

Politechnika Łódzka

ZESZYTY NAUKOWE Nr 1157

BEATA BROŻEK-PŁUSKA

METODY SPEKTROSKOPOWE W DIAGNOSTYCE  
ZMIAN NOWOTWOROWYCH  
LUDZKIEGO GRUCZOŁU PIERSIOWEGO

ŁÓDŹ 2013

POLITECHNIKA ŁÓDZKA

ZESZYTY NAUKOWE Nr 1157

ROZPRAWY NAUKOWE, Z. 448

BEATA BROŻEK-PŁUSKA

METODY SPEKTROSKOPOWE W DIAGNOSTYCE  
ZMIAN NOWOTWOROWYCH  
LUDZKIEGO GRUCZOŁU PIERSIOWEGO

ŁÓDŹ 2013

**ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ**  
SCIENTIFIC BULLETIN  
OF THE LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
BULLETIN SCIENTIFIQUE  
DE L'UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE DE LODZ  
НАУЧНЫЕ ЗАПИСКИ  
ЛОДЗИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА  
WISSENSCHAFTLICHE HEFTE  
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT IN LODZ

Redaktor Naukowy Wydziału: **dr hab. inż. Gy e'U clf | k unc/Rk vgm'r t qh0R/**

Recenzenci: **prof. dr hab. n. med. Alina Morawiec-S| tandra**  
**prof. dr hab. inż. Andrzej Marcinek**

Badania częściowo finansowane z grantu  
Narodowego Centrum Nauki nr 2940/B/T02/2011/40

©Copyright by Politechnika Łódzka 2013

Adres Redakcji – Адрес Редакции – Editor's Office  
Adresse de Redaction – Schriftleitungsadresse:

**WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ**  
**90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223**  
**tel./fax 42-684-07-93**  
**e-mail: [zamowienia@info.p.lodz.pl](mailto:zamowienia@info.p.lodz.pl)**  
**[www.wydawnictwa.p.lodz.pl](http://www.wydawnictwa.p.lodz.pl)**

**ISSN 0137-4834**

Nakład 140 egz. Ark. druk. 7,0. Papier offset. 80 g, 70 x 100  
Druk ukończono w maju 2013 r.  
Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11

## SPIS TREŚCI

|   |     |
|---|-----|
| WYKAZ SKRÓTÓW .....   | 5   |
| STRESZCZENIE .....  | 7   |
| 1. WPROWADZENIE .....   | 11  |
| 1.1. Zastosowanie spektroskopii wibracyjnej w diagnostyce zmian<br>nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego .....                                   | 12  |
| 1.2. Terapia PDT, własności fotochemiczne ftalocyjanin .....  | 17  |
| 2. CEL I ZAKRES BADAŃ .....   | 21  |
| 3. PRZEDMIOTY BADAŃ .....   | 22  |
| 3.1. Tkanki ludzkiego gruczołu piersiowego .....  | 22  |
| 4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE .....   | 26  |
| 4.1. Spektroskopia Ramana preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego ...   | 26  |
| 4.2. Spektroskopia Ramana wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego<br>zawierających fotouczulacz .....   | 58  |
| 4.3. Analiza PCA .....  | 76  |
| 4.4. Czułość i swoistość spektroskopii Ramana w analizie zmian<br>nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego .....                                    | 82  |
| 4.5. Spektroskopia IR preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego, DNA<br>oraz lipidów na przykładzie DPPC w warunkach kontrolowanej<br>wilgotności ..... | 83  |
| 4.6. Spektroskopia UV-Vis, spektroskopia femtosekundowa na granicy<br>faz fotouczulacz-komórki ludzkiego gruczołu piersiowego .....                     | 88  |
| 4.7. Spektroskopia IR filmów ftalocyjaniny glinu .....  | 96  |
| 5. PODSUMOWANIE I WIOSKI .....  | 99  |
| 6. LITERATURA .....   | 102 |
| Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy .....   | 107 |
| SUMMARY .....   | 107 |
| CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORKI .....  | 110 |



## WYKAZ SKRÓTÓW

IR – spektroskopia IR – ang. *infrared spectroscopy* – spektroskopia w podczerwieni  
UV-Vis – spektroskopia UV-Vis – ang. *Ultraviolet-visible spectroscopy* –  
spektroskopia w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu  
NNKT – niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe  
OA – ang. *oleic acid* – kwas oleinowy  
LA – ang. *linoleic acid* – kwas linolowy  
GLA – ang. *γ-linolenic acid* – kwas γ-linolenowy  
AA – ang. *arachidonic acid* – kwas arachidonowy  
ALA – ang. *α-linolenic acid* – kwas α-linolenowy  
EPA – ang. *eicosapentaenoic acid* – kwas eikozapentaenowy  
DHA – ang. *docosahexaenoic acid* – kwas dekozaheksaenowy  
DPPC – ang. *D-α-phosphatidylcholine* – D-α-fostatydylocholina  
DMSO – dimetylosulfotenek  
ISC – ang. *intersystem crossing* – ISC – przejścia międzysystemowe  
PCA – ang. *Principal Component Analysis* – Analiza Głównych Składowych  
PDT – ang. *photodynamic therapy* – terapia fotodynamiczna  
SERS – ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* – powierzchniowo  
wzmocniony efekt Ramana  
CARS – ang. *Coherent Antistokes Raman Spectroscopy* – spójny wymuszony  
efekt Ramana  
DNA – ang. *deoxyribonucleic acid* – kwas dezoksyrybonukleinowy  
RNA – ang. *ribonucleic acid* – kwas rybonukleinowy  
HpD – ang. *hematoporphyrin derivatives* – pochodne hematoporfiryny  
LDL – ang. *light density lipoproteine* – lipoproteiny o niskiej gęstości  
LLSM – Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej  
BaF<sub>2</sub> – fluorek baru  
AlPcS<sub>4</sub> – tetrasulfonowana ftalocyjanina glinu  
WNKT – wielonienasycone niezbędne kwasy tłuszczowe  
NADPH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
ATP – adenozynotrójfosforan  
ZnPcS<sub>4</sub> – tetrasulfonowana ftalocyjanina cynku  
HSA – ang. *human serum albumine* – albumina osocza ludzkiego  
ESA – ang. *excited state absorption* – absorpcja ze stanu wzbudzonego



## STRESZCZENIE

Metodami powszechnie stosowanymi w diagnostyce zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego są: mammografia, ultrasonografia oraz ostatecznie potwierdzające diagnozę badanie histopatologiczne tkanek pobranych podczas biopsji. Badania prezentowane w rozprawie ilustrują możliwość zastosowania metod spektroskopowych w diagnostyce zmian onkologicznych piersi ludzkiej.

Praca przedstawia badania eksperymentalne wykonane z wykorzystaniem: spektroskopii Ramana, spektroskopii IR, spektroskopii UV-Vis i femtosekundowej spektroskopii laserowej dotyczące identyfikacji i spektroskopowej charakteryzacji zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego, w tym preparatów zawierających potencjalne fotouczulacze mogące znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej PDT.

Analiza widm wibracyjnych dla grupy ponad 100 pacjentów Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi pozwoliła na wskazanie markerów zmian nowotworowych, które mogą być oznaczane metodami spektroskopii Ramana, w tym obrazowania Ramana.

Badania z wykorzystaniem spektroskopii Ramana wykonano dla linii wzbudzenia z zakresu widzialnego: 514 oraz 532 nm. Jako obszary spektralne pozwalające na odróżnienie tkanek o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo zaproponowano zakresy charakterystyczne dla drgań karotenoidów, lipidów, białek oraz wody.

Pasma 1004, 1158, 1518  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczne dla karotenoidów, zakres 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczny dla drgań lipidów oraz białek, a także pasma 3258, 3311, 3410  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczne dla drgań cząsteczek wody uznano za markery pozwalające na odróżnienie komórek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo.

W ramach analizy przeprowadzonej dla zakresu spektralnego 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  porównano widma wibracyjne komórek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo z widmami niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych: kwasem oleinowym (OA,  $\omega$ -9), przedstawicielami kwasów  $\omega$ -6: kwasem linolowym (LA),  $\gamma$ -linolenowym (GLA), arachidonowym (AA) oraz przedstawicielami kwasów  $\omega$ -3: kwasem  $\alpha$ -linolenowym (ALA), eikozapentaenowym (EPA) i dekozaheksaenowym (DHA). Analiza porównawcza została przeprowadzona także dla: trójpodstawionych pochodnych glicerolu, D- $\alpha$ -fosfatydylocholicy (DPPC), mioinositolu, kardiolipiny, sfingomieliny, cholesterolu. Widma Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego z zakresu 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  porównano także z widmami białek zwierzęcych (świńskich) pochodzących z komórek mięśniowych.



Analiza preparatów gruczołu piersiowego w zakresie 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  pozwoliła na identyfikację różnych typów wody w postaci wody w masie (ang. *bulk*) oraz wody międzyfazowej (ang. *interfacial water*). Pasma 3258, 3410  $\text{cm}^{-1}$  przypisano drganiom wody typu bulk, a pasmo 3311  $\text{cm}^{-1}$  uznano za charakterystyczne dla wody międzyfazowej. Pasma 3311  $\text{cm}^{-1}$  okazało się typowym dla preparatów komórek nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego. Przeprowadzone badania spektroskopowe pozostają w zgodzie z obserwacjami klinicznymi, wskazującymi, iż tkanki nowotworowe cechuje większa w porównaniu z komórkami o budowie prawidłowej hydratacja, która pobudza ich proces dzielenia się, ekspresję onkogenu, dezaktywuje geny odpowiedzialne za różnicowanie się komórek, zapobiega apoptozie, a stopień hydratacji koreluje ze stopniem złośliwości nowotworu.

Z wykorzystaniem spektroskopii IR została wykonana analiza widm wibracyjnych w funkcji wilgotności dla podstawowych składników budulcowych każdej komórki żywej, takich jak DNA i DPPC otrzymane wyniki pozwoliły wyciągnąć wnioski dotyczące siły oddziaływań między cząsteczkami wody a składnikami komórki.

Niskotemperaturowa spektroskopia Ramana, stacjonarna spektroskopia absorpcyjna UV-Vis oraz femtosekundowa spektroskopia laserowa absorpcji przejściowej zostały zastosowane w analizie własności fotochemicznych potencjalnych fotouczulaczy na przykładzie roztworów metaloftalocyjanin w postaci tetrasulfonowanych ftalocyjanin: cynku, aluminium, magnezu i miedzi w  $\text{H}_2\text{O}$  oraz DMSO. Dokonano identyfikacji mechanizmów dyssypacji energii w badanych układach zachodzących pod wpływem światła niepozostającego w rezonansie z przejściami elektronowymi B i Q charakterystycznymi dla tej klasy związków.

Z wykorzystaniem spektroskopii femtosekundowej przeanalizowano oddziaływanie między kwasem ftalocyjaniny glinu w postaci filmów a komórkami ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i patologicznej dla linii wzbudzenia 677 nm pozostającej w rezonansie z przejściem Q wybranej ftalocyjaniny; otrzymane wyniki porównano z danymi charakterystycznymi dla roztworów wodnych tego fotouczulacza.

Badania metaloftalocyjanin wykonane z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej z zakresu UV-Vis dla roztworów wodnych i w DMSO pozwoliły na oszacowanie stałych dimeryzacji dla ftalocyjanin: cynku, miedzi, glinu i magnezu i potwierdziły, iż większość ftalocyjanin agreguje silniej w roztworach wodnych niż w DMSO. Wyjątkiem okazała się tetrasulfonowana ftalocyjanina glinu, która w postaci kwasu, jak i soli czterosodowej, pozostawała w formie monomeru tak w wodzie, jak i rozpuszczalniku organicznym.

Analiza filmów tetrasulfonowanej ftalocyjaniny glinu w postaci kwasu oraz soli czterosodowej z wykorzystaniem spektroskopii IR pozwoliła na identyfikację wpływu podstawników w makrocyklu na własności wibracyjne hydratowanych filmów ftalocyjanin. Zidentyfikowane zostały drgania wody zaangażowane w oddziaływania o charakterze wiązań wodorowych z grupą sulfonową i atomem centralnym makrocyklu.

Badania roztworów tetrasulfonowanych ftalocyjanin w wodzie i DMSO z wykorzystaniem spektroskopii femtosekundowej oraz niskotemperaturowej spektroskopii Ramana, dla wzbudzenia niepozostającego w rezonansie z przejściami B i Q ftalocyjanin, pozwoliły na zaproponowanie mechanizmów dyssypacji energii w badanych układach obejmujących kanały promieniste i bezpromieniste. Analiza widm niskotemperaturowych, jak i widm absorpcji przejściowej pozwoliła na identyfikację kanałów fotoindukowanej dysocjacji związanych z przeniesieniem elektronu między jonami ftalocyjanin. Wykazano, że przeniesienie elektronu jest związane z odległością między sąsiadującymi pierścieniami i może zachodzić efektywnie jedynie dla struktur typu 'kanapkowego' (ang. *ring stacked*), w których występuje silne nakładanie się chmur  $\pi$  elektronów ligandów. Wykazano, iż struktury te występują w fazach krystalicznych dla wysoko stężonych roztworów wodnych. Pokazano także, że fotoindukowane przeniesienie elektronu nie występuje w roztworach z DMSO. Zagadnienie agregacji ftalocyjanin jest bardzo istotne z punktu widzenia zastosowań tych związków w terapii PDT. Równowaga procesu dimeryzacji przesunięta silnie w kierunku monomeru zwiększa efektywność przejść interkombinacyjnych (ang. *intersystem crossing* – ISC) do stanu trypletowego oraz wydajność generowania tlenu singletowego, co z kolei zwiększa pożądane działanie ftalocyjaniny w fotodynamicznej terapii antynowotworowej.

Analiza oddziaływań fotouczulacza w postaci filmu z komórkami gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i nowotworowej, na przykładzie kwasu ftalocyjaniny glinu, pozwoliła wykazać, że dla tkanki o budowie prawidłowej typowe są procesy relaksacji bezpromienistej w przeciwieństwie do komórek nowotworowych oraz roztworów, dla których przeważają promieniste kanały relaksacji energii.

Analiza widm Ramana, w zakresach spektralnych, charakterystycznych dla karotenoidów i lipidów pozwoliła na wyznaczenie czułości i swoistości stosowanej metody spektroskopowej względem proponowanych markerów zmian nowotworowych.

Zastosowanie analizy PCA pozwoliło zaś na wskazanie częstości pasm różnicujących komórki prawidłowe ludzkiego gruczołu piersiowego od zmienionych nowotworowo z wykorzystaniem metod chemometrycznych.



## 1. WPROWADZENIE

Jedną z głównych przyczyn umieralności na świecie są choroby nowotworowe. Prawie 20% zgonów każdego roku powodowanych jest przez nowotwory; w Polsce z tego powodu umiera około 70 tys. osób rocznie, blisko 40% tej grupy stanowią kobiety w wieku 45-65 lat.

Najczęstszymi nowotworami, na jakie zapadają kobiety są nowotwory narządów płciowych: rak gruczołu piersiowego, rak jajnika, rak szyjki macicy [1].

Według danych Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie w roku 2009 około 15% nowych zachorowań na nowotwory w Polsce, leczonych w Centrum, stanowiły nowotwory złośliwe sutka, w roku 2008 zachorowań tych było ponad 14% [2].

