaszanie sygnału adduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ przez SOD (Rys.56) co sugeruje, iż w układzie obecny jest też anionorodnik ponadtlenkowy. Spodziewać się można, iż anionorodnik ponadtlenkowy w wodzie jest produkowany bezpośrednio, poprzez fotoindukowany transfer elektronu z cząsteczki WST11 na $^3\text{O}_2$ [37]. Dodanie donora elektronu do układu WST11 w PBS powinno więc zwiększyć fotoprodukcję adduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OOH}$ i ewentualnie $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$, jako produktu rozpadu $\text{DMPO}\cdot\text{OOH}$. Jednak obecne wyniki pokazały spadek intensywności adduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ bez formacji charakterystycznego dla $\text{O}_2^{\cdot-}$ widma EPR (Rys.55). Być może wydajność generowania anionorodnika jest niska w tym układzie, natomiast wysokie stężenie NADH zwiększyło prawdopodobieństwo konkurencyjnej reakcji NADH z $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k = 271 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Wprowadzenie azydku sodu do powyższego układu skutkowało spadkiem sygnału bez formacji charakterystycznego adduktu azydkowego, co świadczy o prawdopodobnym udziale tlenu singletowego.

Ciekawym wynikiem jest brak większego wpływu katalazy na obserwowany sygnał rejestrowanego adduktu, co może wskazywać na brak udziału H_2O_2 w reakcjach prowadzących do powstania $\cdot\text{OH}$ [168]. Czynnikiem, który może mieć istotny wpływ podczas generowania rodnika hydroksylowego, jest jon atomu palladu, co postulowano w literaturze [169]. Przypuszcza się, iż duży wpływ na obserwowane wyniki ma wysoki stopień agregacji próbki. Niestety, brakuje doniesień literaturowych na temat wpływu agregacji na generowanie rodników przez fotosensybilizatory należące do grupy pochodnych bakteriochlorofili. Natomiast w pracy grupy rosyjskiej [170] wykazano, iż zagregowana merocyjanina zwiększa swoją efektywność fotodynamiczną, która nie jest wynikiem generowania tlenu singletowego.

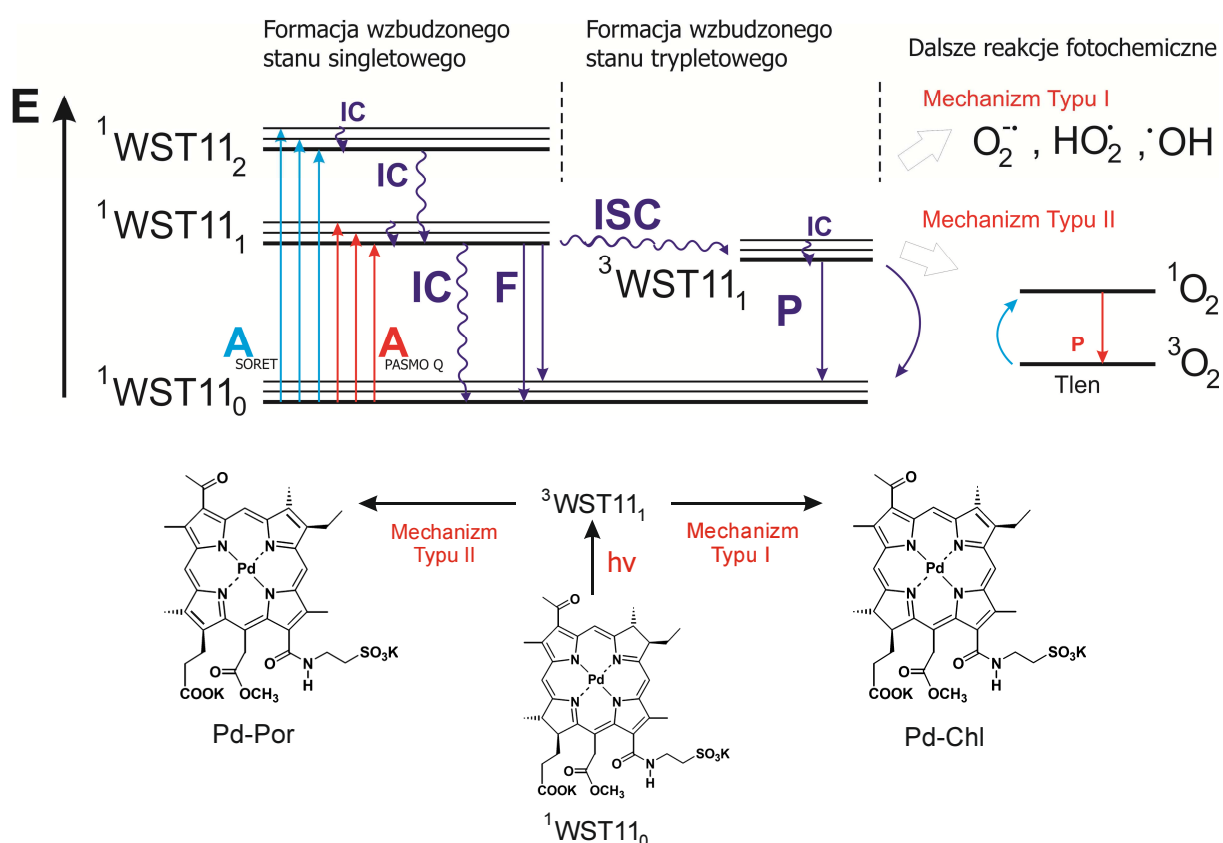
Bezpośredniej weryfikacji produkcji anionorodnika dokonano w układzie wysokiego stężenia fotosensybilizatora (200mM) w PBS z dodatkiem 10%EtOH, gdzie równolegle obserwowano addukty $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ i $\text{DMPO}\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Rys.57). Jednak w tym układzie, wysoki stopień agregacji prawdopodobnie zakłóca zachodzące fotoreakcje. Pośrednim dowodem na fotogenerowanie anionorodnika ponadtlenkowego przez WST11 są pomiary, które przeprowadzono w środowisku wody destylowanej, gdzie fotosensybilizator charakteryzuje się mniejszą

agregacją niż w PBS (Rys.58). Wyniki otrzymane dla 20 μ M WST11 wykazały, iż w pierwszych minutach pomiaru ma miejsce akumulacja głównie adduktu DMPO- $\cdot$ OOH, który z czasem przekształca się w addukt DMPO- $\cdot$ OH. Dodanie do układu etanolu skutkowało pojawieniem się czystego adduktu DMPO- $\cdot$ OOH, natomiast dodanie NADH, zarówno w obecności jak i pod nieobecność BSA, skutkowało obserwacją intensywnego sygnału EPR głównie pochodzącego od DMPO- $\cdot$ OOH. Różne wyniki od tych obserwowanych w PBS są prawdopodobnie wynikiem niskiego pH ($\sim$ 5,5 - 6) oraz mniejszej siły jonowej. W tych warunkach, kiedy zachodzi większe prawdopodobieństwo reakcji dysmutacji (sekcja 1.2.3.1, reakcja(5-7)), czas życia anionorodnika ponadtlennego powinien być krótszy niż w buforze PBS. Z drugiej strony, w próbce powinno się znajdować więcej rodnika wodoronadtlenkowego, którego stała oddziaływania z DMPO jest wyższa niż dla $O_2^{\cdot-}$ (sekcja 1.2.3.1, reakcja(4)) wyższy stopień monomeryzacji WST11 niż w PBS powinien sprzyjać wyższej efektywności fotochemicznej, między innymi w generowaniu reaktywnych form tlenu.

Wyniki otrzymane przy zastosowaniu metody pułapkowania spinowego nie są łatwe do analizy. Wydaje się iż duże znaczenie, szczególnie w produkcji wolnych rodników, ma obecność zagregowanej formy WST11, która jak wcześniej wspomniano może uczestniczyć w fotochemii WST11. Zwiększony udział Typu I fotosensybilizowanego utleniania w zagregowanych próbkach obserwowano między innymi w porfirynach [171].

5.1.5. Podsumowanie mechanizmu fotosensybilizowanego utleniania przy udziale WST11

Proponowany mechanizm fotosensybilizowanego utleniania przy udziale WST11 przedstawiono schematycznie na zmodyfikowanym diagramie Jabłońskiego, gdzie zaznaczono najważniejsze zależności i zjawiska wpływające na efektywność badanej pochodnej Pd-Bakteriofeoforbidu, patrz Rys.76.

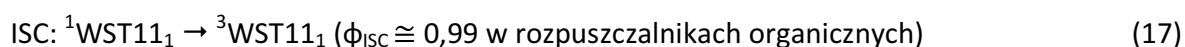
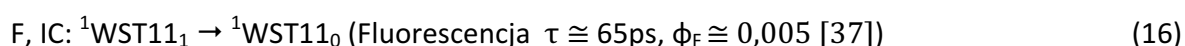


Rys.76 (A) Proponowany uproszczony diagram Jabłońskiego dla WST11 oraz **(B)** schemat powstawania głównych produktów fotodegradacji WST11. Symbole na rysunkach oznaczają kolejno: $^1\text{WST11}_0$ – stan podstawowy fotosensybilizatora; $^1\text{WST11}_2$, $^1\text{WST11}_1$ – wzbudzone stany singletowe; $^3\text{WST11}_1$ – wzbudzony stan trypletowy; E- energia; A – absorpcja; IC – konwersja wewnętrzna; F – fluorescencja, ISC – przejście międzysystemowe, P – fosforescencja; Pd-Por – Pallado Porfiryne; Pd-Chl – Pallado Chloryna.