Rak piersi jest jednym z najczęstszych nowotworów odnotowywanych także w statystykach światowych; Narodowy Instytut Zdrowia USA zarejestrował w roku 2011 blisko 200 000 przypadków raka piersi, około 19% z nich okazało się przypadkami śmiertelnymi [3].

Istnieją przesłanki wskazujące, że zapadalność na nowotwory gruczołu piersiowego skorelowana jest z takimi czynnikami jak m.in.: wiek pacjenta, występowanie raka sutka u krewnych, szczególnie pierwszego stopnia, sytuacja ekonomiczna i społeczna, poziom hormonów w organizmie, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, dostęp do opieki medycznej, późne zajście w pierwszą ciążę czy też otyłość [4, 5].

Do standardowych metod diagnostycznych, wykorzystywanych obecnie w Polsce, jak i na świecie w diagnostyce nowotworów piersi, należą: mammografia, ultrasonografia i ostatecznie potwierdzające diagnozę badanie histopatologiczne. Mammografia odgrywa szczególną rolę w badaniach przesiewowych. Badania mammograficzne prócz niewątpliwych zalet cechują jednak pewne ograniczenia. Mammografia rejestruje zmiany gęstości tkanki i tym samym obszary zidentyfikowane w mammografii jako podejrzone nie muszą być związane z rakiem piersi. Niekiedy zdarza się, że obraz radiologiczny sugerujący istnienie nowotworu nie znajduje potwierdzenia w badaniu histologicznym podejrzonej zmiany. Mammografia jest także techniką, która nie potrafi odróżnić zmian łagodnych od zmian złośliwych. Wykorzystywanie promieniowania jonizującego podczas badań mammograficznych niesie ze sobą ryzyko uszkodzeń tkanek zdrowych. Innymi ujemnymi następstwami badań mammograficznych mogą być także: negatywne skutki psychologiczne w przypadku wykonywania zbędnych biopsji, czy też błędne rozproszenie obaw badanej pacjentki w przypadku wyniku ujemnie fałszywego. Czulość badania mammograficznego u chorych z rakiem sutka, który

jest wyczuwalny podczas badania palpacyjnego określa się na poziomie około 80-90% [2, 3]. Wynika z tego, że u 10-20% chorych badanie to nie pozwala na wykrycie istniejącego nowotworu, a jedynie rozpoczęcie leczenia w stadium T1N0 (T1 guz o średnicy poniżej 2 cm, N0 regionalne węzły chłonne bez przerzutów, na podstawie klasyfikacji TNM; *Tumor* – guz, *Nodus* – węzeł chłonny, *Metastases* – przerzuty odległe, opracowanej na potrzeby Światowej Organizacji Zdrowia – WHO (ang. *World Health Organization*)) pozwala na całkowite wyleczenie [2]. Istotnym ograniczeniem mammografii oraz ultrasonografii, stosowanej w przypadku pacjentek poniżej 35 lat, jest także fakt, że techniki te nie dostarczają żadnych informacji o biochemicznym podłożu rozwijających się w organizmie zmian nowotworowych. Dostarczany przez nie wynik, choć satysfakcjonujący z punktu widzenia diagnostyki, nie pozwala na uzyskanie informacji koniecznych do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za transformację komórek o budowie prawidłowej w komórki zmienione nowotworowo, a chęć zgłębienia mechanizmów molekularnych prowadzących do powstania raka leży u podstaw wszystkich prac naukowych podejmujących zagadnienia badań nad nowotworami.

Wymienione powyżej przyczyny spowodowały, iż od pewnego czasu intensywnie rozwijają się metody, które umożliwiłyby szybką i jednoznaczną diagnozę zmian nowotworowych w oparciu o analizę składu chemicznego badanych tkanek, a tym samym pozwoliłyby na szybką i jednoznaczną identyfikację markerów nowotworowych.

Rolę markera może pełnić każda substancja, która jest produkowana przez zmienione nowotworowo komórki bądź jest syntezowana i uwalniana przez komórki prawidłowe w wyniku toczącego się procesu nowotworowego [6].

Jak wykażą dalsze części rozprawy metodami, które pozwalają na szybką identyfikację zmian nowotworowych są: spontaniczna spektroskopia Ramana, obrazowanie Ramana, spektroskopia IR. Femtosekundowa spektroskopia laserowa pozwala zaś na wyjaśnienie mechanizmów dyssypacji energii na granicy faz fotouczulacz-tkanki piersi ludzkiej, przyczyniając się do lepszego zrozumienia procesów towarzyszących terapii PDT.

### **1.1. Zastosowanie spektroskopii wibracyjnej w diagnostyce zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego**

Spektroskopia wibracyjna, w tym spektroskopia Ramana, jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin biospektroskopii znajdującej szerokie zastosowanie w analizie zmian nowotworowych, w tym guzów ludzkiego gruczołu piersiowego. Spektroskopia Ramana znana jest już od prawie 100 lat, ale dopiero

w ostatnich dziesięcioleciach dzięki rozwojowi mikroelektroniki, informatyki oraz statystyki staje się coraz szerzej wykorzystywanym narzędziem badawczym w analizie układów biologicznych. Główne zalety spektroskopii ramanowskiej, w porównaniu z innymi metodami spektroskopowymi, to m.in.: możliwość przeprowadzania analizy w warunkach otoczenia, czyli np. brak konieczności stosowania próżni czy też środowiska gazów obojętnych oraz brak konieczności specyficznego przygotowania próbki, w tym stosowania znaczników egzogennych. W oznaczeniach nie przeszkadza także obecność wody, aspekt ten ma szczególne znaczenie w analizie preparatów biologicznych. Połączenie metod spektroskopii Ramana z mikroskopią konfokalną pozwala na konstruowanie map rozkładu różnych substancji w masie badanej próbki, w tym projekcji 3D, z ekstremalnie wysoką rozdzielczością, czyli wykonywanie tak zwanego obrazowania (mapowania) Ramana. W technice tej również nie jest wymagane żadne wstępne przygotowanie próbki, a kontrast jest osiąganym poprzez naturalne różnice w przekroju czynnym na rozpraszanie poszczególnych struktur komórkowych. Konfokalna mikroskopia Ramana reprezentuje nową generację obrazowania molekularnego, pozwalając badać nawet pojedynczą komórkę w jej naturalnym środowisku fizjologicznym.

Znaczące, z punktu widzenia diagnostyki zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego, wyniki osiągane są także z wykorzystaniem spektroskopii IR, a dzięki komplementarności obu metod spektroskopowych: spektroskopii IR oraz spektroskopii Ramana, możliwe jest otrzymanie pełnej informacji biochemicznej dotyczącej badanych układów biologicznych w oparciu o analizę widm wibracyjnych.

Pierwszymi badaniami, które ukazały światu zdolność spektroskopii Ramana do odróżnienia komórek gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo były badania Alfano i wsp. [7] opublikowane w roku 1991. Badając wycinki tkanek piersi (7 ze zmianą łagodną i 7 ze zmianą złośliwą) z wykorzystaniem źródła wzbudzenia o długości fali 1064 nm, Alfano i wsp. stwierdzili, że względna intensywność pasm 1445 i 1651  $\text{cm}^{-1}$  może być wykorzystywana do zdiagnozowania choroby nowotworowej, pochodzenie biochemiczne tych pasm nie zostało jednak wyjaśnione [7].

W latach 1994 i 1995 Redd wraz z grupą wsp. [8] opublikował wyniki badań dotyczące spektroskopowej analizy wycinków tkanek piersi ludzkiej, z wykorzystaniem różnych długości fal wzbudzenia: 406, 488, 515, 647, 691, 784 i 830 nm. Wzbudzenie światłem widzialnym z zakresu 406-515 nm pozwoliło grupie Redda m.in. na zaobserwowanie w widmach tkanek o utkaniu prawidłowym pasm karotenoidów. Redd zidentyfikował trzy główne pasma karotenoidów:

1105  $\text{cm}^{-1}$ , 1156  $\text{cm}^{-1}$ , 1517  $\text{cm}^{-1}$  jako charakterystyczne, wzmocnione rezonansowo pasma Ramana pochodzące od tej klasy związków. W dalszych badaniach, jako główną linię wzbudzenia, Redd stosował 784 nm [8]. Analiza wyników otrzymanych dla tej linii wzbudzenia zwróciła uwagę także na pasmo 1439  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczne dla tkanki o utkaniu prawidłowym, które przesunęło się do 1450  $\text{cm}^{-1}$  dla tkanki ze złośliwą zmianą nowotworową. Pasma przy 1439  $\text{cm}^{-1}$  zostało zinterpretowane jako odpowiadające drganiu rozciągającemu grupy  $\text{CH}_2$ , którego intensywność zależy od stężenia lipidów i białek w badanej tkance. Drugie charakterystyczne pasmo 1654  $\text{cm}^{-1}$  Redd przypisał drganiu rozciągającemu grupy  $\text{C}=\text{C}$  i stwierdził, że charakter tego drgania zmienia się w zależności od stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych występujących w tkance. Uzyskanie informacji o pasmach 1439  $\text{cm}^{-1}$  i 1654  $\text{cm}^{-1}$  pozwoliło grupie Redda na rozróżnienie tkanek o utkaniu prawidłowym od tkanek ze zmianą złośliwą w oparciu o wzrost stężenia białek w złośliwej tkance nowotworowej, jednak ten etap badań nie umożliwił rozróżnienia tkanki ze zmianą łagodną od tkanki ze zmianą złośliwą.

Spektroskopowy model dopasowujący, w badaniach nad zastosowaniem spektroskopii Ramana, w analizie nowotworów ludzkiego gruczołu piersiowego, został opracowany przez Shafer-Peltier i wsp. [9]. W badaniach grupa Shafer-Peltier skoncentrowała się na wynikach otrzymanych dla linii wzbudzenia 830 nm. Model opierał się na opracowaniu kombinacji widm podstawowych składników tkanki, otrzymanych metodą spektroskopii Ramana, w taki sposób by kombinacja ta jak najlepiej oddawała makroskopowe widmo ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo. Do podstawowych składników gruczołu piersiowego Shafer-Peltier i wsp. zaliczyli: kolagen, komórki cytoplazmy, lipidy, jądro komórkowe, cholesterol, hydroksyapatyt wapnia, wodę, dwuwodny szczawian wapnia oraz  $\beta$ -karoten. Podstawą modelu dopasowującego było założenie, że widmo Ramana badanej mieszaniny jest prostą, liniową kombinacją widm jej składników oraz że pomiędzy intensywnością rejestrowanego sygnału a stężeniem badanej substancji istnieje zależność wprost proporcjonalna. Analiza przeprowadzona dla przypadków raka przewodowego naciekającego (*IDC, łac. carcinoma ductale infiltrans mammae*) pozwoliła grupie Shafer-Peltier wykazać, że tkanka typowa dla tego nowotworu składa się w 40% z kolagenu, 31% z cytoplazmy, 19% ze związków cholesterolu, 5% ze związków typowych dla jądra komórkowego, 2% lipidów. W przypadku zamiany łagodnej – gruczolakowłókniaka (*łac. fibroadenoma*) ustalono, że tkanka składa się w 16% z kolagenu, 15% ze związków cholesterolu, 5% ze związków typowych dla jądra komórkowego, 26% z lipidów. Dla tkanki o utkaniu prawidłowym zastosowanie

modelu dopasowującego pozwoliło na otrzymanie następujących wyników: 1% kolagenu, 10% związków cholesterolu, 83% lipidów.

Kneipp, Puppels oraz wsp. [10] w roku 2003 przedstawili wyniki badań dotyczące spektroskopowej charakterystyki nabłonka piersi ludzkiej z wykorzystaniem spektroskopii Ramana dla linii wzbudzenia 840 nm oraz analizę statystyczną PCA dla otrzymanych danych. Kneipp i Puppels przeprowadzili badania dla tkanki nabłonkowej, ponieważ z tej właśnie tkanki wywodzi się około 90% zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego [4]. Szczególną uwagę grupa ta, podobnie jak Shafer-Peltier i wsp., poświęciła takim komponentom gruczołu piersiowego jak: DNA, białka oraz lipidy, wskazując na ich dominującą rolę w różnicowaniu tkanek o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo.

W roku 2005 Feld i wsp. [11] przedstawili pracę przeglądową dotyczącą zastosowania spektroskopii Ramana w diagnostyce raka piersi, koncentrując się na składzie biochemicznym tkanek o utkaniu prawidłowym i zmienionych chorobowo oraz czułości zastosowanej metody spektroskopowej. Czułość spektroskopii Ramana w diagnostyce raka piersi Feld i wsp. oszacowali na poziomie ponad 90%, potwierdzając jej wysoki potencjał w diagnostyce onkologicznej tego narządu [12].

Prace nad zastosowaniem spektroskopii Ramana w diagnostyce gruczołu piersiowego prowadzili także Chodwdary, Kumar i Kurien. W roku 2006 Chodwdary i wsp. opublikowali wyniki pomiarów dotyczących analizy ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej oraz ze zdiagnozowaną zmianą nowotworową łagodną lub złośliwą. W widmach otrzymanych dla linii wzbudzenia 785 nm Chodwdary i wsp. zarejestrowali pasma pochodzące od lipidów dla tkanki prawidłowej (1078, 1267, 1301, 1440, 1654, 1746  $\text{cm}^{-1}$ ) oraz białek w widmie tkanek ze zmianą łagodną i złośliwą (silne amidu I, poszerzone i silne amidu III, 1002, 1033, 1530, 1556  $\text{cm}^{-1}$ ). Główne różnice w widmach tkanki ze zmianą łagodną w porównaniu do tkanki ze zmianą złośliwą, Chodwdary i wsp. zaobserwowali w intensywności pasm lipidów (1082, 1301, 1440  $\text{cm}^{-1}$ ) dla zmiany złośliwej i dominującej intensywności pasm pochodzących od białek (amidu I, amidu III) dla zmiany łagodnej [13].

Charakterystyka spektroskopowa struktur gruczołu piersiowego, poparta analizą chemometryczną była także głównym tematem prac grupy Stone'a [14-17]. W pracy opublikowanej w *Cancer Research* w roku 2008 Stone oraz wsp. potwierdzili potencjał spektroskopii Ramana we wczesnej diagnostyce onkologicznej gruczołu piersiowego, opisując zastosowania techniki transmisyjnej w analizie ognisk zwapnienia ludzkiego gruczołu piersiowego.



Wyniki analizy porównawczej dla linii wzbudzenia 1064 nm dla tkanek piersi o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo opublikowali w roku 2010 Moreno i wsp., a w analizie skoncentrowali się przede wszystkim na drganiach charakterystycznych dla lipidów i wody [18].

Downes i wsp. [19] w roku 2010 opublikowali przeglądowy artykuł, dotyczący zastosowania różnych technik spektroskopii Ramana: obrazowania Ramana, powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (ang. *SERS*) i spójnego wymuszonego efektu Ramana (ang. *CARS*) w badaniach układów biologicznych. Autorzy podkreślili ogromny potencjał diagnostyczny spektroskopii Ramana, w tym w odniesieniu do pomiarów *in vivo*, z zastosowaniem technik endoskopowych. Analiza wykonana z zastosowaniem spektroskopii Ramana, dokonana przez Downesa i współpracowników, dotyczyła m.in. linii komórkowej MCF-7 (komórek nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego typu adenocarcinoma). Wykorzystując linię wzbudzenia 785 nm, Downes i wsp. zidentyfikowali takie składniki komórek MCF-7 jak: białka, kwasy nukleinowe i lipidy. Dzięki wykorzystaniu mapowania Ramana autorzy przedstawili także rozkład przestrzenny poszczególnych komponentów komórek linii MCF-7 [19].

Coraz większe zastosowanie w badaniach nad spektroskopową diagnostyką zmian nowotworowych zyskuje także spektroskopia IR. Venkatachalam w roku 2008 [20] przedstawił wyniki analizy porównawczej komórek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i nowotworowej w zakresie 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Analiza ta potwierdziła, że stosunek intensywności pasm charakterystycznych dla lipidów, kwasów nukleinowych, kolagenu, węglowodanów i glikogenu  $A_{3300}/A_{3015}$ ,  $A_{1650}/A_{1550}$ ,  $A_{2924}/A_{2853}$ ,  $A_{1080}/A_{1236}$ ,  $A_{1204}/A_{1650}$ ,  $A_{1055}/A_{1467}$  oraz  $A_{1045}/A_{1467}$  może być wykorzystywany do odróżnienia komórek o budowie prawidłowej od zmienionych patologicznie.

W roku 2009 Petter i wsp. [21] opublikowali przeglądowy artykuł dotyczący zastosowania spektroskopii IR w identyfikacji zmian nowotworowych. Szczególną uwagę w procesie różnicowania tkanek prawidłowych od zmienionych nowotworowo, analizując nowotwory piersi, prostaty, jelita i jamy ustnej, poświęcili białkom.

Zakresy spektralne różnicujące tkankę zdrową od nowotworowej w obszarach drgań charakterystycznych dla wibracji grup CH łańcuchów węglowodnorodnych, grupy C-O rybozy i drgań wiązania P-O dla widm zarejestrowanych z wykorzystaniem techniki IR zostały zidentyfikowane przez grupę Backhausa [22].

Obrazowanie IR w diagnostyce nowotworów piersi było zaś tematem prac Lascha [23,24]. Największe różnice w budowie komórek prawidłowych i nowotworowych Lasch i wsp. zaobserwowali dla drgań DNA, RNA i fosfolipidów.

Przeglądową pracę dotyczącą zastosowań mikroskopii i spektroskopii IR w analizie zmian nowotworowych opublikował w 2012 roku Ballicola [25]. Ballicola i wsp. przedstawili m.in. zestawienia częstości charakterystycznych dla lipidów, białek, DNA, RNA, wody i glikogenu pomocne w identyfikacji zmian nowotworowych.

Szczególną pozycję dokumentującą przydatność spektroskopii wibracyjnej w zastosowaniach medycznych zajmuje monografia pod redakcją Diema „Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis” Wiley-Blackwell (2008) opisująca zastosowania spektroskopii oscylacyjnej w diagnostyce onkologicznej różnych narządów organizmu ludzkiego [26].

## 1.2. Terapia PDT, własności fotochemiczne ftalocyjanin

Bardzo istotnym zagadnieniem w procesie leczenia chorób nowotworowych jest jednoznaczna i precyzyjna identyfikacja nowotworów, która może być dokonana na drodze analizy biochemicznej tkanek. Aby jednak terapia przyniosła oczekiwane rezultaty i doprowadziła do wyleczenia pacjenta, równie ważnym zagadnieniem jest możliwość śledzenia postępów wdrożonej terapii antynowotworowej. Jak wykaże dalsza część rozprawy spektroskopia wibracyjna okazała się niezwykle użyteczną metodą diagnostyki i śledzenia procesu leczenia, który może opierać się m.in. na zastosowaniu fotouczulaczy, czyli wdrożeniu terapii PDT.

Terapia PDT jest metodą umożliwiającą lokalizowanie i zwalczanie komórek nowotworowych rozwijających się w organizmie człowieka. Jednym z czynników niezbędnych w terapii PDT są fotouczulacze [27].

Fotouczulaczem może być dowolna substancja, która wykazuje zróżnicowane powinowactwo do komórek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo [27,28]. Musi być to również substancja, która na skutek wzbudzenia promieniowaniem elektromagnetycznym inicjuje ciąg reakcji prowadzących w sposób pośredni lub bezpośredni do zniszczenia komórek nowotworowych.

Szczególne miejsce w terapii PDT odgrywają ftalocyjaniny – syntetyczne pigmenty o budowie zbliżonej do występujących w środowisku naturalnym porfiryn. Metaloftalocyjaniny zyskały popularność w terapii PDT od chwili, gdy Ben-Hur zwrócił uwagę na antynowotworowe działanie chlorku ftalocyjaniny glinu [29]. Początki terapii PDT sięgają jednak XIX wieku, gdy von Tappeiner i Raab odkryli toksyczne własności niektórych barwników, takich jak eozyna, chinina i akrydyna dla pierwotniaków w obecności światła [29]. W 1903 roku von Tappeiner oraz dermatolog Jesionek po raz pierwszy zastosowali eozynę jako fotouczulacz w leczeniu nowotworów skóry. Termin "fotodynamiczna" został wprowadzony w 1904 r. przez von Tappeinera oraz Jodlbauera. Z czasem

naukowcy wykazali również, że reakcja fotodynamiczna wymaga obecności tlenu [30,31]. W 1924 roku Policard, jako pierwszy, zaobserwował podwyższoną fluorescencję tkanek nowotworowych w trakcie naświetlania światłem ultrafioletowym [30,31]. Było to pierwsze naukowe doniesienie dotyczące fluorescencji tkanki nowotworowej, w której nastąpiła zwiększona kumulacja endogennych porfiryn. W latach czterdziestych XX w. Auler i Banzer odkryli, że porfiryny ulegają selektywnej koncentracji w tkankach nowotworowych [30,31]. Era PDT rozpoczęła się wraz ze studiami Lipsona i Baldesa, którzy w 1960 r. zastosowali opracowane przez Schwartza pochodne hematoporfiryny (HpD – ang. *hematoporphyrin derivatives*) w wykrywaniu zmian nowotworowych u ludzi. W 1975 roku Dougherty publikuje pierwszy artykuł o udanym przypadku wyleczenia nowotworu u myszy z wykorzystaniem HpD aktywowanych światłem z zakresu podczerwieni [32].

Ftalocyjaniny spełniają większość założeń idealnego fotouczulacza w terapii PDT: nie wykazują cytotoksyczności bez udziału światła, są więc bezpieczne dla pacjenta, efektywnie generują rodnikowe formy tlenu, preferencyjnie kumulują się w komórkach nowotworowych [33].

Ftalocyjaniny odkryto w roku 1907 w szkockiej fabryce barwników podczas syntezy imidu ftalowego. Na dnie reaktorów otrzymano wówczas nierozpuszczalny osad o intensywnym ciemnoniebieskim zabarwieniu. Był to kompleks ftalocyjaniny żelaza. Za odkrywców ftalocyjanin uważa się Brauna i Tcherniaca [34].

Nazwa ftalocyjanina pochodzi od dwóch greckich słów – „*naphtha*” oznaczającego naftę i „*cyanine*”, czyli zielononiebieski, był to kolor pierwszego odkrytego przedstawiciela tej grupy związków. Nazwa ftalocyjanina po raz pierwszy została użyta w roku 1933 przez Sir Linsteadę [35], który również, jako pierwszy, opisał strukturę tych związków. Struktura ftalocyjaniny została potwierdzona badaniami rentgenograficznymi przez grupę Robertsona [36].

Struktura elektronowa kompleksów ftalocyjanin w roztworach została opisana po raz pierwszy w pracy Levera [37]. Późniejsze prace dotyczące tej klasy związków to m. in. prace Taube [38] czy Goutermana, i choć praca Goutermana [39] dotyczyła przede wszystkim porfiryn, to główny wątek poświęcony specyficznym własnościom wynikającym ze sprzężenia między przejściami  $\pi-\pi^*$ , a przejściami związanymi z przeniesieniem ładunku jest szczególnie aktualny w kontekście badań nad ftalocyjaninami. Gouterman w swojej pracy przedstawił wiele danych dotyczących różnie modyfikowanych porfiryn, a jego publikacja jest doskonałym źródłem umożliwiającym porównywanie odmiennych własności członków tej klasy związków, wynikających z charakteru metalu centralnego lub też podstawników. Dyskusja dotycząca

aspektów teoretycznych związanych z porfirynami zawarta w pracy Goutermana jest niezwykle wartościowa szczególnie w kontekście zdefiniowania poziomów energetycznych przewidywanych teoretycznie i obserwowanych na podstawie widm absorpcyjnych i emisyjnych ftalocyjanin.

Szczegółowe opracowania dotyczące własności chemicznych ftalocyjanin zostały opublikowane także przez Mosera i Thomasa [40,41]. Pracę przeglądową dotyczącą ftalocyjanin opublikowali również Simon i Andre [42]. Praca ta zawiera informacje o strukturalnych, spektroskopowych i elektrochemicznych właściwościach ftalocyjanin w kontekście ich specyficznych własności elektrycznych i fotowoltaicznych. Cenną jest również praca Owensa i O'Connora [43] opisująca własności spektralne porfiryn z żelazem szczególnie wobec możliwości porównywania ich z ftalocyjaninami zawierającymi żelazo jako atom centralny. Badania poświęcone ftalocyjaninom były także przeprowadzone przez grupę Ferraudiego [44]. Widma fluorescencji ftalocyjanin badali Howe i Zhang [45], a także Rückmann [46].

Bardzo ważnym zagadnieniem, w kontekście zastosowań ftalocyjanin w PDT, jest zdolność ftalocyjanin do wiązania się z komórkami nowotworowymi, w tym określonymi strukturami i organellami komórek rakowych.

Ogólnie selektywność gromadzenia się fotouczulaczy w tkance nowotworowej jest wyrażana jako stosunek stężenia fotosensybilizatora w guzie do jego stężenia w tkance zdrowej. Wykazano, że stosunek ten zależy od typu nowotworu, rodzaju oraz sposobu podania fotouczulacza [47]. Najczęstszym sposobem podania fotouczulacza jest iniekcja dożylna. Udowodniono, że związki silnie hydrofobowe wiążą się preferencyjnie z lipoproteinami, podczas gdy umiarkowanie hydrofobowe oraz hydrofilowe z białkami osocza, głównie albuminami [47, 48]. Fotouczulacze hydrofilowe transportowane przez białka osocza kumulują się preferencyjnie w zrębie naczyń krwionośnych guza, stąd dominującym mechanizmem działania PDT są wówczas efekty naczyniowe. Związki lipofilowe, tworzące kompleksy z lipoproteinami, gromadzą się zaś głównie w komórkach tkanki łącznej nowotworu i dlatego w ich przypadku dominuje mechanizm bezpośredniej śmierci komórek [48, 49]. Fotouczulacze, takie jak porfiryny, wykazują również duże powinowactwo do fibryny, kolagenu i elastyny – składników zrębu naczyniowego oraz nowotworu [48]. Kilka cech charakterystycznych dla szybko rozwijającej się tkanki nowotworowej również wpływa stymulująco na selektywność gromadzenia się fotouczulaczy. Tkanki o dużej aktywności mitotycznej wytwarzają bowiem zwiększoną ilość receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości – LDL na powierzchni komórek. Powinowactwo hydrofobowych fotouczulaczy do lipoprotein surowicy, w szczególności

do LDL, odgrywa więc istotną rolę w ich dostarczaniu do tkanki nowotworowej [47, 49]. Nowotwory odporne na PDT wykazują zwykle niską aktywność receptorów związanych z LDL [50]. W gwałtownie rozwijającej się tkance nowotworowej pH jest zawsze niższe niż w otaczających tkankach zdrowych. Fakt ten jest dodatkowym czynnikiem selektywnej lokalizacji niektórych fotouczulaczy. Badania udowodniły bowiem, że obniżenie pH w tkance nowotworowej, np. dzięki podaniu glukozy, zwiększało selektywność gromadzenia się fotouczulaczy [51]. Szybka angiogeneza w tkance nowotworowej skutkuje także powstawaniem naczyń słabej jakości, wykazujących tendencję do "przeciekania", co ułatwia przedostawanie się makromolekuł do macierzy międzykomórkowej. Jednocześnie fotouczulacz jest usuwany z guza wolniej ze względu na zaburzenia odpływu limfy [49].

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja fotouczulaczy jest ważnym czynnikiem determinującym efektywność fotodynamiczną. Tlen singletowy charakteryzuje krótki czas życia, stąd uszkodzenia powstałe w wyniku reakcji PDT mają miejsce w sąsiedztwie struktur, w których zlokalizowany jest fotouczulacz. Na wewnątrzkomórkową lokalizację fotouczulaczy wpływ mają takie czynniki jak: 1) ładunek fotosensybilizatora, 2) stopień agregacji, 3) rozpuszczalność, 4) sposób podania leku, 5) czas, który upłynął pomiędzy podaniem fotouczulacza a rozpoczęciem naświetlania [52].

Fotouczulacze lipofilowe preferencyjnie lokalizują się w strukturach błonowych, np. w błonie komórkowej, błonach mitochondrialnych, retikulum endoplazmatycznym czy błonie jądrowej. Fotosensybilizatory hydrofilowe oraz wykazujące tendencję do agregacji są zaś pobierane przez komórki w procesie endocytozy i dlatego lokalizują się głównie w lizosomach [52, 53].

Łączenie fotouczulaczy z nośnikami takimi jak liposomy, lipoproteiny, polimery czy nanocząsteczki także wpływa na ich wewnątrzkomórkową lokalizację i zwiększa ich efektywność terapeutyczną [47, 49].

W ciągu ostatniej dekady, wraz z rozwojem technik rozdzielczych w czasie, pojawiły się również prace dotyczące analizy dyssypacji energii w cząsteczkach fotouczulaczy zachodzącej na skutek oddziaływań z promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu UV-NIR tak w roztworach, jak i w fazie skondensowanej [54-56]. Prace te jednoznacznie potwierdzają, iż zastosowanie spektroskopii femtosekundowej może przyczynić się do lepszego zrozumienia zagadnień dotyczących fotostabilności układów biologicznych i mechanizmów relaksacji energii w komórkach żywych. Szczegółowa analiza mechanizmów oddziaływań międzycząsteczkowych na granicy faz fotouczulacz-tkanki piersi ludzkiej zostanie przedstawiona w rozdziale: Spektroskopia UV-Vis, spektroskopia femtosekundowa na granicy faz fotouczulacz-komórki ludzkiego gruczołu piersiowego.

## 2. CEL I ZAKRES BADAŃ

1. Podstawowym celem podjętych badań było wykazanie, że zmiany nowotworowe ludzkiego gruczołu piersiowego mogą być identyfikowane metodami spektroskopii wibracyjnej, takimi jak spektroskopia Ramana i spektroskopia IR. W badaniach skoncentrowano się przede wszystkim na:
  - wykazaniu użyteczności spektroskopii Ramana, obrazowania Ramana, spektroskopii IR w identyfikacji zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego,
  - wskazaniu klas związków, które mogą być wykorzystywane jako markery zmian nowotworowych w technikach opartych na spektroskopii Ramana i IR,
  - oszacowaniu czułości i swoistości spektroskopii Ramana, a tym samym oszacowaniu wiarygodności zastosowanej metody spektroskopowej,
  - analizie własności wibracyjnych podstawowych składników budulcowych komórek takich jak: lipidy, DNA, woda.
2. Następnym zadaniem badawczym było dokonanie analizy własności wibracyjnych i emisyjnych fotouczulaczy stosowanych w terapii PDT na przykładzie wybranych metalofalocyjanin: cynku, glinu, magnezu i aluminium z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, obrazowania Ramana, spektroskopii IR oraz spektroskopii femtosekundowej. Badania obejmowały:
  - wykazanie potencjału ftałocyjanin jako fotouczulaczy w diagnostyce zmian nowotworowych na podstawie badań spektroskopowych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, IR, UV-Vis,
  - wyjaśnienie mechanizmów dyssypacji energii wibracyjnej i elektronowej wybranych ftałocyjanin, w kontekście ich użyteczności w terapii PDT,
  - analizę własności wibracyjnych filmów ftałocyjanin w warunkach kontrolowanej wilgotności na przykładzie ftałocyjaniny glinu.
3. Kolejnym celem badań było wyjaśnienie mechanizmów oddziaływań międzycząsteczkowych na granicy faz fotouczulacz-tkanki piersi z wykorzystaniem rozdzielczych w czasie metod spektroskopii laserowej.