W wyniku absorpcji fotonów WST11 przechodzi do wzbudzonego stanu singletowego. Wyższe i niższe stany energetycznie, generowane po wzbudzeniu światłem o długości fal z zakresu Soreta lub pasma Q, zaznaczono schematycznie jako $^1\text{WST11}_2$, $^1\text{WST11}_1$. W uproszczeniu można zapisać:



Otrzymane wyniki pokazują, iż czas życia wzbudzonego stanu singletowego WST11 jest rzędu kilkudziesięciu pikosekund w MeOH, H₂O natomiast dłuższy w środowisku micelarnym lub po skompleksowaniu z BSA. Krótki czas trwania tych stanów ogranicza reaktywność chemiczną. Wzbudzona cząsteczka WST11 może relaksować do stanu podstawowego w wyniku fluorescencji lub konwersji wewnętrznej (zjawiska składające się na nią pewnie przebiegają z małym prawdopodobieństwem – brak szczegółowych danych na ten temat) lub - w wyniku przejścia międzysystemowego - utworzyć wzbudzony stan trypletowy. Dla fotosensybilizatora w postaci monomerycznej proces ten zachodzi z wydajnością kwantową bliską jedności. W przypadku zagregowanej formy fotosensybilizatora, proces ten zachodzi ze znacznie niższą wydajnością kwantową, bo stany elektronowe w ciągu kilku pikosekund tracą energię wzbudzenia głównie na drodze bezpromienistej. Chociaż możliwe jest utworzenie wzbudzonego stanu w obrębie dimeru, niewystraczająca rozdzielczość czasowa laserowej fotolizy błyskowej nie pozwoliła tego jednoznacznie doświadczalnie rozstrzygnąć.



Czas życia wzbudzonego stanu trypletowego WST11 wynosi 2-4 μs w środowisku wodnym lub w MeOH i ulega wydłużeniu w obecności miceli lub po skompleksowaniu z BSA. W każdym badanym rozpuszczalniku $^3\text{WST11}_1$ oddziałuje z $^3\text{O}_2$ z podobną stałą szybkości $\sim 2,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dla WST11 będącego w kompleksie z albuminą albo w obrębie miceli, szybkość oddziaływania z tlenem spada 8- i 2- krotnie, odpowiednio. W zależności od mikrośrodowiska, w którym się znajduje się fotosensybilizator możliwe są dwie drogi fotosensybilizowanego utleniania:

- **Mechanizm Typu II**



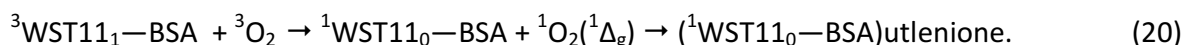
Otrzymane przez nas wyniki wskazują, iż prawdopodobnie tylko forma monomeryczna WST11 jest zdolna do fotogeneracji tlenu singletowego (równanie 18.). Co więcej, wykazano silną zależność wydajności generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ od stężenia tlenu (Tab.3). Mechanizm II fotosensybilizowanego utleniania faworyzowany jest w rozpuszczalnikach organicznych, gdzie stężenie tlenu jest o rząd wielkości wyższe niż w wodzie. I tak wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego w acetonie sięga jedności, natomiast w MeOH $\phi = 0,83$, podczas gdy w WD wynosi zaledwie 0,04.

Powstały tlen singletowy może uczestniczyć w procesach utleniania fotosensybilizatora, na co wskazują obserwacje wzrostu tempa zaniku WST11 w micelarnym środowisku TX-100 po zamianie środowiska wodnego na D_2O , oraz spowolnienie tego procesu po dodaniu azydku (patrz sekcja 4.1.1.4, Rys.27). Parametry widma absorpcji otrzymanego produktu fotodegradacji w środowisku o wysokiej wydajności generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, takim jak w MeOH i TX-100/PBS (Rys.22) sugerują, że jest to prawdopodobnie Pd-Porfiryna (Pd-Por) (Rys.76(B)), podobnie jak pokazano w literaturze w przypadku WST09 [62]. Powstały w tych warunkach fotoprodukt w tych warunkach jest wynikiem utlenienia, na co wskazuje silne spowolnienie jego powstawania po nasyceniu próbki argonem (Rys.24).



Co ciekawe, widmo absorpcji produktu fotodegradacji WST11 w obecności BSA wykazuje częściowe podobieństwo do porfiryновой pochodnej (Rys.23(D)). Z drugiej strony, w obecności PBS(D_2O) nie zaobserwowano przyspieszenia fotodegradacji i powstawania Pd-Por fotoproduktu, natomiast azydek sodu przyspieszył obserwowany proces a nie spowolnił. Przypuszcza się, iż powyższe zależności uwarunkowane są stężeniem tlenu w próbce. Szybka fotokonsumpcja tlenu w obecności BSA (Rys. 53), prowadzi do zużycia tlenu w próbce i do ochrony kompleksu przed reakcjami fotoutleniania.

Otrzymane wyniki wydają się potwierdzać generowanie tlenu singletowego nawet w obecności wysokich stężeń albuminy, który jednak niemal natychmiast przechwytywany jest przez białko, utleniając je (Rys.47(A)). Proces ten wnosi istotny wkład do obserwowanej fotokonsumpcji tlenu. Wydajność generowania tlenu singletowego nie została wyznaczona z powodu braku odpowiedniej próbki referencyjnej. Równanie 20. przedstawia schematycznie generowania tlenu singletowego z udziałem kompleksu WST11-BSA



- **Mechanizm Typu I**

W Typie I ma miejsce jednoelektronowe utlenianie fotosensybilizatora, co prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego:



Zostało to potwierdzone w środowisku wodnym przy pomocy pułapkowania spinowego EPR (sekcja 4.1.6, Rys.56-57). Podczas naświetlania próbki w wodzie głównym fotoproduktem jest Pd-Chl (Rys.23(C)). Otrzymane wyniki wykazały zależność jej tworzenia od tlenu w próbce (Rys.24(A)), przy czym pokazano, iż prawdopodobnie nie jest to produkt oddziaływania tlenu singletowego z fotosensybilizatorem (Rys.25). Co więcej, proces powstawania chlorynowego produktu można istotnie spowolnić poprzez dodanie donora elektronu, np. NADH (Rys.27) lub kwasu askorbinowego (wyników nie pokazano). Przypuszcza się, iż w takim układzie donor elektronu powoduje szybką regenerację kationorodnika z poprzedniej reakcji do jego stanu podstawowego, zgodnie z poniżej przedstawionym schematem:



Takie założenie sugeruje, iż pod nieobecność donora elektronu kationorodnik może ulec dalszej deprotonacji i utlenieniu, jak zaproponowano poniżej. Ponadto przypuszcza się, iż powstała niestabilna forma rodnikowa $\text{WST11}^\bullet$ może reagować ze stosunkowo stabilnym rodnikiem wodorotlenkowym prowadząc do powstania obserwowanej Pd-Chloryny (równania 23-25).



Z drugiej strony, proces fotodegradacji WST11 w wodzie może być bardziej złożony z powodu wysokiej agregacji próbki. Wskazują na to wyniki z nanosekundowej fotolizy błyskowej, gdzie pokazano trwałe blaknięcie próbki w stanie odpowiadającym zagregowanej formie WST11 (dokładniej – agregatom typu „H”). Fotodegradację w obrębie agregatu typu „H”, której produktem jest chloryna, sugerowano w pracach poświęconych fotodegradacji porfiryn [145]–[147]. W rozważanych reakcjach należy wziąć też pod uwagę reakcję uprotonowania anionorodnika, co prowadzi do produkcji rodnika wodoronadtlenkowego, oraz dysmutacji anionorodnika, która prowadzi do powstania nadtlenu wodoru (sekcja 1.2.3.1, równania 4-7).

W niniejszej pracy postuluje się, iż dalszy mechanizm działania WST11 jest podobny do tego proponowanego dla WST09 [62]. Schemat ten uwzględnia reakcje wzbudzonego stanu trypletowego WST11 z nadtlakiem wodoru oraz rodnikowej formy fotosensybilizatora z nadtlakiem wodoru co prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego:

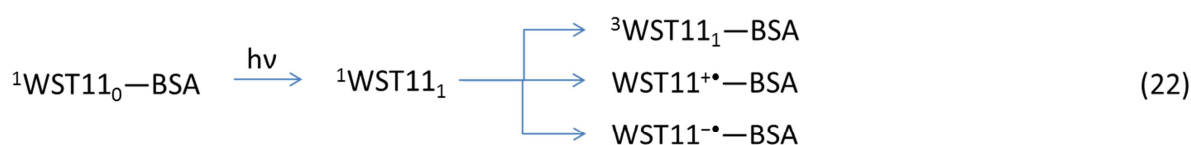


Przedstawiony schemat działania nie uwzględnia oddziaływań między agregatami fotosensybilizatora. Jak już wspomniano w dyskusji, agregaty liniowe typu „J” mogą być zdolne do utworzenia wzbudzonych stanów a te do generacji wolnych rodników.

Typ I fotosensybilizowanego utleniania w obecności BSA

Proces zależy od sąsiedztwa reszt aminokwasowych białka w stosunku do fotosensybilizatora, które mogą pełnić funkcję donora lub akceptora elektronu [84]. Ponadto wykazano, iż kompleks WST11-BSA zdolny jest do generowania wolnych rodników takich jak anionorodnik nadtlakiowy i rodnik hydroksylowy. Przypuszcza się iż powstałe reaktywne formy tlenu będą

wydajnie oddziaływać z białkiem (wskazują na to wyniki otrzymane w oxymetrii EPR – po dodaniu wysokich stężeń azydku sodu wciąż obserwuje się fotokonsumpcję tlenu, Rys.53). Ze względu na antyoksydacyjne właściwości albuminy, nie spodziewa się znaczącego generowania wolnych rodników poza kompleks. W wyniku fotowzbudzenia WST11 w kompleksie z BSA spodziewa się następującej reakcji:



5.1.6. Uwagi końcowe

Przeprowadzone badania właściwości fizykochemicznych WST11 przy zastosowaniu komplementarnych metod spektroskopowych, umożliwiły przeprowadzenie drobiazgowej analizy podstawowych procesów zachodzących po absorpcji fotonu. Ciągłe brakuje jednoznacznej identyfikacji reaktywnych form tlenu generowanych w środowisku wodnym. Niestety z powodu ograniczonego dostępu do zaawansowanych metod badawczych, nie udało się odpowiedzieć na wszystkie wątpliwości dotyczące I Typu fotosensybilizowanego utleniania. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano konkretne eksperymenty, które mogłyby przyczynić się do usunięcia istniejących wątpliwości na temat mechanizmu działania WST11.