Materiał niniejszej rozprawy został opublikowany w 13 pracach, 12 z nich ukazało się czasopismach z listy JCR.

### **3. PRZEDMIOTY BADAŃ**

#### **3.1. Tkanki ludzkiego gruczołu piersiowego**

Z wykorzystaniem spektroskopii Ramana przebadano preparaty ludzkiego gruczołu piersiowego pochodzące od 110 pacjentów Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Mikołaja Kopernika w Łodzi.

Przedmiotem prowadzonych badań były preparaty *ex-vivo* ludzkiego gruczołu piersiowego w postaci wycinków śródoperacyjnych umieszczonych w ampułkach oraz w postaci preparatów histologicznych o grubości 2-10  $\mu\text{m}$  umieszczonych na różnych podłożach: szkiełkach mikroskopowych lub okienkach wykonanych z  $\text{BaF}_2$ . Wybór podłoża był uzależniony od rodzaju metody spektroskopowej stosowanej w analizie próbek.

Materiał biologiczny był pozyskiwany od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową gruczołu piersiowego leczonych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. Mikołaja Kopernika w Łodzi.

Analiza histopatologiczna preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego była wykonywana przez patologów z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Katedry Onkologii, Zakładu Patomorfologii kierowanego przez prof. dr hab. n. med. Radziśława Kordka.

Analizie były poddawane tkanki pobrane z masy nowotworu oraz tkanki o budowie prawidłowej pozyskane z marginesu bezpieczeństwa usuwanego podczas operacji. Pozyskiwanie preparatów do badań spektroskopowych w żaden sposób nie wpływało na procedury operacyjne, jak i pooperacyjny proces leczenia pacjentów.

Po pobraniu próbek preparaty były przewożone do Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej Politechniki Łódzkiej w hermetycznych ampułkach lub w przypadku preparatów histologicznych w specjalnie przystosowanych do przewozu pojemnikach, które zabezpieczały materiał biologiczny przed uszkodzeniami mechanicznymi. Preparaty były przewożone w styropianowym pojemniku, w niskiej temperaturze utrzymywanej poprzez zastosowanie suchego lodu lub schłodzonych wkładów żelowych. W LLSM preparaty przechowywano w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ . Bezpośrednio przed pomiarem tkanki były przechowywane w temperaturze około  $-5^\circ\text{C}$ .

Preparaty w postaci wycinków śródoperacyjnych, do analizy z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, były umieszczane przez histopatologów w ampułkach wykonanych ze szkła, które, jak wykazano eksperymentalnie, nie zakłócało rejestrowanych widm poprzez wkład własny, czyli były spektroskopowo przezroczyste.

Preparaty przygotowane na szkiełkach mikroskopowych, do analizy z wykorzystaniem obrazowania Ramana lub spektroskopii IR, miały postać tkanki nieutralnej, niewybarwionej, przygotowanej poprzez cięcie na mikrotomie zamrożonego materiału biologicznego, czyli była stosowana technika kriogeniczna. Tkanka nieutralana i niebarwiona, wykorzystywana w badaniach z zastosowaniem spektroskopii IR, była umieszczana na szkiełkach wykonanych z BaF<sub>2</sub>; to samo podłoże stosowano przygotowując preparaty do badań z wykorzystaniem laserowej spektroskopii femtosekundowej. Wybór BaF<sub>2</sub> był podyktowany własnościami tego materiału, czyli wysoką transmitancją w szerokim zakresie spektralnym.

Preparaty do badań metodami spektroskopii Ramana i IR były przygotowywane metodą kriogeniczną (bez utrwalania i wybarwiania) w celu wyeliminowania wpływu parafiny oraz środków utrwalających stosowanych w procedurze przygotowywania typowych preparatów histopatologicznych na widma wibracyjne analizowanych tkanek. Metoda kriogenicznego przygotowywania preparatów pozwoliła także na uniknięcie procesu deparafinizacji, który, jak potwierdzono eksperymentalnie, wpływa na zawartość takich komponentów tkanek jak lipidy czy woda, które pozwalają na odróżnianie tkanek o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo.

Część próbek ludzkiego gruczołu piersiowego nasączano roztworami ftalocyjanin celem przeanalizowania sposobu oddziaływania fotouczulaczy z tkankami piersi o budowie prawidłowej i zmienionymi nowotworowo. Analizę oddziaływań fotouczulaczy z tkanką prowadzono dla wycinków śródoperacyjnych oraz preparatów o grubości 2-10 μm przygotowanych metodą kriogeniczną na podłożu z BaF<sub>2</sub>.

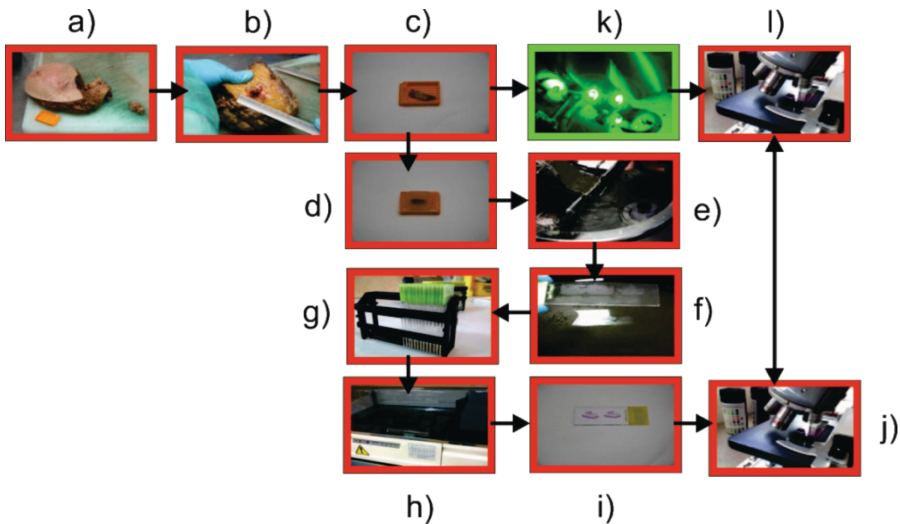
Badania tkanek nowotworowych objęły analizę zmian łagodnych, jak i złośliwych o różnym stopniu rozwoju zmian patologicznych. Materiał biologiczny po wykonaniu badań spektroskopowych był poddawany analizie histopatologicznej w celu zdiagnozowania jednostki chorobowej oraz porównania otrzymanego wyniku z diagnozą wydaną na podstawie analizy materiału pozyskanego od tego samego pacjenta na potrzeby diagnostyki szpitalnej. Porównanie wyników badania histopatologicznego materiału przebadanego w LLSM i w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. Mikołaja Kopernika w Łodzi posłużyło do wyznaczenia czułości i swoistości spektroskopii Ramana w analizie zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego.

Po wykonaniu analizy spektroskopowej preparaty gruczołu piersiowego były utylizowane przez Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika w Łodzi.



W oparciu o wyniki badań histopatologicznych stworzono w LLSM bazę pacjentów zawierającą takie dane jak: wiek pacjenta, rodzaj choroby nowotworowej, stopień złośliwości nowotworu, stopień zaawansowania choroby w oparciu o klasyfikację TNM (baza nie zawierała żadnych danych osobowych).

Procedurę analizy preparatów gruczołu piersiowego w LLSM i Katedrze Onkologii, Zakładzie Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przedstawiono na schemacie 1. Po usunięciu fragmentu piersi lub mastektomii a), guz piersi był charakteryzowany makroskopowo poprzez podanie: wymiarów, kształtu, konsystencji, koloru, kwadrantu piersi, z którego został pobrany, odległości od węzłów chłonnych, umiejscowienia względem skóry, podścieliska oraz mięśni b), następnie preparat cięty był na 2 cm fragmenty c), które służyły do wykonania bloczków parafinowych d), bloczki były następnie cięte z wykorzystaniem mikrotomu e), a warstwy tkanki umieszczane były na szkiełkach mikroskopowych f, g), preparaty na szkiełkach były następnie barwione h) oraz poddawane procesowi deparafinizacji i), ostatni krok analizy obejmował diagnozę histopatologiczną na podstawie obrazu mikroskopowego j), analizie histopatologicznej poddawane były również preparaty analizowane w LLSM k), a wyniki uzyskane na potrzeby diagnostyki szpitalnej j) oraz badań spektroskopowych l) były porównywane.



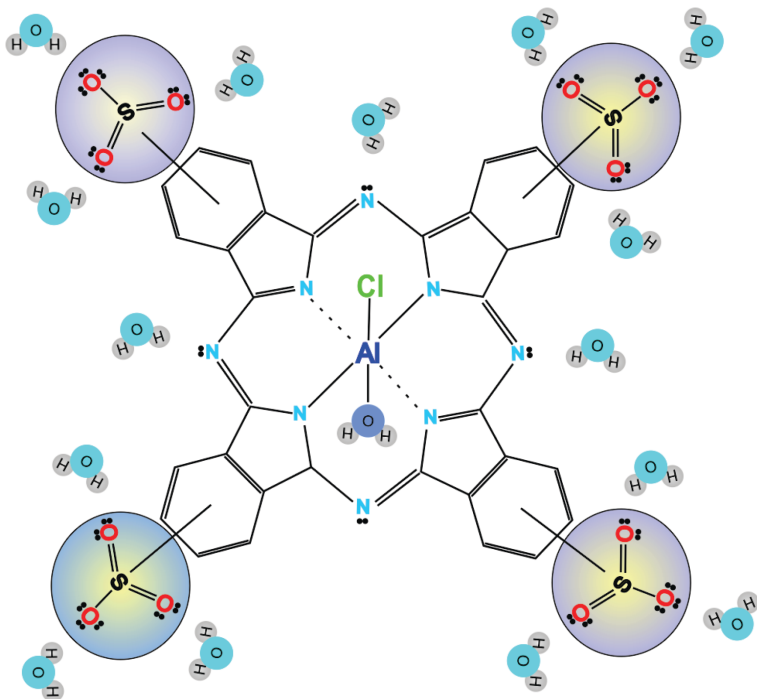
**Schemat 1.** Procedura analizy wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego stosowana w LLSM PŁ oraz Katedrze Onkologii, Zakładzie Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, tłem czerwonym oznaczono etapy przygotowywania preparatów i ich analizy wykonywane w Katedrze Onkologii, Zakładzie Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kolorem zielonym oznaczono etap analizy spektroskopowej wykonywanej w LLSM PŁ

Badania były wykonywane za zgodą Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, decyzja nr RNN/30/11/KE/15/02/2011.

### **Ftalocyjaniny**

Analiza własności wibracyjnych i emisyjnych ftalocyjanin, potencjalnych fotouczulaczy w terapii PDT, objęła sole czterosodowe tetrasulfonowanych ftalocyjanin: cynku, magnezu, miedzi i aluminium oraz tetrasulfonowaną ftalocyjaninę aluminium w postaci kwasu. Ftalocyjaniny przebadano w roztworach wodnych oraz w roztworach DMSO. Ftalocyjaniny pochodziły z Sigma-Aldrich, Frontier Scientific lub były syntezowane we współpracy z Instytutem Barwników i Polimerów Politechniki Łódzkiej – grupą kierowaną przez prof. dr hab. inż. W. Czajkowskiego. Wybór ftalocyjanin: cynku, magnezu, miedzi i aluminium był podyktowany chęcią określenia wpływu jonu centralnego na własności fotochemiczne przedstawicieli tej klasy związków. Zainteresowanie roztworami wodnymi wynikało z możliwości ich bezpośredniego stosowania w terapii PDT, natomiast analiza roztworów w DMSO wynikała z odmiennego wpływu tego rozpuszczalnika na stopień agregacji badanych ftalocyjanin w porównaniu do H<sub>2</sub>O. Wykonano analizę widm absorpcyjnych ftalocyjanin w szerokim zakresie stężeń od 10<sup>-7</sup> do 10<sup>-2</sup> M w wodzie oraz DMSO, dla stężeń 10<sup>-5</sup> oraz 10<sup>-3</sup> M w H<sub>2</sub>O i DMSO wykonano pomiary z wykorzystaniem niskotemperaturowej spektroskopii Ramana w zakresie temperatur 293-77 K. Roztwory tetrasulfonowanej ftalocyjaniny: cynku, miedzi oraz magnezu w wodzie o stężeniu 10<sup>-5</sup> M przebadano z wykorzystaniem spektroskopii femtosekundowej metodą wiązki pompującej i sondującej. Spektroskopię femtosekundową wykorzystano także w analizie filmów kwasu tetrasulfonowanej ftalocyjaniny glinu, wytworzonych na podłożu z komórek ludzkiego gruczołu piersiowego prawidłowych i zmienionych nowotworowo, osadzonych na BaF<sub>2</sub>. Filmy ftalocyjaniny glinu, wytworzone na podłożu z azotu krzemu, przebadano z wykorzystaniem spektroskopii IR w funkcji wilgotności.

Przeanalizowano także widma emisyjne próbek ftalocyjanin odpowietrzonych, jak i zawierających tlen w celu oszacowania wpływu tlenu na kształt widm i tym samym wnioskowania o wpływie utlenowania komórek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo na mechanizmy dyssypacji energii, a tym samym, na efektywność działania fotouczulacza w terapii PDT. Schemat 2 przedstawia tetrasulfonowaną ftalocyjaninę glinu w roztworze wodnym.



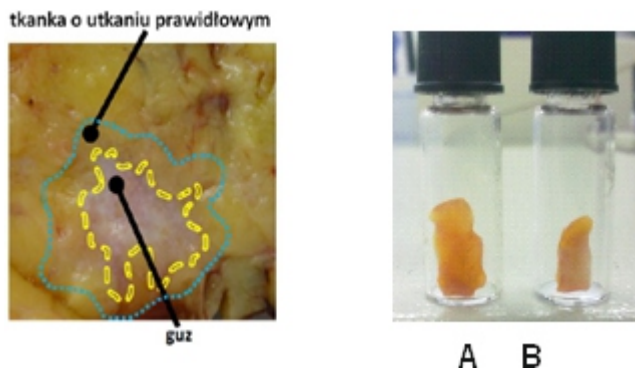
Schemat 2. Tetrasulfonowana ftalocyjanina glinu ( $AlPcS_4$ ) w roztworze wodnym

## 4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

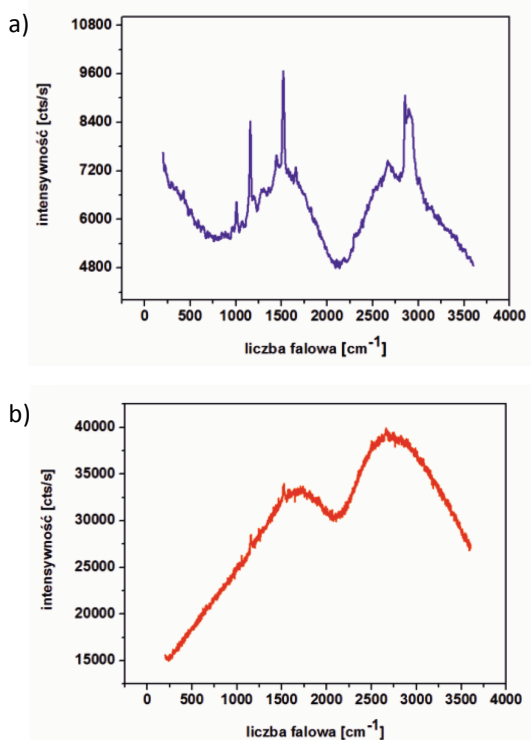
### 4.1. Spektroskopia Ramana preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego

Pierwszym typem preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego, jakie przebadano z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, były próbki tkanek piersi ludzkiej w postaci wycinków śródoperacyjnych. Rysunek 1 przedstawia: zdjęcie ludzkiego gruczołu piersiowego z uwidoczną zmianą nowotworową oraz oznaczeniem miejsc, z których pobrano preparaty tkanek o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo oraz preparaty piersi ludzkiej o budowie prawidłowej A) oraz nowotworowej B) umieszczone w ampułkach, przygotowane do analizy spektroskopowej.

Rysunek 2 przedstawia widma Ramana tkanki o utkaniu prawidłowym oraz zmienionej nowotworowo – rak przewodowy naciekający (IDC, łac. *carcinoma ductale infiltrans mammae*) pobranych od tego samego pacjenta (KT 26) [57].

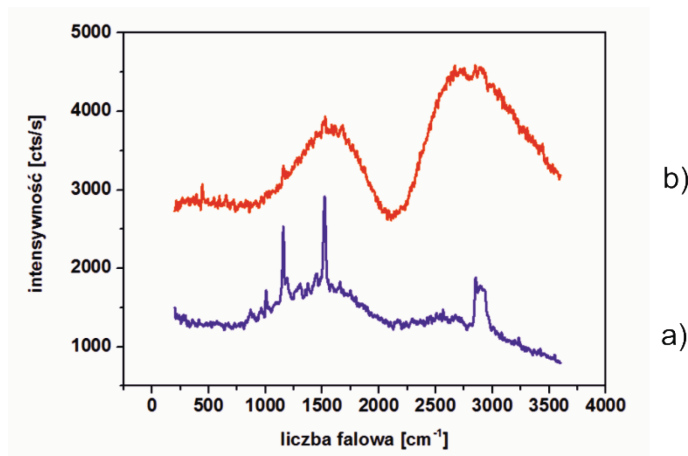


**Rysunek 1.** Ludzki gruczoł piersiowy z uwidoczną zmianą nowotworową oraz oznaczeniem miejsc, z których pobrano preparaty tkanek o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo; preparaty piersi ludzkiej o budowie prawidłowej A oraz nowotworowej B przygotowane do analizy spektroskopowej (źródło: materiały własne LLSM)



**Rysunek 2.** Widma Ramana: (a) tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) tkanki zmienionej nowotworowo – rak przewodowy naciekający (IDC, lac. carcinoma ductale infiltrans mammae), pobranej od tego samego pacjenta (KT 26) [57]

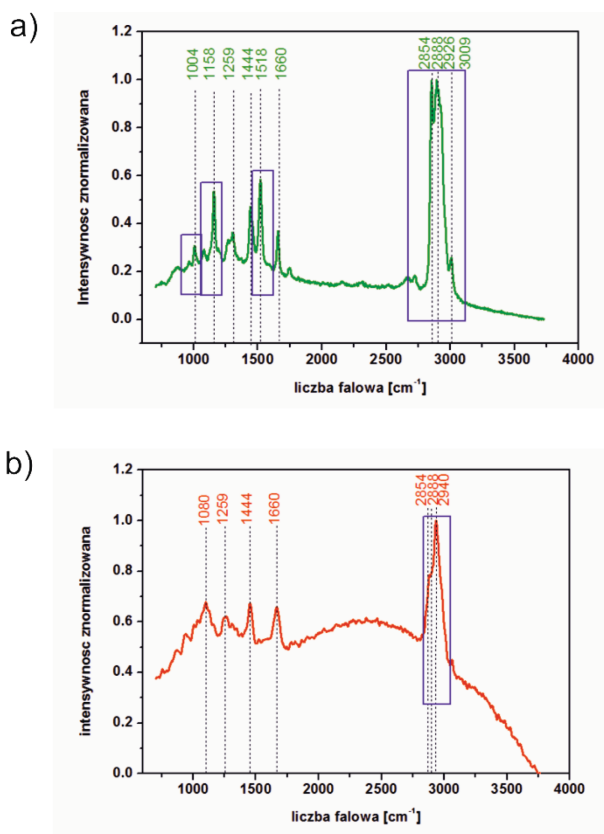
Porównanie widm na rysunkach 2a oraz 2b pozwala zauważyć, że najważniejsze różnice między tkanką zdrową a zmienioną chorobowo widoczne są dla drgań z zakresu  $1000\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ . Pasma  $1004$ ,  $1158$  oraz  $1518\text{ cm}^{-1}$  widoczne na widmie tkanki o budowie prawidłowej przypisano drganiom karotenoidów, zaś pasma z zakresu  $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  przypisano lipidom [57]. Znaczące różnice między tkanką o utkaniu prawidłowym a zmienioną nowotworowo, jak widać na rysunku 2, dotyczą także intensywności autofluorescencji badanych tkanek. Tkanka nowotworowa wykazywała znacznie wyższy poziom fluorescencji dla większości przebadanych przypadków. Nawet gdy autofluorescencja obu typów tkanek była porównywalna, był to przypadek typowy dla łagodnych zmian nowotworowych, silne pasma karotenoidów i lipidów były widoczne jedynie dla tkanek o budowie prawidłowej. Rysunek 3 przedstawia porównanie widm Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej (a) oraz łagodnej zmiany nowotworowej – dysplazji (*lac. dysplasia benigna mammae*) (b), pobranych od tego samego pacjenta (KT 38) [57].



**Rysunek 3.** Widma Ramana: (a) tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) łagodnej zmiany nowotworowej – dysplazji (*lac. dysplasia benigna mammae*), pobranej od tego samego pacjenta (KT 38) [57]

Analiza widm przedstawionych na rysunku 3 pozwala zauważyć, że autofluorescencja tkanki, w przypadku łagodnej zmiany nowotworowej gruczołu piersiowego jest porównywalna z autofluorescencją tkanki o budowie prawidłowej, mimo to pasma charakterystyczne dla karotenoidów i lipidów są widoczne jedynie dla tkanki o utkaniu prawidłowym [57].

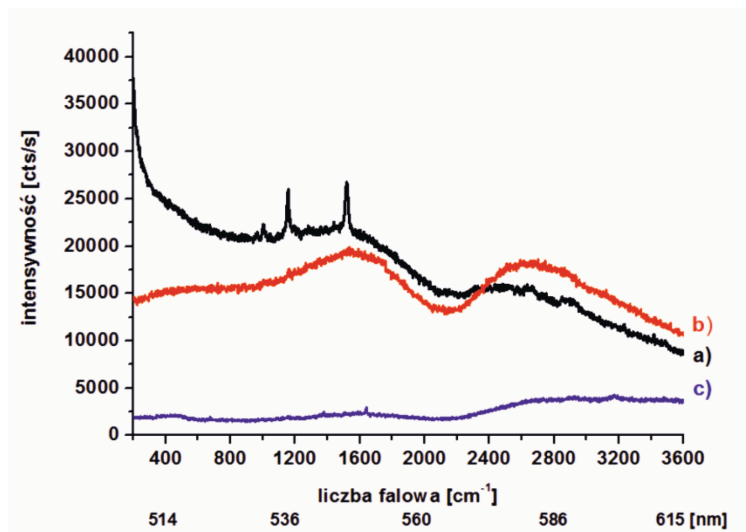
Podobne spostrzeżenia dotyczyły także innych pacjentów, preparaty których, np. w postaci próbek o grubości 6  $\mu\text{m}$ , przeanalizowano z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Rysunek 4 przedstawia widma Ramana tkanki o utkaniu prawidłowym i tkanki zmienionej nowotworowo, raka przewodowego naciekającego, IDC (*lac. carcinoma ductale infiltrans mammae*) pochodzących od tego samego pacjenta, P80 [58]. Pasma różnicujące tkankę o budowie prawidłowej od tkanki nowotworowej wyróżniono kolorowymi znacznikami.



**Rysunek 4.** Widma Ramana: (a) tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) tkanki zmienionej nowotworowo – rak przewodowy naciekający (*lac. carcinoma ductale infiltrans mammae*), pobranej od tego samego pacjenta P80 [58]

Jak widać na rysunku 4 ponownie największe różnice w budowie tkanki prawidłowej i zmienionej nowotworowo występują dla zakresów spektralnych charakterystycznych dla karotenoidów i lipidów [58].

Spostrzeżenia dotyczące intensywności autofluorescencji obu rodzajów tkanek mogą rodzić jednak pytanie, czy pasma karotenoidów i lipidów są widoczne dla preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego o utkaniu prawidłowym, ponieważ są typowe tylko dla struktur zdrowych, czy też wysoka fluorescencja, szczególnie charakterystyczna dla złośliwych komórek nowotworowych powoduje przesłonięcie tych pasm i dlatego nie są one obserwowane w widmach Ramana guzów piersi. Odpowiedzi na to pytanie dostarcza porównanie widm tkanki prawidłowej i zmienionej patologicznie dla przypadku, w którym oba typy tkanek cechuje relatywnie wysoka autofluorescencja rzędu kilkudziesięciu tysięcy zliczeń. Jak widać na rysunku 5 przedstawiającym widma zarejestrowane dla pacjenta KT01 pasma karotenoidów i lipidów ponownie widoczne są jedynie dla tkanki o budowie prawidłowej a) i nie obserwuje się ich dla tkanki nowotworowej b) [57].



**Rysunek 5.** Widma Ramana: (a) tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) tkanki nowotworowej – raka przewodowego naciekającego (łac. carcinoma ductale infiltrans mammae), (c) krwi obwodowej, pobranej od tego samego pacjenta (KT 01) [57]

Kształt widma tkanki zmienionej nowotworowo, przedstawiony na rysunku 5, może sugerować znaczący wpływ krwi zawartej w tkance na zarejestrowane widmo Ramana. Szerokie pasma z maksimum przy 540 i 560 nm widoczne dla widm tkanki zdrowej, a szczególnie zmienionej nowotworowo rzeczywiście należy powiązać z obecnością krwi w badanym preparacie, pasma te odpowiadają

bowiem pasmom, jakie zarejestrowano dla krwi obwodowej pacjenta KT01, widmo której przedstawiono na rysunku 5c.

Ponieważ jednym z czynników różnicujących tkankę o budowie prawidłowej od zmienionej nowotworowo jest intensywność autofluorescencji, należy odpowiedzieć także na pytanie, jakie czynniki mogą wpływać na wysoki poziom autofluorescencji tkanek o budowie patologicznej.

Jak wykazano, wysoka autofluorescencja tkanki nowotworowej może być powodowana m.in. wyższym stężeniem barwników zwanych lipofuscynami w tym typie tkanek. Lipofuscyny odkładają się wewnątrzlizosomalnie w komórkach postmitotycznych i stanowią główne produkty peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych i lipoprotein, peroksydacji pozostającej w ścisłej korelacji ze zmianami nowotworowymi zachodzącymi w organizmie człowieka [58, 59].

Na zawartość karotenoidów w komórkach nowotworowych wpływ mogą mieć zaś produkty formowane w drodze stresu oksydacyjnego. Ponadlenki powstające w wyniku stresu mogą być redukowane przez metale przejściowe lub inne reduktory (np. chinony) do bardziej agresywnych form rodników, które mogą powodować w komórce rozległe uszkodzenia [60]. Wzrost stężenia rodników chinonowych zwykle dobrze koreluje ze spadkiem zawartości karotenoidów w układach biologicznych.

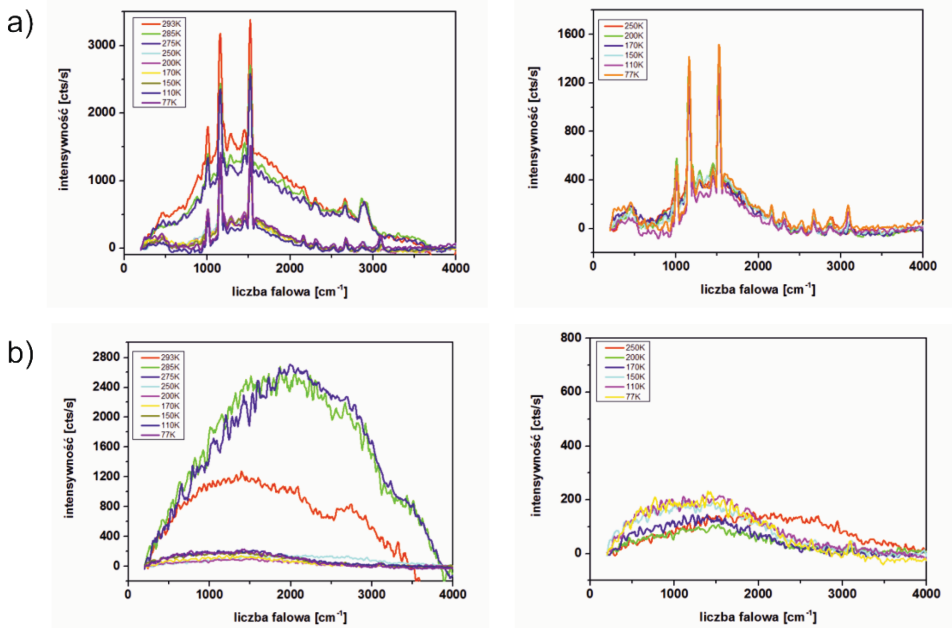
Drastyczna zmiana zawartości lipidów w badanych próbkach może wynikać zaś z bardzo efektywnego utleniania lipidów w komórkach nowotworowych, prowadzącego do tworzenia produktów wolnorodnikowej lub enzymatycznej peroksydacji tej grupy związków [58].

Rola karotenoidów i lipidów w różnicowaniu tkanki zdrowej od zmienionej patologicznie została potwierdzona także przez zastosowanie pomiarów z wykorzystaniem niskotemperaturowej spektroskopii Ramana. Jak widać na rysunku 6 zastosowanie niskotemperaturowej spektroskopii Ramana niesprężonej z mikroskopem konfokalnym pozwoliło potwierdzić, że brak pasm przypisanych karotenoidom i lipidom w tkance nowotworowej jest jej cechą charakterystyczną, a autofluorescencja tkanki nowotworowej nie przesłania pasm charakterystycznych dla tych klas związków [61].

Podsumowując, badania z wykorzystaniem spektroskopii Ramana niesprężonej z mikroskopem konfokalnym dla wycinków śródoperacyjnych gruczołu piersiowego zwróciły uwagę na dominującą rolę karotenoidów i lipidów w różnicowaniu tkanki o budowie prawidłowej i nowotworowej [57, 58, 61], a badania przeprowadzone w LLSM pozwoliły szczególnie na uwydatnienie roli karotenoidów, które do tej pory nie były postrzegane jako wiarygodne markery nowotworowe [9].