W pierwszej kolejności warto przeanalizować tworzenie poszczególnych form zagregowanego fotosensybilizatora. Odpowiednia zmiana polarności, pH i siły jonowej a sprawdzenie zdolności agregacji fotosensybilizatora w innym środowisku, np. glikolu polietylenowego lub jego mieszaninie z wodą, umożliwiłaby kontrolę powstawania konkretnej frakcji agregatów [172]. W tym celu należałoby przeprowadzić pomiary spektrofotometryczne i analizę czynnikową [173], dichroizmu kołowego, rozdzielczej czasowo fluorescencji i pomiary przy użyciu technik chromatograficznych. W dalszym etapie, należałoby zbadać właściwości fotofizyczne i fotochemiczne poszczególnych agregatów, do czego mogły by zostać wykorzystane metody

badawcze użyte w tej pracy. Uzupełniającymi metodami badawczymi mogłyby być: redukcja tetranitrometanu i utlenianie adrenaliny do detekcji anionorodnika ponadtlenkowego, hydroksylacja salicynianu i fenyloanaliny do detekcji rodnika hydroksylowego, a także utlenianie skopoletyny do wykrywania obecności wodoronadtlenku wodoru.

Mimo wieloletnich badań nad mechanizmem działania fotosensybilizującego tej grupy związków, nie udało się jak dotychczas znaleźć odpowiedzi na jedno z najbardziej fundamentalnych pytań: „Jaki jest mechanizm działania kompleksu WST11-BSA, który odpowiedzialny jest za wydajność fotosensybilizatora w VTP”? Brak tej wiedzy motywuje do dalszych badań z użyciem nowych pomysłów i bardziej wyrafinowanych metod. W pierwszej kolejności należałoby zbadać miejsca wiążące WST11 w albuminie. W tym celu można sięgnąć do technik fluorescencyjnych, dializy równowagowej, spektroskopii dichroizmu kołowego, czy też technik Fourierowskich w podczerwieni. Metody te powinny umożliwić charakterystykę miejsc wiążących fotosensybilizator oraz wskazać ewentualne zmiany konformacyjne białka [174], [175]. Blokowanie specyficznych miejsc wiążących (znanymi już specyficznymi ligandami) powinno pozwolić na ustalenie lokalizacji WST11 w kompleksie a co więcej także zmian właściwości fotofizycznych i fotochemicznych całego kompleksu, w zależności od miejsca przyłączenia do białka. Na pewno ciekawe i istotne byłoby przeprowadzenie modelowania molekularnego, co mogłoby sprecyzować, które aminokwasy bezpośrednio oddziałują z cząsteczką WST11 i które mogą ewentualnie służyć jako donory elektronu, jakie jest prawdopodobieństwo transferu elektronu, jaka jest dostępność wody i dyfuzja tlenu w kieszeni wiążącej [174].

W ostatnich latach pojawiło się wiele ciekawych doniesień literaturowych dotyczących modyfikacji struktury i różnego sposobu aplikacji fotosensybilizatorów w celu zwiększenia efektu fotodynamicznego w miejscu docelowym PDT. Jedną z obiecujących dziedzin jest nanotechnologia, oferująca różnego rodzaju nośniki o wielkości od 1 do kilkuset nm, takie jak nanocząstki, nanorurki, liposomy. Szczególną uwagę poświęcono nonocząstkom silikonowym ze względu na stosunkowo prostą budowę, nietoksyczność i biokompatybilność z tkankami organizmu [176]. Poprzez odpowiednią modyfikację powierzchni powinno być możliwe jest uzyskanie miejsc wiążących o dowolnej specyfikacji, takiej jak: ładunek, hydrofobowości,

dostępu do otoczenia. Szczególnie dla fotosensybilizatora takiego jak WST11, którego właściwości silnie zależą od mikrośrodowiska, w którym się znajduje, mogłoby to stanowić ciekawy układ modelowy do badania warunków sprzyjających fotosensybilizowanemu utlenianiu I i II Typu. Dalsze badania mogłyby obejmować zastosowanie praktyczne (kliniczne) w terapii PDT. Motywują wyniki uzyskane podczas badań fotosensybilizatorów z rodziny porfiryn. Na przykładzie polihematoporfiryny (Photosan-II) pokazano, iż aplikacja fotosensybilizatora przyłączonego do krzemowych nanocząstek zwiększa z 55% do 95% skuteczność w zabijaniu komórek raka przewodów żółciowych [177]. W innej pracy pokazano pozytywny wpływ przyłączenia cząsteczek TMPyP (tetrakis(N-metylopirydyno)porfiryne) do cząstek silikonowych w niszczeniu komórek raka piersi [178]. Interesującym doniesieniem jest stworzenie nanocząsteczek krzemowych (ang. mesoporous silica nanoparticles), do których przyczepiono cząsteczki fotosensybilizatora poprzez niszczonego tlenem singletowy łącznik [179]. WST11 posiada dość dużą wydajność generowania tlenu singletowego (oczywiście w zależności od środowiska) co umożliwiłoby by uwolnienie fotosensybilizatora w konkretnym docelowym miejscu zwiększając selektywność i skuteczność terapii.

5.2. STL3009 i STL4005

W drugiej części pracy zbadano podstawowe własności fotofizyczne i fotochemiczne fotosensybilizatorów STL3009 i STL4005. Umożliwiło to porównanie tych podstawowych dla każdego fotosensybilizatora parametrów z podobnymi właściwościami WST11 otrzymanymi zarówno w niniejszej pracy jak i dotychczas opisanymi w literaturze.

5.2.1. Własności fotofizyczne STL3009 i STL4005

W formie monomerycznej STL3009 i STL4005 wykazują podobne własności fotofizyczne, jak monomery WST11. Widma absorpcji obu badanych Pd-BChl są typowe dla tej grupy związków (Rys.61(A)) [46] i wykazują maksimum absorpcji przy $\sim 747\text{nm}$, a molowy współczynnik absorpcji wynosi około $\epsilon = 1,2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. W badaniach pikosekundowej laserowej fotolizy błyskowej STL3009 i STL4009 otrzymano widma różnicowe absorpcji o zbliżonej charakterystyce w porównaniu do WST11 (własne wyniki - Rys.64, [37]) i nieco odmiennie kinetyce zaniku. Wydaje się, że za obserwowaną kinetykę odzysku sygnału przy 760nm , odpowiada głównie wymuszona emisja; podobnie jak w przypadku WST11 (sekcja 5.1.1, [64]). Zaobserwowane niewielkie zmiany w czasach życia wyznaczonych w MeOH i w TX-100/PBS w zależności od fotosensybilizatora, można tłumaczyć różnym oddziaływaniem fotosensybilizatorów z otoczeniem uwarunkowanym ładunkiem cząsteczek Pd-BChl.

Pomiary absorpcji uzyskane w środowisku wody destylowanej i PBS dowodzą, iż obie badane pochodne Pd-BChl agregują w tym środowisku silniej niż WST11 (Rys.61(B)). Warto zwrócić uwagę, iż dla STL3009 w PBS, tworzy się nowe pasmo absorpcji przy 810nm , które można utożsamiać z wyższym stanem agregacji fotosensybilizatora (Rys.61(C)) [46]. Wysoki stopień agregacji tego związku, jest prawdopodobnie związany z długim podstawnikiem N-(aminopropyl)-aminopropyl-aminokarbonylowym (Rys.8). Wyniki badań ultraszybkiej fotolizy błyskowej wykazały, iż zanik stanów przejściowych odbywa się w sposób dwufazowy z charakterystycznym czasem 5 i 115ps (Rys.65). Szybka składową można utożsamiać z rozpraszaniem energii wzbudzenia w obrębie agregatów, natomiast dłuższą, prawdopodobnie z emisją wymuszoną (patrz dyskusja o WST11, sekcja 1.1.5). Udział

krótkożyjącej składowej jest znacznie większy dla STL3009 niż dla STL4005 lub WST11, co można powiązać ze efektywnym stopniem agregacji fotosensybilizatorów. Charakterystyka widm produktów przejściowych tych związków (otrzymanych poprzez zastosowanie funkcji „Global Fit”), różni się od charakterystyki widm zaobserwowanych dla WST11. Przypuszcza się, iż różnice te wynikają z dodatkowego udziału ekscypleksów lub ekscymerów obecnych w agregatach fotosensybilizatorów [132]). Niestety, słaba intensywność sygnału i wysoki poziom szumów, związanych z niestabilnością wiązki próbkującej i monitorującej, uniemożliwiły przeprowadzenie dokładnej analizy i separacji poszczególnych stanów przejściowych.

W badaniach przeprowadzonych w PBS zaobserwowano stosunkowo słabe powinowactwo obu fotosensybilizatorów do BSA (Rys.63). I tak, dodanie do roztworu fotosensybilizatorów 0,5mM białka nie wywołuje porównywalnego efektu monomeryzacji jak obserwowano dla WST11 (Rys.21). Sugeruje to, że oddziaływanie związków z białkiem, może mieć inny charakter niż w przypadku ujemnie naładowanego WST11. W literaturze rozważano różną naturę oddziaływań dodatnio-naładowanych porfiryn z BSA [180]. Ponadto, siły oddziaływania fotosensybilizator-białko mogą nie być wystarczająco duże, aby konkurować z oddziaływaniem odpowiedzialnym za tworzenie się agregatów tych fotosensybilizatorów. Za taką interpretacją omawianych wyników może przemawiać powolny proces monomeryzacji związku STL3009 w PBS po dodaniu albuminy (Rys.63(C)). Inaczej zachowuje się fotosensybilizator w wodzie destylowanej, ponieważ przy małych stężeniach BSA zaobserwowano efekt przeciwny, świadczący o wzmożonej agregacji związku (Rys.62). Zakładając, że wprowadzone białko posiada ładunek dodatni [181], efekt ten można tłumaczyć zaburzeniem równowagi elektrostatycznej roztworu, co sprzyja agregacji fotosensybilizatorów. Dalszy wzrost stężenia białka powoduje, iż hydrofobowe oddziaływanie z białkiem może osiągać przewagę nad oddziaływaniami elektrostatycznymi [182]. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń ultraszybkiej fotolizy błyskowej z próbkami zawierającymi BSA wykazały, podobnie jak w przypadku WST11, zmniejszenie udziału krótkożyjącej komponenty wypadkowego sygnału absorpcji przejściowej (Rys.66). Rejestrowane po 1ns widmo różnicowe absorpcji, jest zbliżone do widma różnicowego monomeru. Sugeruje to brak długożyjących ekscypleksów w powstałych agregatach lub ekscymerów w dimerach.

5.2.2. Stabilność wzbudzonego stanu trypletowego i jego oddziaływanie z tlenem

Badania fotosensybilizatorów STL3009 i STL4005 metodą nano - mikrosekundowej laserowej fotolizy błyskowej dostarczyły podobnych wyników jak te otrzymane dla WST11 (Rys.67, Tab.5). W obecności albuminy nie zaobserwowano dodatkowego stanu przejściowego, który pojawia się w tych samych warunkach pomiarowych dla WST11. Wynik ten może świadczyć o braku transferu ładunku między fotosensybilizatorem a białkiem - co prawdopodobnie ma miejsce w przypadku WST11. Chociaż brakuje danych doświadczalnych umożliwiających jednoznaczną interpretację zaobserwowanego efektu, nie można wykluczyć iż wypadkowy ładunek elektryczny tych związków determinuje nieco inną naturę oddziaływania fotosensybilizatora z białkiem.

Stałe oddziaływania wzbudzonego stanu trypletowego z tlenem są zbliżone dla wszystkich trzech Pd-BChl, opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej (Tab.5).

5.2.3. Zdolność do generowania reaktywnych form tlenu

Wyniki rozdzielczo-czasowej fosforescencji tlenu singletowego przy 1270nm, wykazały, iż wydajność fotogenerowania tlenu singletowego przez wszystkie trzy fotosensybilizatory: WST11, STL3009 i STL4005, silnie zależy od mikrośrodowiska, w którym fotosensybilizator się znajduje (Tab.6). Podczas gdy wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego przez STL3009 w MeOH i acetonie jest porównywalna z wydajnością kwantową wyznaczoną dla WST11, w wodzie i po solubilizacji z zastosowaniem detergentu TX-100 efektywność fotogenerowania tlenu singletowego jest nieco niższa. Fotosensybilizator STL4005 wykazuje niższą wydajność generowania tlenu singletowego w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast zbliżoną do WST11 w środowisku wodnym. Niższe wartości wydajności kwantowej generowania $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ w PBS w porównaniu do WD, pozwalają przypuszczać, iż podobnie jak w przypadku WST11, efektywne generowanie tlenu singletowego zachodzi tylko przez fotosensybilizator w formie monomeru. Uzyskane wyniki sugerują, iż podstawniki Pd-BChl mają znaczący wpływ na fotogenerowanie tlenu singletowego przez te fotosensybilizatory.

Fotosensybilizowaną produkcję tlenu singletowego wykazano też pośrednio, poprzez obserwacje zmian w tempie konsumpcji tlenu po wprowadzeniu histydyny i azydku sodu (Rys. 70-72).

BSA gasi tlen singletowy generowany przez STL3009 i STL4005 z efektywną stałą szybkości odpowiednio $3,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ oraz $6,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Rys. 69). W pomiarach spektrofluorymetrycznych zaobserwowano różnice w stałych asocjacji badanych związków z białkiem (Rys. 74). Wyniki te sugerują inne miejsce kompleksowania konkretnego fotosensybilizatora z białkiem i oraz udział różnych grup funkcjonalnych białka w gaszeniu tlenu singletowego. Wnioski te pozostają w zgodzie z wynikami jakie otrzymano w pomiarach fotokonsumpcji.

W pomiarach pułapkowania spinowego EPR pokazano, iż oba fotosensybilizatory są zdolne do generowania przynajmniej niewielkich strumieni anionorodnika ponadtlenkowego, zwłaszcza w obecności etanolu lub donora elektronu (NADH) (Rys. 73). Nieco wydajniejsze fotogenerowanie anionorodnika ponadtlenkowego przez WST11 w porównaniu z STL4005, może też mieć związek z jego nieco wyższym stopniem monomeryzacji. Uzyskane wyniki wskazują ponadto na prawdopodobną produkcję rodnika hydroksylowego w badanym układzie. Przemawia za tym wysoka intensywność sygnału adduktu DMPO- $\cdot\text{N}_3$, którą zaobserwowano w środowisku micelarnym obu fotosensybilizatorów oraz w wodzie w przypadku STL4005, po dodaniu NaN_3 .

5.2.4. Podsumowanie wyników otrzymanych dla STL3009 i STL4005

WST11 oraz dwie nowe pochodne Pd-Bchl - STL3009 i STL4005, wykazują podobne właściwości fotofizyczne. Wykazano, iż modyfikacja podstawników przy C13 C17 (Rys. 3, 8) zmienia efektywność fotogenerowania reaktywnych form tlenu.

Wydaje się, iż słabe powinowactwo fotosensybilizatorów do BSA ogranicza aplikację tych związków w terapii fotodynamicznej z tych samych powodów co WST11. Silniejsza tendencja tych związków do agregacji w środowisku wodnym, może utrudniać ich dożylną aplikację.

Sytuację w tym względzie mogło by poprawić zastosowanie odpowiednich czynników solubilizujących takich jak użyciu Cremophor EL [183]–[185].

Innym potencjalnym miejscem zastosowania tych fotosensybilizatorów, a w szczególności STL4005, mogła by być antybakteryjna terapia fotodynamicznej (APDT, z ang. antimicrobial PDT). Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, w takim zastosowaniu terapii fotodynamicznej, dodatnio naładowane fotosensybilizatory wykazują szczególną skuteczność w fotoinaktywacji zarówno bakterii [186]–[191], a także grzybów [192].

6. Wnioski końcowe

Wyniki kompleksowych badań przedstawionych w niniejszej rozprawie umożliwiają sformułowanie następujących wniosków:

- Agregacja badanych Pd-pochodnych bakteriochlorofilu zmniejsza ich fotosensybilizującą efektywność w szczególności wydajność generowania reaktywnych form tlenu.
- W wodzie, fotosensybilizowane utlenianie przy udziale WST11 zachodzi poprzez mechanizm Typu I oraz Typu II. Efektywne fotogenerowanie tlenu singletowego jest możliwe tylko przez formę monomeryczną fotosensybilizatora, przy czym wydajność kwantowa tego procesu silnie zależy od lokalnego stężenia tlenu. W roztworach rozpuszczalników organicznych fotosensybilizator wykazuje wysoką wydajność generowania tlenu singletowego.
- Utworzenie niekowalencyjnego kompleksu WST11 z BSA stabilizuje cząsteczkę fotosensybilizatora ograniczając jego oddziaływanie z tlenem cząsteczkowym. W obrębie kompleksu zachodzi transfer elektronu i protonu między białkiem a WST11. Kompleks jest zdolny do fotogeneracji zarówno wolnych rodników jak i tlenu singletowego, co znajduje potwierdzenie w obserwowanej dynamicznej konsumpcji tlenu w naświetlanym badanym układzie.
- Własności fotofizyczne i fotochemiczne pochodnych STL3009 i STL4005 są podobne do własności WST11. W zależności od mikrośrodowiska, fotosensybilizatory te są zdolne do efektywnego generowania tlenu singletowego i wolnych rodników.
- Fotosensybilizatory STL3009 i STL4005 wykazują słabe powinowactwo do BSA, co sugeruje inną naturę oddziaływania tych cząsteczek z białkiem w porównaniu do WST11.
- Dodatni ładunek STL4005 oraz stosunkowo wysoka wydajność generowania tlenu singletowego może sprzyjać potencjalnemu wykorzystaniu tego fotosensybilizatora w antybakteryjnej terapii fotodynamicznej.

7. Summary (in English)

Detailed understanding of reactions' mechanisms which accompany the vascular targeted photodynamic therapy with hydrophilic Pd-derivative of bacteriochlorophyll, known as WST11, is a very challenging and important problem. Results of recent clinical trials indicate high efficiency of WST11 in prostate cancer treatment. Moreover, it was shown that WST11 can be successfully used in the treatment of solid tumors and age-related macular degeneration (AMD). The proposed in literature mechanism of WST11 photoactivity assumes that the photosensitizer acts exclusively as a Type II photosensitizer. However, the proposed photophysics and photochemistry of WST11 rises additional questions, and in this study experiments are proposed and carried out to address some of them.

The main goal of this research was to investigate the mechanism of photosensitized oxidation of WST11 in water in presence and absence of BSA, and to verify the validity of the model proposed in the literature. In addition, photophysical and chemical properties of two new photosensitizers with potential application in PDT, acronimed STL3009 and STL4005, are reported.

Several complementary experimental techniques were used. The photochemical reactivity of the Pd-Bacteriochlorophyll derivatives were determined by electron paramagnetic resonance (EPR) oximetry. The aggregation of the photosensitizer and binding to the BSA were monitored by spectroscopic methods. Picosecond and nanosecond laser flash photolysis (LFP) was employed to analyze the photodynamics of singlet and triplet excited states of photosensitizer molecules. Direct time-resolved near-infrared phosphorescence was used to determine the yield of singlet oxygen photogeneration by WST11. Finally, the generation of superoxide radical and hydroxyl radical was studied by EPR-spin-trapping.

In the thesis we demonstrate, that the mechanism of WST11 photosensitized oxidation is more complex than previously suggested. We show that WST11 in aqueous solutions photo-generates not only superoxide and hydroxyl radicals but also singlet oxygen. We suggest that only the monomeric form of WST11 is able to generate singlet oxygen. Furthermore, we established that the quantum yield of singlet oxygen generation depends strongly on the local

concentration of the ground state molecular oxygen. We evidenced that the photosensitizer forms a noncovalent complex in presence of BSA which stabilizes WST11 triplet excited state and also likely impedes their interaction with oxygen. The photosensitizer in this complex is able to produce free radicals as well as singlet oxygen. It is shown, that the BSA acts as a target for the singlet oxygen which leads to enhancement of oxygen photoconsumption.

In the second part of this thesis, general photophysical and photochemical properties of STL3009 and STL4005 are investigated. While they both show high (and similar to WST11) efficiency in singlet oxygen generation in organic solvents, the production of reactive oxygen species (ROS) is relatively low in water, where the photosensitizers exhibits high yield of aggregation. Both Pd-Bchl derivatives studied are able to produce singlet oxygen and free radicals in aqueous solutions. However, STL4005 shows higher efficiency in ROS production in water than STL3009, but the latter seems to be more effective in generation of singlet oxygen in organic solvents.

The photochemical efficiency of the photosensitizers in aqueous microenvironment is limited due to aggregation. The obtained results suggest that application of the photosensitizers in form of a protein-nanoparticle-liposome – complex should amplify its photodynamic action.