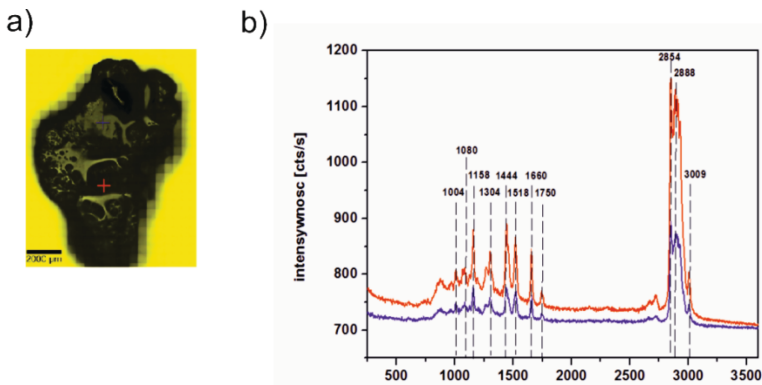
W analizie wycinków śródoperacyjnych wykorzystano także obrazowanie (mapowanie) Ramana.





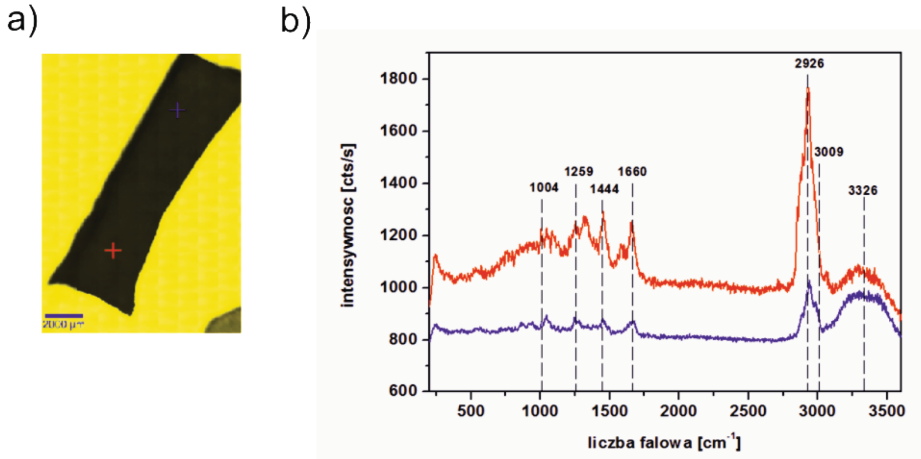
**Rysunek 6.** Widma Ramana: (a) tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) tkanki nowotworowej – raka przewodowego naciekającego (łac. carcinoma ductale infiltrans mammae) w zakresie temperatur 293-77 K dla tego samego pacjenta KT90

Rysunek 7 przedstawia widma Ramana tkanki o budowie prawidłowej zarejestrowane z wykorzystaniem techniki obrazowania (mapowania) Ramana [62].



**Rysunek 7.** Widma Ramana tkanki o budowie prawidłowej w postaci wycinka śródoperacyjnego zarejestrowane z wykorzystaniem techniki obrazowania Ramana: (a) obraz mikroskopowy tkanki o utkaniu prawidłowym, (b) widma Ramana zarejestrowane w miejscach oznaczonych krzyżykiem na obrazie mikroskopowym (a) dla pacjenta P33. Czas integracji 0,2 s [62]

Widma zarejestrowane dla tkanki nowotworowej pobranej od tego samego pacjenta, P33, przedstawia rysunek 8 [62].



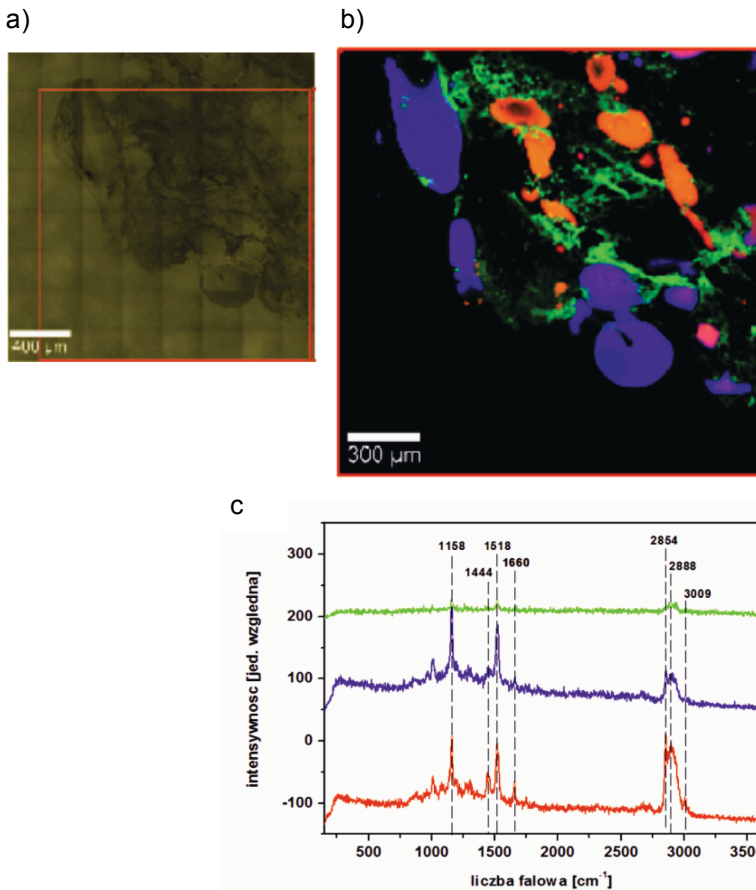
**Rysunek 8.** Widma Ramana tkanki o budowie nowotworowej w postaci wycinka śródoperacyjnego zarejestrowane z wykorzystaniem techniki obrazowania Ramana: (a) obraz mikroskopowy tkanki nowotworowej – rak przewodowy naciekający (łac. carcinoma ductale infiltrans mammae), (b) widma Ramana zarejestrowane w miejscach oznaczonych krzyżykiem na obrazie mikroskopowym (a) dla pacjenta P33. Czas integracji 0,5 s [62]

Jak widać na rysunkach 7 oraz 8 z zastosowaniem techniki obrazowania Ramana wykazano, że podobnie jak dla techniki spektroskopii Ramana niesprężonej z mikroskopem, dla wycinków śródoperacyjnych najistotniejsze różnice w budowie komórek prawidłowych i nowotworowych są widoczne dla pasm charakterystycznych dla karotenoidów i lipidów, czyli zakresów spektralnych odpowiednio:  $1000\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ .

Różnice w zastosowanych technikach pomiarowych, objawiające się m.in. odmiennym ogniskowaniem wiązki laserowej na próbce, pozwoliły jednak na uzyskanie z wykorzystaniem obrazowania Ramana bardziej szczegółowych informacji o składzie biochemicznym badanych preparatów.

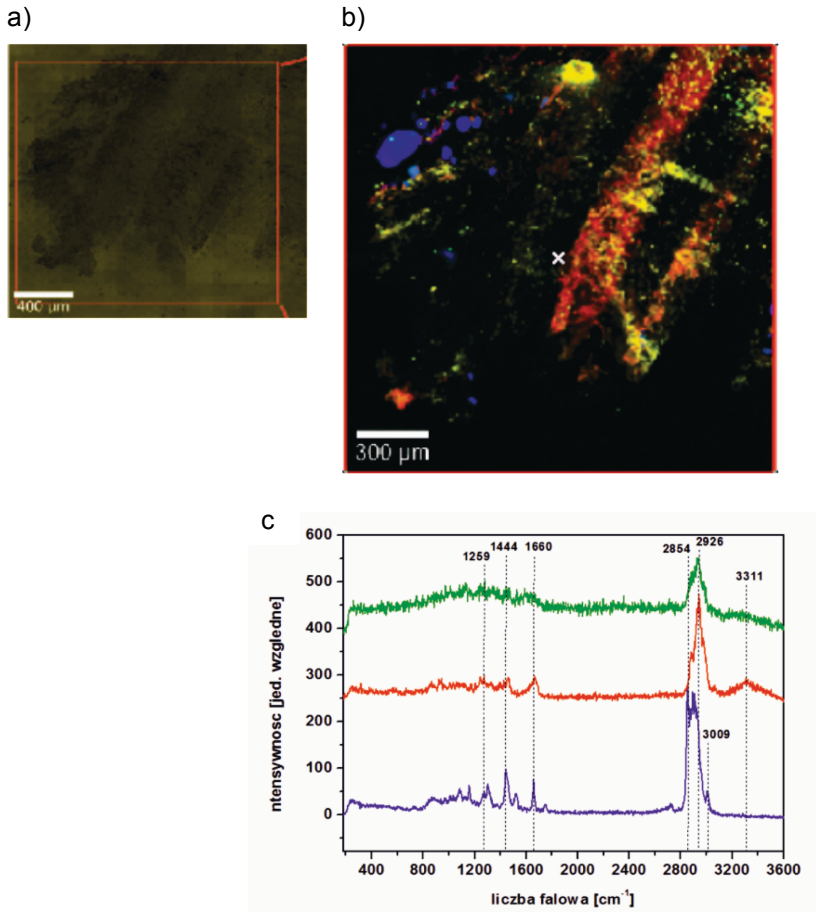
Obrazowanie, dzięki przekroczeniu limitu rozdzielczości wynikającego z dyfrakcji, pozwala bowiem na uzyskiwanie obrazów z rozdzielczością umożliwiającą obserwację pojedynczych organelli komórkowych. Rozdzielczość standardowo może osiągać wartości rzędu kilku mikrometrów. Zastosowanie obrazowania Ramana pozwoliło więc, przede wszystkim, na bardziej szczegółową analizę zakresu  $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  charakterystycznego dla lipidów oraz zwróciło uwagę na rolę obszaru spektralnego charakterystycznego dla drgań cząsteczek wody.

Analizę z zastosowaniem obrazowania Ramana wykonano również dla tkanek gruczołu piersiowego w postaci 6  $\mu\text{m}$  preparatów neutralnych i niebarwionych przygotowanych metodą kriogeniczną, umieszczonych na szkiełkach mikroskopowych. Wyniki uzyskane dla tkanki o budowie prawidłowej przedstawia rysunek 9 [62].



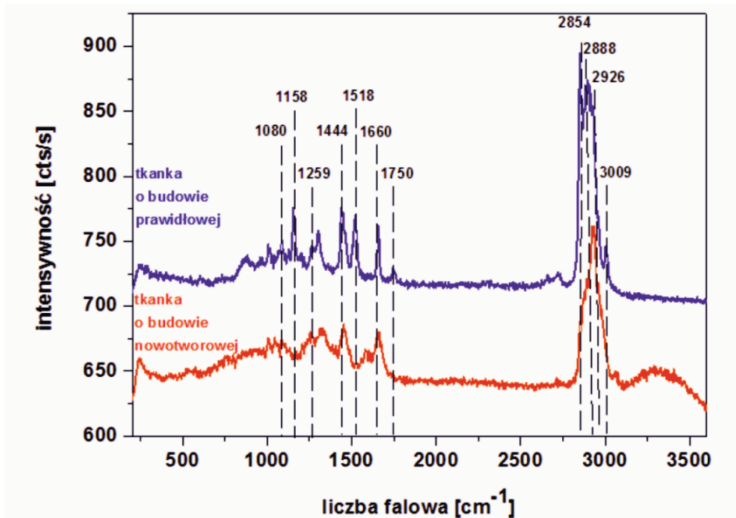
**Rysunek 9.** (a) Obraz mikroskopowy tkanki prawidłowej (2x2 mm), (b) obrazowanie Ramana obszaru zaznaczonego w części (a) czerwonym kwadratem (1.75x1.75 mm), (c) widma Ramana zarejestrowane dla obszarów o różnej barwie widocznych na obrazowaniu (b) dla próbki w postaci 6  $\mu\text{m}$  preparatów neutralnych i niebarwionych, umieszczonych na szkiełkach mikroskopowych dla tego samego pacjenta P33. Kolory widm odpowiadają kolorom obszarów widocznych na obrazowaniu b). Czas integracji 0,2 s [62]

Rysunek 10 ilustruje wyniki, jakie otrzymano techniką obrazowania Ramana dla tkanki o budowie nowotworowej pochodzącej od tego samego pacjenta, P33 [62].



**Rysunek 10.** (a) Obraz mikroskopowy tkanki nowotworowej (2x2 mm), (b) obrazowanie Ramana obszaru zaznaczonego w części (a) czerwonym kwadratem (1.75x1.75 mm), (c) widma Ramana zarejestrowane dla obszarów o różnej barwie widocznych na obrazowaniu (b) dla próbki w postaci 6 µm preparatów nieutralnych i niebarwionych, umieszczonych na szkiełkach mikroskopowych dla tego samego pacjenta P33. Kolory widm odpowiadają kolorom obszarów widocznych na obrazowaniu b). Czas integracji 0,2 s [62]

Rysunek 11 przedstawia porównanie widm otrzymanych techniką mapowania Ramana dla tkanek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo pochodzących od samego pacjenta jak na rysunkach 8 oraz 9 (P33).



**Rysunek 11.** Porównanie widm Ramana tkanki o utkaniu prawidłowym (linia niebieska) oraz zmienionej nowotworowo (linia czerwona) dla tego samego pacjenta (P33) otrzymanych metodą obrazowania Ramana [62]

Pasma przy 1444, 1660, 1750, 2854, 2888, 2926  $\text{cm}^{-1}$  widoczne na rysunku 11 przypisano lipidom. Pasma przy 2854 i 2926  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadają bowiem symetrycznym i antysymetrycznym drganiom rozciągającym grup  $\text{CH}_2$  łańcuchów węglowodorowych lipidów. Pasma przy 1660  $\text{cm}^{-1}$  i 3009  $\text{cm}^{-1}$  przypisano odpowiednio: drganiom grupy  $\text{C}=\text{C}$  oraz grupy  $\text{C}-\text{H}$  połączonej z grupą  $\text{C}=\text{C}$  lipidów. Sygnał przy częstotliwości 1444  $\text{cm}^{-1}$  przyporządkowano drganiom nożycowym grupy  $\text{CH}_2$ , zaś pasmo przy 1750  $\text{cm}^{-1}$  zinterpretowano jako częstość charakterystyczną dla grupy  $\text{C}=\text{O}$  [62-64]. Pasma przy 1004, 1158 oraz 1518  $\text{cm}^{-1}$  przypisano karotenoidom [62-64].

Jak widać na rysunku 11 badania, które wykonano z wykorzystaniem obrazowania Ramana dla preparatów o grubości 6  $\mu\text{m}$  po raz kolejny potwierdziły dominującą rolę lipidów i karotenoidów w odróżnieniu tkanek o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo; porównanie widma Ramana tkanek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo wskazało także na większą zawartość lipidów w tkance zdrowej. Jak widać na rysunkach 9 oraz 10 tkanka o budowie prawidłowej zawiera więcej komórek tłuszczowych, oznaczonych w obrazowaniu kolorem niebieskim, niż tkanka nowotworowa [62].