8. Literatura

- [1] M. D. Daniell and J. S. Hill, "A history of photodynamic therapy.," *Aust. N. Z. J. Surg.*, vol. 61, no. 5, pp. 340–8, May 1991.
- [2] J. Moan, "Properties for optimal PDT sensitizers.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 5, no. 3–4, pp. 521–4, May 1990.
- [3] N. Finsen, *La photothérapie (I. "Les rayons chimiques et la variole". II. "La lumière comme agent d'excitabilité", III. "Traitement du Lupus vulgaire par les rayons chimiques concentrés."* Finsen's medicinske Lysinstitut de Copenhagen, 1899.
- [4] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, "The history of photodetection and photodynamic therapy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 5, pp. 656–69, Nov. 2001.
- [5] I. J. MacDonald and T. J. Dougherty, "Basic principles of photodynamic therapy," *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 05, no. 02, pp. 105–129, Feb. 2001.
- [6] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 2, pp. 91–106, Jun. 2005.
- [7] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–23, Mar. 2005.
- [8] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 279–293, Dec. 2004.
- [9] L. Brancalion and H. Moseley, "Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy," *Lasers Med. Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 173–186, Feb. 2014.
- [10] A. Jabłoński, "Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes," *Nature*, vol. 131, no. 3319, pp. 839–840, Jun. 1933.
- [11] A. Kozinska, T. Oles, and T. Sarna, "Photoactivation and Detection of Photoexcited Molecules and Photochemical Products," *Isr. J. Chem.*, vol. 52, no. 8–9, pp. 745–756, Sep. 2012.
- [12] B. Halliwell and J. M. Gutteridge, "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy.," *Lancet*, vol. 1, no. 8391, pp. 1396–7, Jun. 1984.
- [13] N. Brot and H. Weissbach, "Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 223, no. 1, pp. 271–81, May 1983.
- [14] H. Fenton, "The oxidation of tartaric acid in presence of iron," *Chem Soc Proc*, vol. 10, pp. 157–158, 1894.

- [15] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*. PWN, Warszawa, 2013.
- [16] R. Bonnett and K. Okolo, "Approaches to the Stepwise Synthesis of Benzoporphyrins and Phthalocyanines Part 2: Synthesis of a 5-Azadibenzo[b,g]porphyrin from Benzopyrromethene Intermediates," *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 03, no. 06, pp. 530–536, Aug. 1999.
- [17] B. W. Henderson and T. J. Dougherty, "How Does Photodynamic Therapy Work?," *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 145–157, Jan. 1992.
- [18] G. Jori, "Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 87–93, Nov. 1996.
- [19] T. J. Dougherty, "Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors," *Photochem. Photobiol.*, vol. 45, no. 6, pp. 879–89, Jun. 1987.
- [20] R. Bonnett, "Photodynamic therapy in historical perspective," *Rev. Contemp. Pharmacother.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–17, 1999.
- [21] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. Childs, and C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 27–42, May 2004.
- [22] A. Ormond and H. Freeman, "Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy," *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 817–840, Mar. 2013.
- [23] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic therapy of cancer: an update," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, pp. 250–81, Jan. 2011.
- [24] Z. Huang, "A review of progress in clinical photodynamic therapy.," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 4, no. 3, pp. 283–93, Jun. 2005.
- [25] N. Fotinos, M. A. Campo, F. Popowycz, R. Gurny, and N. Lange, "5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives," *Photochem. Photobiol.*, vol. 82, no. 4, p. 994, Jan. 2006.
- [26] M. T. Cahill, B. T. Smith, and S. Fekrat, "Adverse reaction characterized by chest pain, shortness of breath, and syncope associated with verteporfin (visudyne).," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 134, no. 2, pp. 281–2, Aug. 2002.
- [27] M. S. Blumenkranz, K. W. Woodburn, F. Qing, S. Verdooner, D. Kessel, and R. Miller, "Lutetium texaphyrin (Lu-Tex): a potential new agent for ocular fundus angiography and photodynamic therapy.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 129, no. 3, pp. 353–62, Mar. 2000.
- [28] R. R. Allison and C. H. Sibata, "Photofrin photodynamic therapy: 2.0 mg/kg or not 2.0 mg/kg that is the question.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 112–9, Jun. 2008.

- [29] U. Schmidt-Erfurth and T. Hasan, "Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration.," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 45, no. 3, pp. 195–214, Jan. 2000.
- [30] K. Ichikawa, Y. Takeuchi, S. Yonezawa, T. Hikita, K. Kurohane, Y. Namba, and N. Oku, "Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth.," *Cancer Lett.*, vol. 205, no. 1, pp. 39–48, Mar. 2004.
- [31] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.*, CRC Press, 2000.
- [32] J. A. Curcio and C. C. Petty, "The near infrared spectrum of liquid water," *J. Opt. Soc. Am.*, pp. 302–304, 1951.
- [33] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers.," *Met. Based. Drugs*, vol. 2008, p. 276109, Jan. 2008.
- [34] R. Bonnett, "Progress with heterocyclic photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of tumours," *J. Heterocycl. Chem.*, vol. 39, no. 3, pp. 455–470, May 2002.
- [35] R. K. Pandey, "Recent advances in photodynamic therapy," *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 04, no. 04, pp. 368–373, Jun. 2000.
- [36] J. M. Gebicki and G. Bartosz, "The role of proteins in propagation of damage induced by reactive oxygen species in vivo.," *Postepy Biochem.*, vol. 56, no. 2, pp. 115–23, Jan. 2010.
- [37] I. Ashur, R. Goldschmidt, I. Pinkas, Y. Salomon, G. Szewczyk, T. Sarna, and A. Scherz, "Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative WST11, noncovalently bound to serum albumin.," *J. Phys. Chem. A*, vol. 113, no. 28, pp. 8027–37, Jul. 2009.
- [38] H. Grimm, B. Porra, R.J., Rüdiger, W., Scheer, "Chlorophylls and Bacteriochlorophylls " in Springer Series " Advances in Photosynthesis and Respiration" , Springer, 2006.
- [39] P. Scherer and S. F. Fischer, *Theoretical Molecular Biophysics.* , Springer ,Berlin, 2010.
- [40] C. Weiss, "The molecular orbital theory of chlorophyll.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 244, pp. 204–13, Apr. 1975.
- [41] L. Fiedor, V. Rosenbach-Belkin, and A. Scherz, "The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase. Possible implication for chlorophyll biosynthesis and degradation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 31, pp. 22043–7, Nov. 1992.
- [42] Y. S. Avigdor Scherz, "Chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives, their preparation and pharmaceutical compositions comprising them," 1994.
- [43] D. Rutkowska-Zbik and M. Witko, "Metallobacteriochlorophylls as potential dual agents for photodynamic therapy and chemotherapy.," *J. Mol. Model.*, vol. 19, no. 10, pp. 4155–61, Oct. 2013.

- [44] D. Noy, L. Fiedor, G. Hartwich, H. Scheer, and A. Scherz, "Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 2. Changes in Redox Potentials and Electronic Transition Energies Are Dominated by Intramolecular Electrostatic Interactions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 15, pp. 3684–3693, Apr. 1998.
- [45] K. Teuchner, H. Stiel, D. Leupold, A. Scherz, D. Noy, I. Simonin, G. Hartwich, and H. Scheer, "Fluorescence and excited state absorption in modified pigments of bacterial photosynthesis a comparative study of metal-substituted bacteriochlorophylls a," *J. Lumin.*, vol. 72–74, pp. 612–614, Jun. 1997.
- [46] A. Brandis, O. Mazor, E. Neumark, V. Rosenbach-Belkin, Y. Salomon, and A. Scherz, "Novel Water-soluble Bacteriochlorophyll Derivatives for Vascular-targeted Photodynamic Therapy: Synthesis, Solubility, Phototoxicity and the Effect of Serum Proteins," *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, no. 4, pp. 983–992, Apr. 2007.
- [47] B. W. Henderson, A. B. Sumlin, B. L. Owczarczak, and T. J. Dougherty, "Bacteriochlorophyll-a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 10, no. 4, pp. 303–13, Sep. 1991.
- [48] J. Zilberstein, A. Bromberg, A. Frantz, V. Rosenbach-Belkin, A. Kritzmman, R. Pfefermann, Y. Salomon, and A. Scherz, "Light-dependent Oxygen Consumption in Bacteriochlorophyll-Serine-treated Melanoma Tumors: On-line Determination Using a Tissue-inserted Oxygen Microsensor," *Photochem. Photobiol.*, vol. 65, no. 6, pp. 1012–1019, Jun. 1997.
- [49] S. E. Eggener and J. A. Coleman, "Focal Treatment of Prostate Cancer with Vascular-Targeted Photodynamic Therapy," *Sci. World J.*, vol. 8, pp. 963–973, Jan. 2008.
- [50] B. Chen, B. W. Pogue, P. J. Hoopes, and T. Hasan, "Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy.," *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, vol. 16, no. 4, pp. 279–305, Jan. 2006.
- [51] A.-R. Azzouzi, S. Lebdaï, F. Benzaghoul, and C. Stief, "Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD(®) Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure.," *World J. Urol.*, Mar. 2015.
- [52] A.-R. Azzouzi, E. Barret, C. M. Moore, A. Villers, C. Allen, A. Scherz, G. Muir, M. de Wildt, N. J. Barber, S. Lebdaï, and M. Emberton, "TOOKAD(®) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer.," *BJU Int.*, vol. 112, no. 6, pp. 766–74, Oct. 2013.
- [53] N. Solban, P. K. Selbo, S. K. Pål, A. K. Sinha, S. K. Alok, S. K. Chang, C. K. Sung, and T. Hasan, "Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 11, pp. 5633–40, Jun. 2006.
- [54] N. Solban, I. Rizvi, and T. Hasan, "Targeted photodynamic therapy.," *Lasers Surg. Med.*, vol. 38, no. 5, pp. 522–31, Jun. 2006.
- [55] O. Mazor, "Synthesis and phototoxicity of novel sulfonated bacteriochlorophyll derivatives." 2004.