W grupie lipidów, jak wykaże dalsza część rozprawy, szczególną rolę w różnicowaniu tkanki piersi o budowie prawidłowej od zmienionej nowotworowo odgrywają niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe określane także mianem wielonienasyconych niezbędnych kwasów tłuszczowych (WNKT, ang. *polyunsaturated*

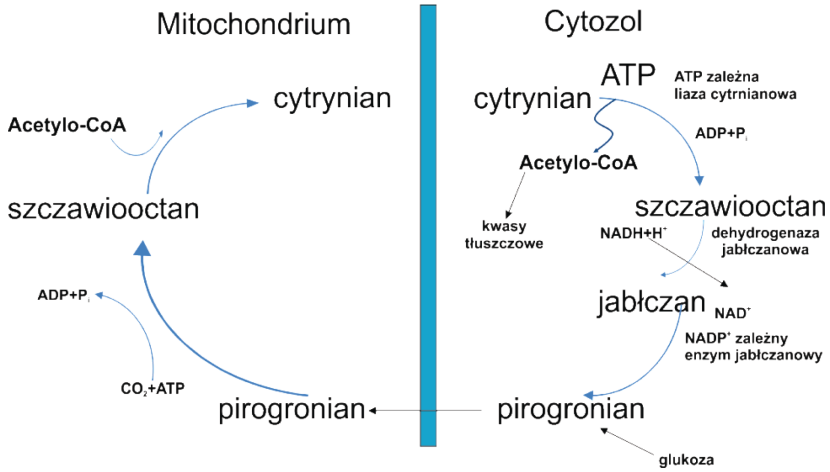
*fatty acids, PUFA*). Kwasy te nie mogą być syntezowane przez organizm człowieka i muszą być dostarczane w diecie [58, 65].

Pierwsze dane zwracające uwagę na wpływ diety na rozwój chorób nowotworowych pojawiły się już na początku XX w., kiedy choroby nowotworowe obok chorób układu krążenia zaczęły dominować, jako najważniejsze przyczyny przedwczesnej śmiertelności. Williams w roku 1908 w rozprawie naukowej poświęconej rakowi donosił o istotnym wpływie sposobu odżywiania na rozwój chorób nowotworowych. Od tego czasu szeroko prowadzone były badania dotyczące zależności zapadalności na choroby nowotworowe i stosowanej diety. Obecnie uważa się, że około 35-45% zachorowań na chorobę nowotworową, zwłaszcza w krajach dobrze rozwiniętych, związanych jest ze źle zbilansowanym odżywianiem [66], a tłuszcz zawarty w diecie i tworzące go kwasy tłuszczowe zalicza się do głównych czynników wzrostu ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych piersi, okrężnicy i prostaty [67].

Największą uwagę w kontekście rozwoju chorób nowotworowych poświęcono, w prezentowanych badaniach, rodzinom kwasów  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6.

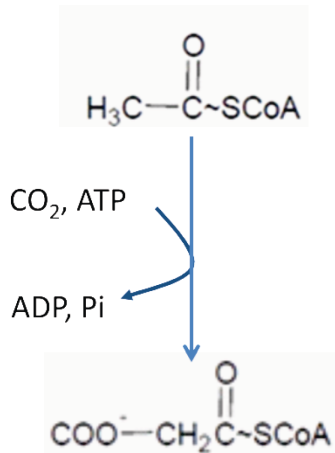
Część kwasów tłuszczowych może być syntezowana w organizmie człowieka, a pierwotnym substratem do syntezy kwasów tłuszczowych jest wówczas acetylo-CoA pochodzący z przemian węglowodanów i białek, zaś jej końcowym produktem jest kwas palmitynowy (C 16:0 – (ilość atomów węgla: ilość wiązań podwójnych)), który może być wydłużany do kwasu stearynowego (C18:0), i dalej do kwasów 20-, 22- i 24-węglowych [65]. Synteza kwasów tłuszczowych odbywa się w wątrobie, nerkach, mózgu, płucach, gruczole sutkowym oraz tkance tłuszczowej, a kondensacja jednostek dwuwęglowych w postaci acetylo-CoA nie jest odwróceniem ciągu reakcji, prowadzących do rozkładu tych związków.

Do syntezy kwasów tłuszczowych są wykorzystywane kofaktory NADPH, ATP,  $Mn^{2+}$ , biotyna oraz  $HCO_3^-$ . Intermediaty są kowalencyjnie związane z grupą hydrosulfidową białkowego nośnika grup acylowych (ACP - ang. *acyl carrier protein*). Główny substrat potrzebny do przeprowadzenia syntezy, czyli acetylo-CoA, powstaje w wyniku katabolizmu glukozy przy pomocy dehydrogenazy pirogronianowej lub w wyniku  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. Następnie acetylo-CoA jest przenoszony z mitochondriów do cytozolu. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla acetylo-CoA, ulega więc on kondensacji ze szczawiooctanem. Powstaje cytrynian, który dość łatwo przenika przez błonę. W cytozolu cytrynian ulega rozkładowi, co umożliwia odtworzenie acetylo-CoA. Przeniesienie acetylo-CoA z matryks mitochondrialnej do cytozolu przedstawiono na rysunku 12 [68].



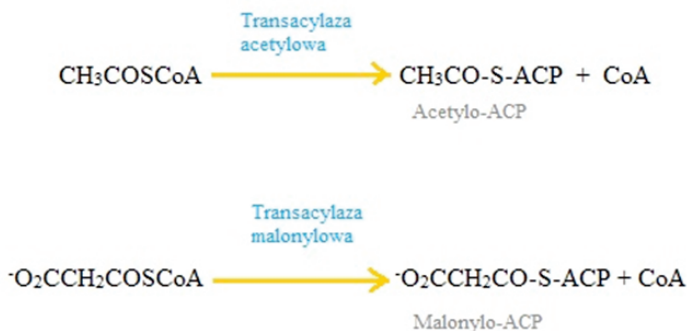
**Rysunek 12.** Przeniesienie acetylo-CoA z matryks mitochondrialnej do cytozolu

Bardzo istotny wkład w wyjaśnienie procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych wniósł S. Wakil, który potwierdził konieczność występowania w tym procesie wodorowęglanów [68]. Istotnie pierwszym kluczowym etapem biosyntezy kwasów tłuszczowych jest karboksylacja acetylo-CoA, która prowadzi do powstania malonylo-CoA. Reakcja ta katalizowana jest przez karboksylazę acetylo-CoA, enzym zawierający biotynę jako grupę prostetyczną (rys. 13). Enzym ten jest białkiem zawierającym zmienną liczbę identycznych podjednostek, w której występują: biotyna, karboksylaza biotyny, białko nośnikowe karboksybiotyny, transkarboksylazy oraz allosteryczne miejsca regulatorowe [68].



**Rysunek 13.** Tworzenie malonylo-CoA

Acetylo-CoA i malonylo-CoA zostają następnie przekształcone w ich ACP-pochodne (rys. 14).

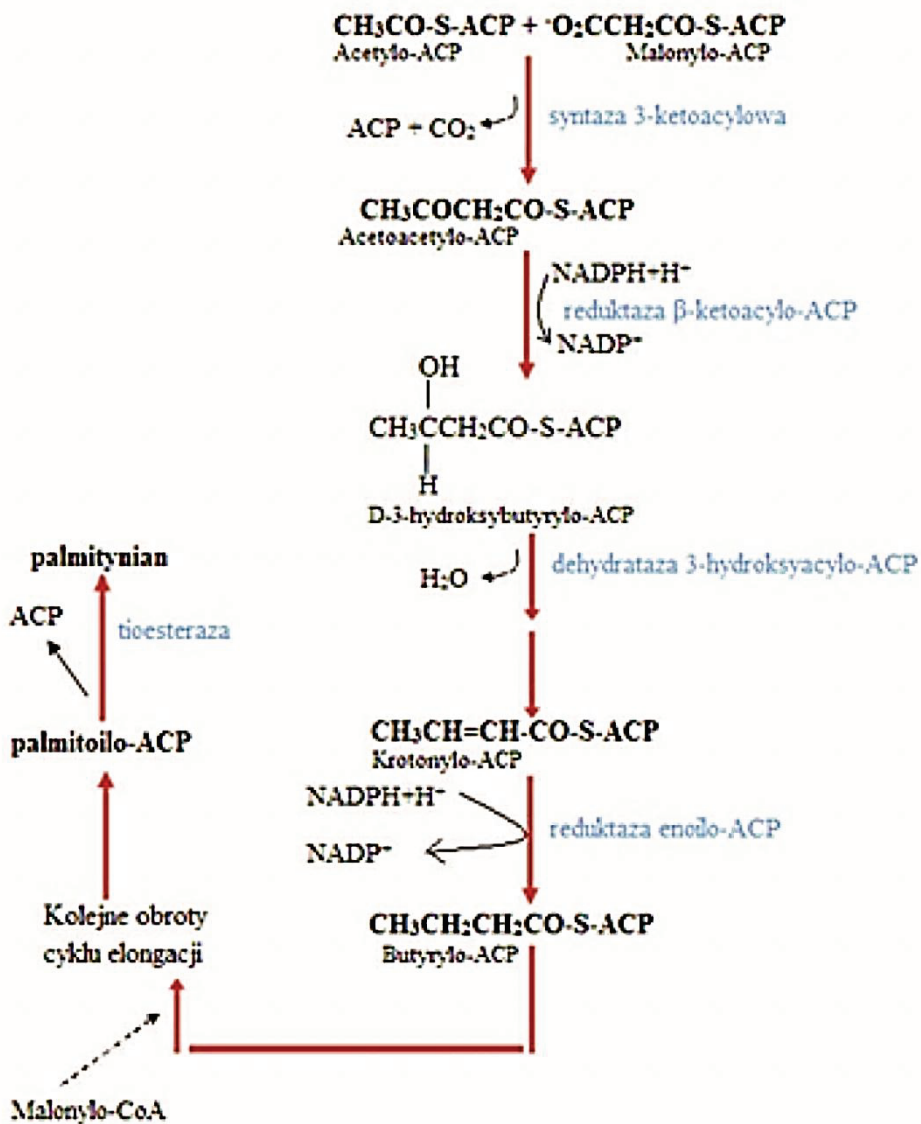


**Rysunek 14.** Rola białka przenoszącego acyl (ACP)

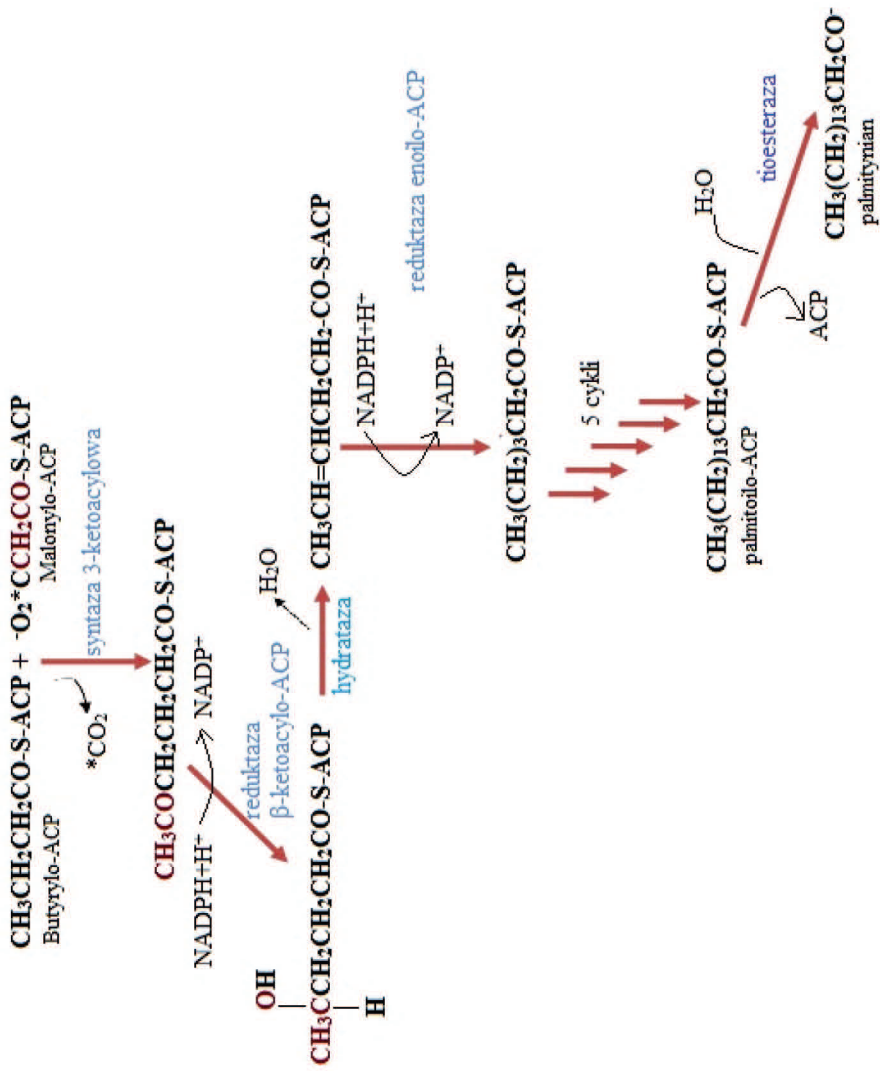
Acetylo-ACP oraz malonylo-ACP następnie kondensują tworząc acetoacetylo-ACP, wykorzystując enzym-syntazę 3-ketoacylową. Reakcja ta jest napędzana przez uwalnianie  $\text{CO}_2$  z aktywowanej jednostki malonylowej. Następnie zachodzą procesy redukcji (redukcja acetoacetylo-ACP do D-3-hydroksybutyrylo-ACP, w którym czynnikiem redukującym jest NADPH, a katalizatorem jest reduktaza  $\beta$ -ketoacylo-ACP), dehydratacji (dehydratacja D-3-hydroksybutyrylo-ACP do krotonylo-ACP, w której katalizatorem jest dehydrataza 3-hydroksyacylo-ACP) oraz kolejnej redukcji (redukcja krotonylo-ACP do butyrylo-ACP, w której reduktorem jest NADPH, a katalizatorem reduktaza enoilo-ACP) (rys. 15). Uzyskany w ten sposób butyrylo-ACP wchodzi w cykl elongacji, który rozpoczyna się od dołączenia jednostki dwuwęglowej, pochodzącej z kolejnej cząsteczki malonylo-CoA.

Siedem cykli elongacji prowadzi ostatecznie do powstania palmitoilo-ACP. Związek ten hydrolizuje na palmitynian i ACP.





Rysunek 15. Biosynteza kwasów tłuszczowych



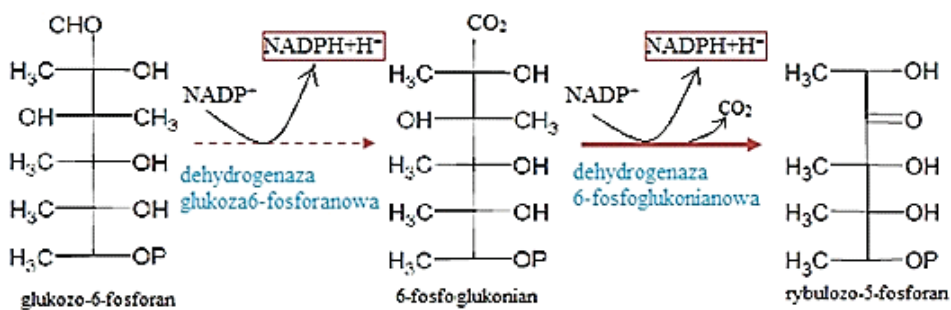
Rysunek 16. Synteza kwasów tłuszczowych-elongacja

Enzymy biorące udział w katalizowaniu syntezy kwasów tłuszczowych tworzą układ enzymatyczny nazywany syntezą kwasów tłuszczowych. Synteza palmitynianu wymaga 8 cząsteczek acetylo-CoA, 14 NADPH, 7 ATP i 7 HCO<sub>3</sub>, który odgrywa rolę katalityczną.