- [56] O. Mazor, A. Brandis, V. Plaks, E. Neumark, V. Rosenbach-Belkin, Y. Salomon, and A. Scherz, "WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, no. 2, pp. 342–51, Jan. 2005.
- [57] H. Lepor, A. McCullough, and J. D. Engel, "Renewing intimacy: advances in treating erectile dysfunction postprostatectomy.," *Rev. Urol.*, vol. 10, no. 4, pp. 245–53, Jan. 2008.
- [58] J. Trachtenberg, R. A. Weersink, S. R. H. Davidson, M. A. Haider, A. Bogaards, M. R. Gertner, A. Evans, A. Scherz, J. Savard, J. L. Chin, B. C. Wilson, and M. Elhilali, "Vascular-targeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses.," *BJU Int.*, vol. 102, no. 5, pp. 556–62, Aug. 2008.
- [59] J. Trachtenberg, A. Bogaards, R. A. Weersink, M. A. Haider, A. Evans, S. A. McCluskey, A. Scherz, M. R. Gertner, C. Yue, S. Appu, A. Aprikian, J. Savard, B. C. Wilson, and M. Elhilali, "Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response.," *J. Urol.*, vol. 178, no. 5, pp. 1974–9; discussion 1979, Nov. 2007.
- [60] N. Betrouni, R. Lopes, P. Puech, P. Colin, and S. Mordon, "A model to estimate the outcome of prostate cancer photodynamic therapy with TOOKAD Soluble WST11," *Phys. Med. Biol.*, vol. 56, no. 15, pp. 4771–4783, Aug. 2011.
- [61] S. Chevalier, F. L. Cury, E. Scarlata, E. El-Zayat, L. Hamel, J. Rocha, F. Z. Zouanat, S. Moussa, A. Scherz, M. Elhilali, and M. Anidjar, "Endoscopic vascular targeted photodynamic therapy with the photosensitizer WST11 for benign prostatic hyperplasia in the preclinical dog model.," *J. Urol.*, vol. 190, no. 5, pp. 1946–53, Nov. 2013.
- [62] Y. Vakrat-haglili, L. Weiner, V. Brumfeld, A. Brandis, Y. Salomon, B. McIlroy, B. C. Wilson, A. Pawlak, M. Rozanowska, T. Sarna, and A. Scherz, "The Microenvironment Effect on the Generation of Reactive Oxygen Species by Pd - Bacteriopheophorbide," no. 2, pp. 6487–6497, 2005.
- [63] "Target-seeking Antibodies For Cancer Therapy," *ScienceDaily*. [Online]. Available: <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/07/080720221517.htm>.
- [64] C. Musewald, G. Hartwich, F. Po, H. Lossau, H. Scheer, and M. E. Michel-beyerle, "Time-Resolved Spectral Investigation of Bacteriochlorophyll a and Its Transmetalated Derivatives [Zn] - Bacteriochlorophyll a and [Pd] -Bacteriochlorophyll a," vol. 5647, no. 98, pp. 8336–8342, 1998.
- [65] S. Schreiber, S. Gross, A. Brandis, A. Harmelin, V. Rosenbach-Belkin, A. Scherz, and Y. Salomon, "Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery.," *Int. J. Cancer*, vol. 99, no. 2, pp. 279–85, May 2002.

- [66] J. G. M. Rosenbach-Bekin, V., Chen, L., Fiedor, L., Salomon, Y. & Scherz, A, "Chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives as photodynamic agents |," in *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers: Quantitative Data on 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, pp. 117–125, 1998.
- [67] D. Preise, O. Mazor, N. Koudinova, M. Liscovitch, A. Scherz, and Y. Salomon, "Bypass of tumor drug resistance by antivascular therapy.," *Neoplasia*, vol. 5, no. 6, pp. 475–80, Jan. 2003.
- [68] A. Tremblay, S. Leroy, L. Freitag, M.-C. Copin, P.-H. Brun, and C.-H. Marquette, "Endobronchial phototoxicity of WST 09 (Tookad), a new fast-acting photosensitizer for photodynamic therapy: preclinical study in the pig.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 78, no. 2, pp. 124–30, Aug. 2003.
- [69] F. Borle, A. Radu, C. Fontollet, H. van den Bergh, P. Monnier, and G. Wagnières, "Selectivity of the photosensitizer Tookad for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model.," *Br. J. Cancer*, vol. 89, no. 12, pp. 2320–6, Dec. 2003.
- [70] N. V Koudinova, J. H. Pinthus, A. Brandis, O. Brenner, P. Bendel, J. Ramon, Z. Eshhar, A. Scherz, and Y. Salomon, "Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts.," *Int. J. Cancer*, vol. 104, no. 6, pp. 782–9, May 2003.
- [71] Q. Chen, Z. Huang, D. Luck, J. Beckers, P.-H. Brun, B. C. Wilson, A. Scherz, Y. Salomon, and F. W. Hetzel, "Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 438–45, Oct. 2002.
- [72] P. H. Brun, J. L. DeGroot, E. F. G. Dickson, M. Farahani, and R. H. Pottier, "Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, no. 11–12, pp. 1006–10, Nov/Dec 2004 .
- [73] M. Berdugo, R. A. Bejjani, F. Valamanesh, M. Savoldelli, J.-C. Jeanny, D. Blanc, H. Ficheux, A. Scherz, Y. Salomon, D. BenEzra, and F. Behar-Cohen, "Evaluation of the new photosensitizer Stakel (WST-11) for photodynamic choroidal vessel occlusion in rabbit and rat eyes.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 1633–44, Apr. 2008.
- [74] D. K. Kelleher, O. Thews, A. Scherz, Y. Salomon, and P. Vaupel, "Perfusion, oxygenation status and growth of experimental tumors upon photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide.," *Int. J. Oncol.*, vol. 24, no. 6, pp. 1505–11, Jun. 2004.
- [75] "The STEBA Biotech company." [Online]. Available: <http://www.stebabitech.com/index.php/The-STEBA-Biotech-company>.
- [76] A. Scherz, Y. Salomon, H. Scheer, G. Hartwich, A. Brandis, "Synthetic metal-substituted bacteriochlorophyll derivatives and use thereof," US Pat. 6333319 B1, 2001.
- [77] S. Chevalier, M. Anidjar, E. Scarlata, L. Hamel, A. Scherz, H. Ficheux, N. Borenstein, L. Fiette, and M. Elhilali, "Preclinical study of the novel vascular occluding agent, WST11, for photodynamic therapy of the canine prostate.," *J. Urol.*, vol. 186, no. 1, pp. 302–9, Jul. 2011.

- [78] C. M. Moore, A.-R. Azzouzi, E. Barret, A. Villers, G. H. Muir, N. J. Barber, S. Bott, J. Trachtenberg, N. Arumainayagam, B. Gaillac, C. Allen, A. Schertz, and M. Emberton, "Determination of optimal drug dose and light dose index to achieve minimally invasive focal ablation of localised prostate cancer using WST11-vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy.," *BJU Int.*, May 2014.
- [79] C. M. Moore, D. Pendse, and M. Emberton, "Photodynamic therapy for prostate cancer--a review of current status and future promise.," *Nat. Clin. Pract. Urol.*, vol. 6, no. 1, pp. 18–30, Jan. 2009.
- [80] Steba Biotech S.A., "Study Using WST11 in Patients With Non-Resectable or Inoperable Cholangiocarcinoma - Tabular View - ClinicalTrials.gov," 2009.
- [81] Steba Biotech S.A., *Study Using WST11 in Patients With Obstructing Endobronchial Non-Small Cell Lung Cancer*. 2010.
- [82] Steba Biotech S.A., "Safety and Preliminary Efficacy Study of WST11 (Stakel®)-Mediated VTP Therapy in Subjects With CNV Associated With AMD," 2012. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01021956?term=WST11&rank=6..>
- [83] A. L. Marcovich, A. Brandis, O. Daphna, I. Feine, I. Pinkas, R. Goldschmidt, V. Kalchenko, T. Berkutzki, H. D. Wagner, Y. Salomon, and A. Scherz, "Stiffening of rabbit corneas by the bacteriochlorophyll derivative WST11 using near infrared light.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, no. 10, pp. 6378–88, Sep. 2012.
- [84] Y. Kobori and J. R. Norris, "1D radical motion in protein pocket: proton-coupled electron transfer in human serum albumin.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 1, pp. 4–5, Jan. 2006.
- [85] A. Jiménez-Banzo, X. Ragàs, P. Kapusta, and S. Nonell, "Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 7, no. 9, pp. 1003–10, Sep. 2008.
- [86] G. Bartosz, "Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 368, no. 1–2, pp. 53–76, Jun. 2006.
- [87] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. F. C. Lima, "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 65, no. 2–3, pp. 45–80, Dec. 2005.
- [88] F. A. Villamena and J. L. Zweier, "Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR spin trapping.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 6, no. 3, pp. 619–29, Jun. 2004.
- [89] W. Korytowski, G. J. Bachowski, and A. W. Girotti, "Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 alpha- and 6 beta-hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 1–8, Jul. 1992.
- [90] W. Korytowski, G. J. Bachowski, and A. W. Girotti, "Chromatographic separation and electrochemical determination of cholesterol hydroperoxides generated by photodynamic action.," *Anal. Biochem.*, vol. 197, no. 1, pp. 149–56, Aug. 1991.

- [91] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. F. C. Lima, "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 65, no. 2–3, pp. 45–80, Dec. 2005.
- [92] P. WARDMAN, "Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 7, pp. 995–1022, Oct. 2007.
- [93] T. Sarna, A. Duleba, W. Korytowski, and H. Swartz, "Interaction of melanin with oxygen.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 200, no. 1, pp. 140–8, Mar. 1980.
- [94] M. Grinholc, J. Nakonieczna, G. Fila, A. Taraszkiewicz, A. Kawiak, G. Szewczyk, T. Sarna, L. Lilge, and K. P. Bielawski, "Antimicrobial photodynamic therapy with fulleropyrrolidine: photoinactivation mechanism of *Staphylococcus aureus*, in vitro and in vivo studies.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 9, pp. 4031–43, May 2015.
- [95] D. Barr, "A step-by-step procedure for spin-trapping the hydroxyl radical," <http://wenku.baidu.com/view/68e626a5f524ccbff0218404>.
- [96] P. K. Glasoe and F. A. Long, "Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide," vol. Vol: 64, Jan. 1960.
- [97] A. Beer, "Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten," *Ann. der Phys. und Chemie*, vol. 162, no. 5, pp. 78–88, Jan. 1852.
- [98] W. K. S. James S. Hyde, *Spin Labeling*, vol. 8. Springer US, Boston, MA 1989.
- [99] Y. J. Lin, B. A. Teicher, and H. J. Halpern, "Synthesis of 4-proto-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetraprodeuteriomethyl-3-pyrrolin-1-yloxy (mHCTPO): A selectively isotopically labeled compound for use in T2 spin label oxymetry," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 28, no. 6, pp. 621–631, Jun. 1990.
- [100] M. Różanowska, "Badania fotoreaktywności in vitro komórek nabłonka upigmentowanego siatkówki," Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 1998.
- [101] Ralph T. Weber, "WIN-EPR User's Manual," *Bruker Instruments, Inc.*, 1995. [Online]. Available: http://acif.ucr.edu/nmr/files/sim_man.pdf.
- [102] B. Kalyanaraman, C. C. Felix, and R. C. Sealy, "Photoionization of melanin precursors: an electron spin resonance investigation using the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO)," *Photochem. Photobiol.*, vol. 36, no. 1, pp. 5–12, Jul. 1982.
- [103] G. R. Buettner, "Spin trapping: ESR parameters of spin adducts.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 259–303, Jan. 1987.
- [104] D. R. Duling, "Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra.," *J. Magn. Reson. B*, vol. 104, no. 2, pp. 105–10, Jun. 1994.

- [105] Ultrafast Systems, "Surface Explorer manual." [Online]. Available: <https://sites.google.com/a/ultrafastsystems.com/sx/home>.
- [106] H. Szydlowski, *Pracownia fizyczna Szydlowski*, PWN, 1980.
- [107] T. Dryński, *Ćwiczenia laboratoryjne z fizyki*. PWN, Warszawa, 1965.
- [108] I. B. C. Matheson, R. D. Etheridge, N. R. Kratowich, and J. Lee, "The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins," *Photochem. Photobiol.*, vol. 21, no. 3, pp. 165–171, Mar. 1975.
- [109] M. Y. Li, C. S. Cline, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell, and P. Bilski, "Quenching of singlet molecular oxygen (1O_2) by azide anion in solvent mixtures," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 6, pp. 760–4, Dec. 2001.
- [110] P. R. Ogilby and C. S. Foote, "Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, no. 11, pp. 3423–3430, Jun. 1983.
- [111] R. G. Alscher, "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants," *J. Exp. Bot.*, vol. 53, no. 372, pp. 1331–1341, May 2002.
- [112] P. Chelikani, I. Fita, and P. C. Loewen, "Diversity of structures and properties among catalases," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 2, pp. 192–208, Jan. 2004.
- [113] D. Godde and A. Trebst, "NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*," *Arch. Microbiol.*, vol. 127, no. 3, pp. 245–252, Oct. 1980.
- [114] M. Billany, "Alcohols and ethanolamines as hydroxyl radical scavengers," *Int. J. Pharm.*, vol. 137, no. 2, pp. 143–147, Jun. 1996.
- [115] M. Quaranta, M. Murkovic, and I. Klimant, "A new method to measure oxygen solubility in organic solvents through optical oxygen sensing," *Analyst*, vol. 138, no. 21, pp. 6243–5, Nov. 2013.
- [116] S. A. Gerhardt, J. W. Lewis, D. S. Kliger, J. Z. Zhang, and U. Simonis, "Effect of Micelles on Oxygen-Quenching Processes of Triplet-State Para-Substituted Tetraphenylporphyrin Photosensitizers," *J. Phys. Chem. A*, vol. 107, no. 15, pp. 2763–2767, Apr. 2003.
- [117] R. Battino, T. R. Rettich, and T. Tominaga, "The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 12, no. 2, p. 163, Apr. 1983.
- [118] L. Takiff and S. G. Boxer, "Phosphorescence spectra of bacteriochlorophylls," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 13, pp. 4425–4426, Jun. 1988.
- [119] K. I. Salokhiddinov, I. M. Byteva, and G. P. Gurinovich, "Lifetime of singlet oxygen in various solvents," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 34, no. 5, pp. 561–564, May 1981.

- [120] R. A. Wilkinson F. and Helman W. P., "Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution," *J. Phys. Chem.*, 1993.
- [121] E. Kohen, R. Santus, and J. G. Hirschberg, *Photobiology*. Academic Press, p. 506, 1995.
- [122] J. Mazerski, "Opis oddziaływań międzycząsteczkowych." [Online]: http://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234243/II_cz3.pdf, 2009
- [123] H. R. Kalbitzer and D. Stehlik, "On the analysis of competitive binding of various ligands to cooperative and independent binding sites of macromolecules.," *Z. Naturforsch. C.*, vol. 34, no. 9–10, pp. 757–69, Jan. 1979.
- [124] C. Reichardt and T. Welton, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, p. 718, 2011.
- [125] P. Bamfield and M. G. Hutchings, *Chromic Phenomena: Technological Applications of Colour Chemistry*. Royal Society of Chemistry, p. 562, 2010.
- [126] M. Homocianu, A. Airinei, and D. O. Dorohoi, "Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra," vol. 2(1), no. 1, p. 011105, Mar. 2011.
- [127] Y. He, X. Shen, H. Gao, and Y. He, "Spectral and photophysical studies on the inclusion complexation between Triton X-100 and β -cyclodextrin: A competitive method using a substituted 3H-indole probe," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 193, no. 2–3, pp. 178–186, Jan. 2008.
- [128] M. A. Kullmann, *Tracing Excited-State Photochemistry by Multidimensional Electronic Spectroscopy.*, praca doktorska, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 2013.
- [129] R. Bonnett and G. Martínez, "Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy," *Tetrahedron*, vol. 57, no. 47, pp. 9513–9547, Nov. 2001.
- [130] T. Nyokong and V. Ahsen, "*Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*". Springer Science & Business Media, p. 662, 2012.
- [131] J. Sobczyński, H. H. Tønnesen, and S. Kristensen, "Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements.," *Pharmazie*, vol. 68, no. 2, pp. 100–9, Feb. 2013.
- [132] P. J. Gonçalves, N. M. Barbosa Neto, G. G. Parra, L. de Boni, L. P. F. Aggarwal, J. P. Siqueira, L. Misoguti, I. E. Borissevitch, and S. C. Zilio, "Excited-state dynamics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates," *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 34, no. 4, pp. 741–747, Feb. 2012.

- [133] X. Damoiseau, F. Tfibel, M. Hoebeke, and M.-P. Fontaine-Aupart, "Effect of Aggregation on Bacteriochlorin a Triplet-state Formation: A Laser Flash Photolysis Study¶," *Photochem. Photobiol.*, vol. 76, no. 5, pp. 480–485, May 2007.
- [134] M. Rotenberg and R. Margalit, "Deuteroporphyrin-albumin binding equilibrium. The effects of porphyrin self-aggregation studied for the human and the bovine proteins.," *Biochem. J.*, vol. 229, no. 1, pp. 197–203, Jul. 1985.
- [135] R. K. Pandey, S. Constantine, T. Tsuchida, G. Zheng, C. J. Medforth, M. Aoudia, A. N. Kozyrev, M. A. Rodgers, H. Kato, K. M. Smith, and T. J. Dougherty, "Synthesis, photophysical properties, in vivo photosensitizing efficacy, and human serum albumin binding properties of some novel bacteriochlorins.," *J. Med. Chem.*, vol. 40, no. 17, pp. 2770–9, Aug. 1997.
- [136] A. A. Ouameur, R. Marty, and H. A. Tajmir-Riahi, "Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin.," *Biopolymers*, vol. 77, no. 3, pp. 129–36, Feb. 2005.
- [137] S. Kishore and M. Maruthamuthu, "Binding of rose bengal onto bovine serum albumin," *J. Chem. Sci.*, vol. 105, no. 4–5, Aug. 1993.
- [138] J. Bartosová, I. Kalousek, and Z. Hrkál, "Binding of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine to haemopexin and albumin studied by spectroscopy methods.," *Int. J. Biochem.*, vol. 26, no. 5, pp. 631–7, May 1994.
- [139] J. Davila and A. Harriman, "Photoreactions of macrocyclic dyes bound to human serum albumin.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 9–19, Jan. 1990.
- [140] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, and S. Curry, "Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin.," *J. Mol. Biol.*, vol. 353, no. 1, pp. 38–52, Oct. 2005.
- [141] E. Reddi, F. Ricchelli, and G. Jori, "Interaction of human serum albumin with hematoporphyrin and its Zn(2)+-and Fe(3)+-derivatives.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 402–8, Oct. 1981.
- [142] M. Möller and A. Denicola, "Study of protein-ligand binding by fluorescence," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 30, no. 5, pp. 309–312, Sep. 2002.
- [143] A. Chakrabarty, A. Mallick, B. Haldar, P. Das, and N. Chattopadhyay, "Binding interaction of a biological photosensitizer with serum albumins: a biophysical study.," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 3, pp. 920–7, Mar. 2007.
- [144] D. Zhong, A. Douhal, and A. H. Zewail, "Femtosecond studies of protein-ligand hydrophobic binding and dynamics: human serum albumin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 26, pp. 14056–61, Dec. 2000.
- [145] R. Rotomskis, G. Streckyte, and S. Bagdonas, "Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 172–175, Jun. 1997.

- [146] R. Cubeddu, W. F. Keir, R. Ramponi, and T. G. Truscott, "Photophysical properties of porphyrin-chlorin systems in the presence of surfactants.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 46, no. 5, pp. 633–8, Nov. 1987.
- [147] R. Rotomskis, S. Bagdonas, and G. Streckyte, "Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 33, no. 1, pp. 61–7, Mar. 1996.
- [148] H. Tian and K. Chen, "Solvent effect on the triplet lifetime of some rhodamine dyes," *Dye. Pigment.*, vol. 26, no. 3, pp. 167–174, Jan. 1994.
- [149] I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. J. nez, and M. A. Miranda, "Use of Triplet Excited States for the Study of Drug Binding to Human and Bovine Serum Albumins," *ChemMedChem*, vol. 1, p. 6, Jan. 2006.
- [150] M. Simpson, A. Beeby, S. Bishop, A. MacRobert, A. Parker, M. Simpson, and D. Phillips, "Time-resolved spectroscopic studies of sulphonated aluminium phthalocyanine triplet states," *Proc. SPIE*, vol. 1640, p. 520-529, 1992
- [151] P. Engst, P. Kubát, and M. Jirsa, "The influence of D₂O on the photophysical properties of meso-tetra (4-sulphonatophenyl) porphine, Photosan III and tetrasulphonated aluminium and zinc phthalocyanines," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 215–219, Mar. 1994.
- [152] A. Beeby, A. W. Parker, M. S. C. Simpson, and D. Phillips, "The effect of solvent deuteration on the photophysics of sulphonated aluminium phthalocyanine," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 73–81, Oct. 1992.
- [153] E. I. Alarcon, M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. Garcia, E. A. Lissi, and J. C. Scaiano, "Unexpected solvent isotope effect on the triplet lifetime of methylene blue associated to cucurbit[7]uril.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 269–73, Feb. 2012.
- [154] O. L. J. Gijzeman, F. Kaufman, and G. Porter, "Quenching of aromatic triplet states in solution by nitric oxide and other free radicals," *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, vol. 69, p. 727, Jan. 1973.
- [155] F. A. Cebul, K. A. Kirk, D. W. Lupo, L. M. Pittenger, M. D. Schuh, I. R. Williams, and G. C. Winston, "Charge-transfer mechanism for quenching of the lowest 3 π,π^* state of vapor-phase carbonyl-containing compounds by oxygen," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, no. 17, pp. 5656–5661, Aug. 1980.
- [156] F. Wilkinson and A. A. Abdel-Shafi, "Mechanism of Quenching of Triplet States by Molecular Oxygen: Biphenyl Derivatives in Different Solvents," *J. Phys. Chem. A*, vol. 103, no. 28, pp. 5425–5435, Jul. 1999.
- [157] F. Wilkinson, D. J. McGarvey, and A. F. Olea, "Excited Triplet State Interactions with Molecular Oxygen: Influence of Charge Transfer on the Bimolecular Quenching Rate Constants and the Yields of Singlet Oxygen [O*($^1\Delta_g$)] for Substituted Naphthalenes in Various Solvents," *J. Phys. Chem.*, vol. 98, no. 14, pp. 3762–3769, Apr. 1994.

- [158] K. Hirakawa, T Yamanaka, J. Matsumoto, M. Yasuda, "Examination of Protein-Damaging Activity of Phosphorus(V) Porphyrin Photosensitizer for Photodynamic Therapy," *J. Anal. Bioanal. Tech.*, May 2013
- [159] P. Bilski, K. Reszka, M. Bilska, and C. F. Chignell, "Oxidation of the Spin Trap 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N -Oxide by Singlet Oxygen in Aqueous Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 6, pp. 1330–1338, Jan. 1996.
- [160] E. Finkelstein, G. M. Rosen, and E. J. Rauckman, "Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 21, no. 2, pp. 262–5, Mar. 1982.
- [161] J. S. Armstrong, M. Rajasekaran, W. J. Hellstrom, and S. C. Sikka, "Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology.," *J. Androl.*, vol. 19, no. 4, pp. 412–9, Jan.1998 .
- [162] D. D. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, and S. Locke, "Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins.," *FEBS Lett.*, vol. 187, no. 1, pp. 33–7, Jul. 1985.
- [163] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon, "The antioxidant properties of serum albumin.," *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 13, pp. 1783–7, Jun. 2008.
- [164] G. Cao and R. L. Prior, "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum," *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 6, pp. 1309–1315, Jun. 1998.
- [165] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, and W. Tsang, "Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electronsChemical Kinetic Data Base for Combustion Chemistry. Part 3: Propane," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 17, no. 2, p. 513, Apr. 1988.
- [166] L. Huang, T. G. St Denis, Y. Xuan, Y.-Y. Huang, M. Tanaka, A. Zadlo, T. Sarna, and M. R. Hamblin, "Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: role of ambient oxygen and azide radicals.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 11, pp. 2062–71, Dec. 2012.
- [167] A. J. Carmichael, K. Makino, and P. Riesz, "Quantitative aspects of ESR and spin trapping of hydroxyl radicals and hydrogen atoms in gamma-irradiated aqueous solutions.," *Radiat. Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 222–34, Nov. 1984.
- [168] K. M. Morehouse and R. P. Mason, "The transition metal-mediated formation of the hydroxyl free radical during the reduction of molecular oxygen by ferredoxin-ferredoxin:NADP+ oxidoreductase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 3, pp. 1204–11, Jan. 1988.
- [169] L. Zhou, S. Wei, X. Ge, J. Zhou, B. Yu, and J. Shen, "External heavy-atomic construction of photosensitizer nanoparticles for enhanced in vitro photodynamic therapy of cancer.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 42, pp. 12744–9, Oct. 2012.

- [170] T. A. Shmigol, V. A. Bekhalo, C. I. C. V Sysolyatina, E. V Nagurskaya, S. A. Ermolaeva, and A. Y. Potapenko, "Effect of Sodium Chloride on Aggregation of Merocyanine 540 and Photosensitized Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*," *Acta Naturae*, vol. 3, no. 4, pp. 107–13, Oct. 2011.
- [171] K. Komagoe, K. Tamagake, and T. Katsu, "The influence of aggregation of porphyrins on the efficiency of photogeneration of hydrogen peroxide in aqueous solution.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 54, no. 7, pp. 1004–9, Jul. 2006.
- [172] R. Rai, V. Kumar, and S. Pandey, "Aggregation of a model porphyrin within poly(ethylene glycol) (PEG): effect of water, PEG molecular weight, ionic liquids, salts, and temperature.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 16, pp. 7263–73, Apr. 2014.
- [173] D. Noy, R. Yerushalmi, V. Brumfeld, I. Ashur, H. Scheer, K. K. Baldrige, and A. Scherz, "Optical Absorption and Computational Studies of [Ni]-Bacteriochlorophyll- a . New Insight into Charge Distribution between Metal and Ligands," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 16, pp. 3937–3944, Apr. 2000.
- [174] W. An, Y. Jiao, C. Dong, C. Yang, Y. Inoue, and S. Shuang, "Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin," *Dye. Pigment.*, vol. 81, no. 1, pp. 1–9, Apr. 2009.
- [175] G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade, "The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin," *Mol. Pharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 824–832, Nov. 1975.
- [176] X. Wu, M. Wu, and J. X. Zhao, "Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy.," *Nanomedicine*, vol. 10, no. 2, pp. 297–312, Feb. 2014.
- [177] X. Deng, L. Xiong, L. Lin, G. Xiong, and X. Miao, "Photosan-II loaded hollow silica nanoparticles: preparation and its effect in killing for QBC939 cells.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 460–9, Dec. 2013.
- [178] W. Li, W. Lu, Z. Fan, X. Zhu, A. Reed, B. Newton, Y. Zhang, S. Courtney, P. T. Tiyyagura, S. Li, E. Butler, H. Yu, P. C. Ray, and R. Gao, "Enhanced Photodynamic Selectivity of Nano-Silica-Attached Porphyrins Against Breast Cancer Cells.," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 25, pp. 12701–12708, Jan. 2012.
- [179] J. Lee, J. Park, K. Singha, and W. J. Kim, "Mesoporous silica nanoparticle facilitated drug release through cascade photosensitizer activation and cleavage of singlet oxygen sensitive linker.," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 49, no. 15, pp. 1545–7, Feb. 2013.
- [180] G. V. Gyulkhandanyan, A. G. Gyulkhandanyan, R. K. Gyulkhandanyan, L. Zh. Ghazaryan, G. V. Amelyan, E. S. Gevorgyan, G. A. Kevorkian, and V. A. Sakanyan, "Binding of some cationic porphyrines with serum albumin," *Biol. J. Armen.*, vol. 62, 2010.
- [181] U. Böhme and U. Scheler, "Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 435, no. 4–6, pp. 342–345, Feb. 2007.

- [182] S. M. Andrade and S. M. B. Costa, "Spectroscopic studies on the interaction of a water soluble porphyrin and two drug carrier proteins.," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 3, pp. 1607–19, Mar. 2002.
- [183] Z. Huang, Q. Chen, D. Luck, J. Beckers, B. C. Wilson, N. Trncic, S. M. Larue, D. Blanc, and F. W. Hetzel, "Studies of a vascular-acting photosensitizer, Pd-bacteriopheophorbide (Tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer.," *Lasers Surg. Med.*, vol. 36, no. 5, pp. 390–7, Jun. 2005.
- [184] J. Shao, Y. Dai, W. Zhao, J. Xie, J. Xue, J. Ye, and L. Jia, "Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc(II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells.," *Cancer Lett.*, vol. 330, no. 1, pp. 49–56, Mar. 2013.
- [185] D. Kessel, "Properties cremophor el micelles probed by fluorescence," *Photochem. Photobiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 447–451, Oct. 1992.
- [186] E. Reddi, M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini, and U. Mazzucato, "Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 75, no. 5, pp. 462–70, May 2002.
- [187] X. Ragàs, D. Sánchez-García, R. Ruiz-González, T. Dai, M. Agut, M. R. Hamblin, and S. Nonell, "Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy.," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 21, pp. 7796–803, Nov. 2010.
- [188] N. S. Soukos, L. A. Ximenez-Fyvie, M. R. Hamblin, S. S. Socransky, and T. Hasan, "Targeted antimicrobial photochemotherapy.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, no. 10, pp. 2595–601, Oct. 1998.
- [189] A. Villanueva and G. Jori, "Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4N-methylpyridyl)porphine.," *Cancer Lett.*, vol. 73, no. 1, pp. 59–64, Sep. 1993.
- [190] J. C. Bremner, S. R. Wood, J. K. Bradley, J. Griffiths, G. E. Adams, and S. B. Brown, "31P magnetic resonance spectroscopy as a predictor of efficacy in photodynamic therapy using differently charged zinc phthalocyanines.," *Br. J. Cancer*, vol. 81, no. 4, pp. 616–21, Oct. 1999.
- [191] O. E. Akilov, S. Kosaka, K. O'Riordan, X. Song, M. Sherwood, T. J. Flotte, J. W. Foley, and T. Hasan, "The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites.," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 8, pp. 839–47, Aug. 2006.
- [192] V. Carré, O. Gaud, I. Sylvain, O. Bourdon, M. Spiro, J. Blais, R. Granet, P. Krausz, and M. Guilloton, "Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 48, no. 1, pp. 57–62, Jan. 1999.