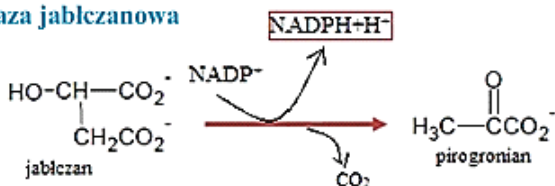
Dalsza elongacja kwasów tłuszczowych zachodzi na powierzchni cytoplazmatycznej gładkiego retikulum endoplazmatycznego.

NADPH niezbędny do biosyntezy pochodzi ze szlaku pentozofosforanowego albo z reakcji dekarboksylującej dehydrogenazy jabłczanowej (rys. 17).

### 1. Szlak pentozowy



### 2. Dehydrogenaza jabłczanowa



**Rysunek 17.** Źródła NADPH niezbędnego do biosyntezy kwasów tłuszczowych

Dla prawidłowego funkcjonowania organizmów, w tym dla prawidłowego funkcjonowania błon biologicznych niezbędne są jednak wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Kwasy te powstają z kwasu palmitynowego w wyniku działania odpowiednich desaturaz powodujących wprowadzenie podwójnego wiązania w strukturę kwasu. Z kwasu palmitynowego powstaje w ten sposób kwas palmitooleinowy (C16:1 ω-7), zaś ze stearynowego – kwas oleinowy (C18:1 ω-9).

W wyniku działania Δ12-desaturazy z kwasu oleinowego powstaje kwas linolowy (C18:2 ω-6, LA), przekształcany dalej przez Δ15-desaturazę do kwasu

$\alpha$ -linolenowego (C18:3  $\omega$ -3, ALA). W tkankach zwierzęcych podwójne wiązania mogą być jednak wprowadzone jedynie między istniejące już wiązanie podwójne a grupę karboksylową z powodu braku odpowiednich desaturaz. W tkankach zwierzęcych nie zachodzi więc synteza kwasów LA i ALA i muszą być one dostarczone w diecie [65].

LA i ALA dają początek rodzinom kwasów odpowiednio  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3. W wyniku enzymatycznej peroksydacji z LA w procesie desaturacji powstaje kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA), który jest wydłużany do kwasu dihomo- $\gamma$ -linolenowego (DGLA). Ten zaś jest konwertowany przez  $\Delta$ 5-desaturazę do kwasu arachidonowego (AA). Te same enzymy powodują przekształcenie kwasu ALA do kwasu eikozapentaenowego, z którego następnie powstaje kwas dekozaheksaenowy.

Kwas arachidonowy może być uwalniany także bezpośrednio z błon plazmatycznych przez fosfolipazę  $A_2$ .

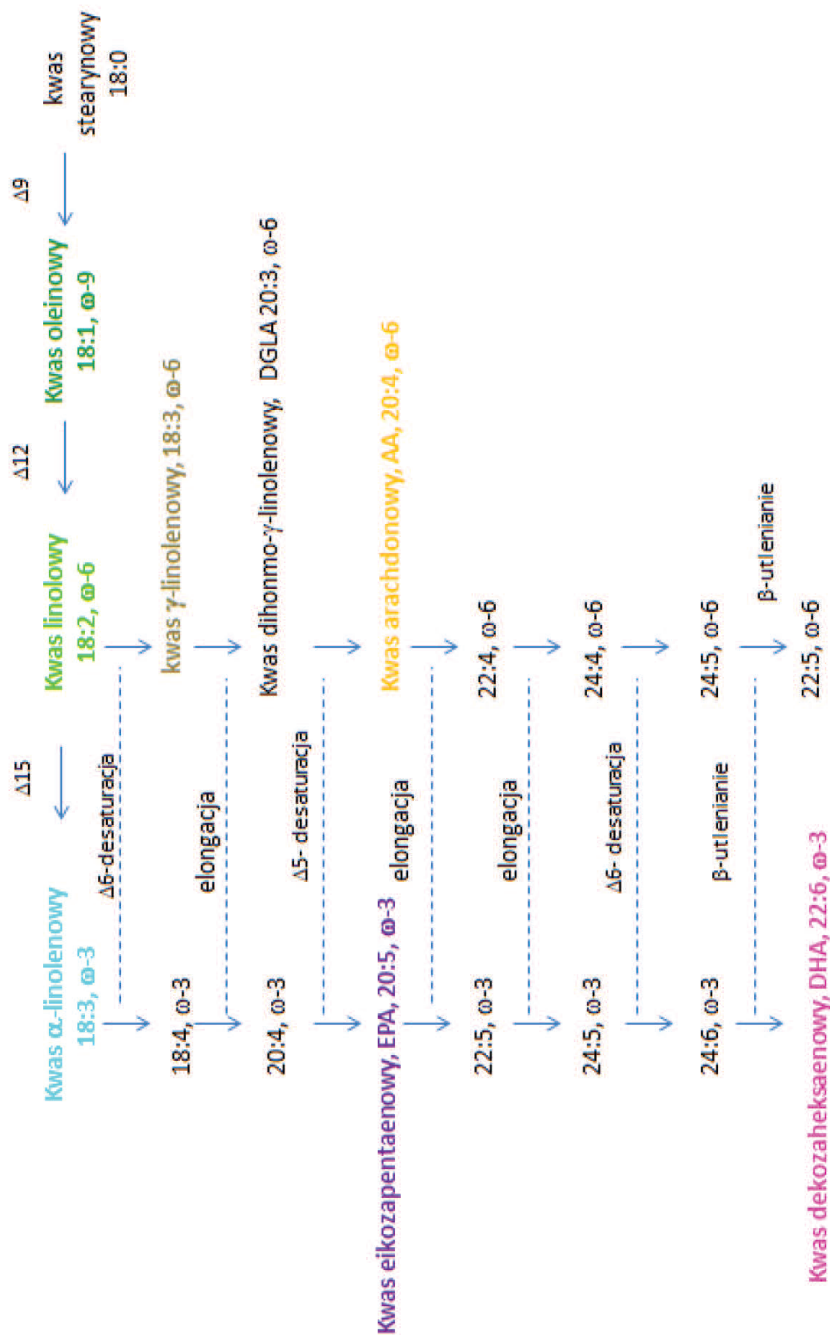
Kwas AA jest metabolizowany w organizmie ludzkim w trzech szlakach enzymatycznych: 1) szlaku cyklooksygenazy-1 (COX-1) lub cyklooksygenazy-2 (COX-2); 2) szlaku lipoksygenazy (LOX); 3) także cytochrom P-450 może służyć jako katalizator dla biotransformacji AA do różnych utlenionych metabolitów, włączając epoksydy i serię hydroksykwasów tłuszczowych.

Szczególne role AA wynika z faktu, iż eikozanoidy, których jest prekursorem, wykazują stymulującą rolę w rozwoju zmian miażdżycowych, tworzeniu zakrzepów, występowaniu silnych reakcji zapalnych i alergicznych, odgrywają one również dominującą rolę w procesie proliferacji komórek i rozroście tkanki nowotworowej, zwłaszcza w gruczole sutkowym, jelicie grubym i prostaty [67, 69]. Rysunek 18 przedstawia schemat przemian, jakim podlegają wielonienasycone kwasy tłuszczowe w organizmie człowieka.

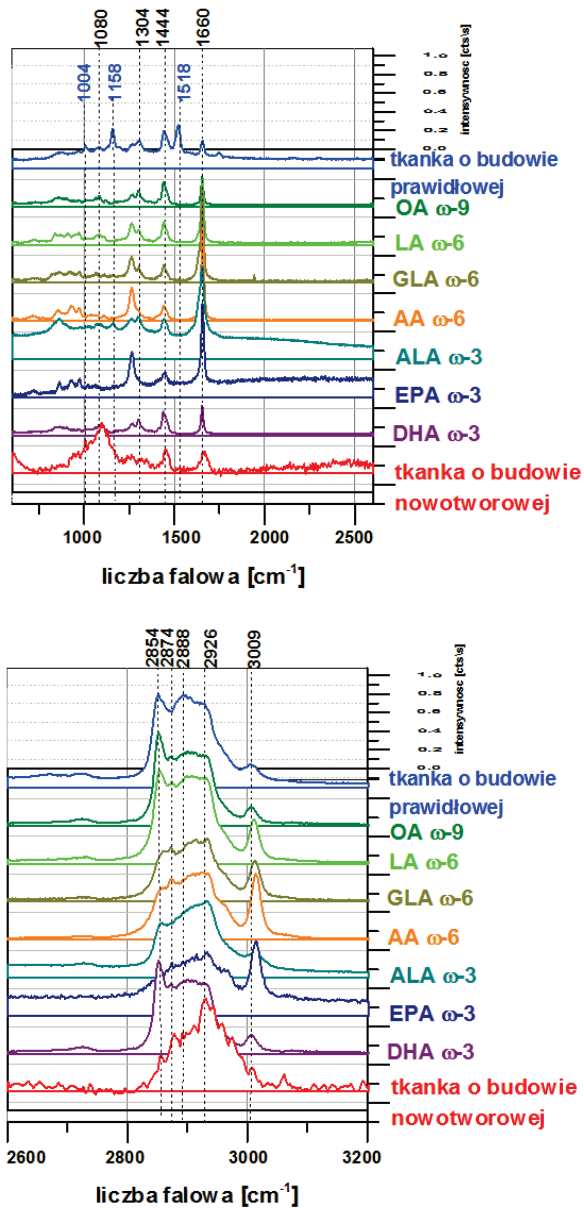
Jak widać na rysunku 18 kwasy  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 w szlaku metabolizmu konkurują o te same enzymy powodujące desaturację, elongację i oksydację.

Kluczowa rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu ludzkiego skłoniła do wykonania analizy porównawczej widm Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i zmienionego nowotworowo z widmami NNKT [58].

Porównanie widm Ramana tkanek piersi o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo z wybranymi przedstawicielami kwasów  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 przedstawia rysunek 19.



**Rysunek 18.** Schemat metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczonych w organizmie ludzkim [58]



**Rysunek 19.** Porównanie widm Ramana niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych z widmami Ramana gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i nowotworowej dla tego samego pacjenta P80: a) dla zakresu spektralnego  $200\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$  b) dla zakresu spektralnego  $2600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  [58]

Jak widać na rysunku 19 istnieje wyraźnie zauważalne podobieństwo widm Ramana gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej oraz widm Ramana kwasów: oleinowego (OA), linolowego (LA) i dekozaheksanowego (DHA). Rolę ochronną w rozwoju nowotworów kwasów oleinowego i linolowego udowodniono w badaniach klinicznych [70]. Zaskakujący wynik przyniosło porównanie widm Ramana w zakresie spektralnym  $2800-3100\text{ cm}^{-1}$  kwasu eikozapentaenowego (EPA) z widmem Ramana tkanki o utkaniu prawidłowym; mimo że EPA jest kwasem postrzeganym jako zmniejszający ryzyko choroby nowotworowej [71], widma Ramana tkanki zdrowej i kwasu nie wykazują idealnej zgodności.

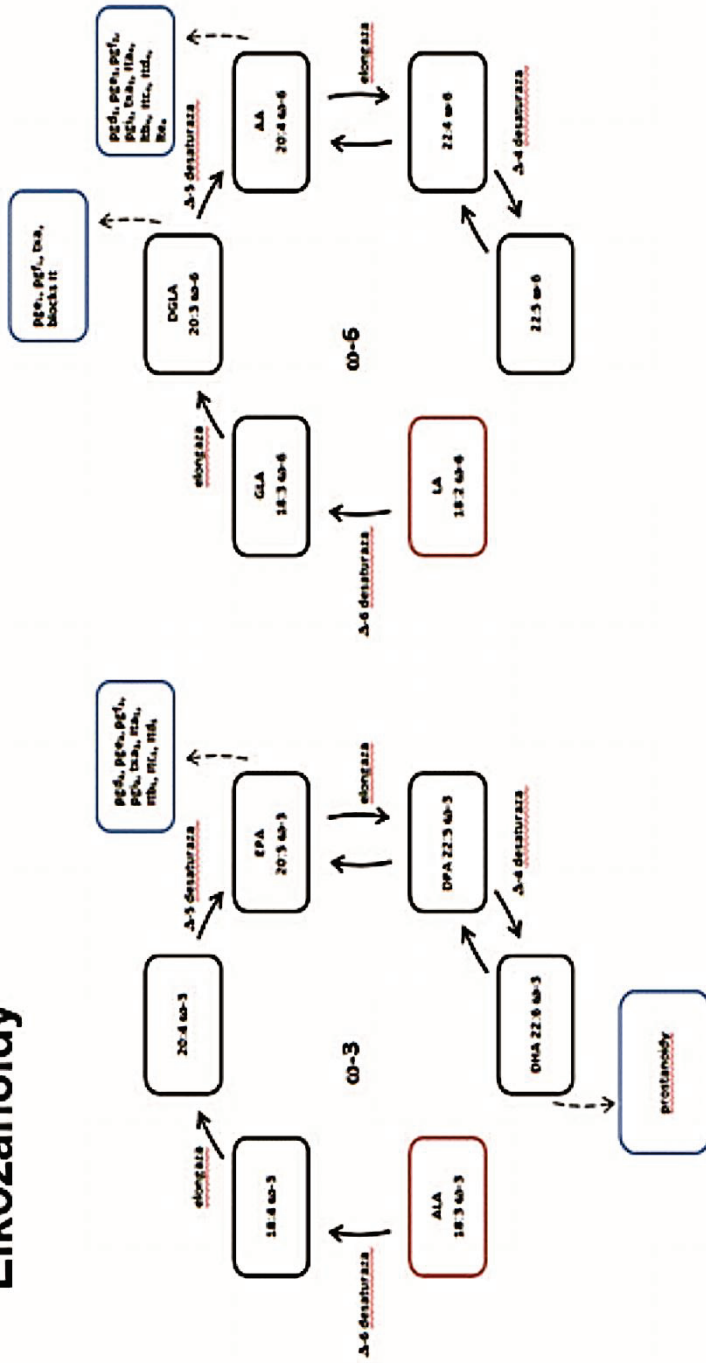
Jak widać na rysunku 19 widmo Ramana tkanki nowotworowej jest zaś dobrze odtwarzane przez widma kwasów  $\gamma$ -linolenowego (GLA) i arachidonowego (AA); spostrzeżenie to pozostaje w zgodzie z badaniami wykazującymi działanie pronowotworowe kwasów  $\omega$ -6 poprzez produkcję eikozanoidów, np. prostaglandyny  $E_2$ , której prekursorem jest AA [72-75].

W porównaniu widm kwasów  $\omega$ -6 z widmem Ramana tkanki nowotworowej szczególną uwagę zwraca pasmo  $3009\text{ cm}^{-1}$  charakterystyczne dla NNKT. Jak widać na rysunku 19 pasmo to nie cechuje jednak tak znacząca intensywność w widmach piersi ludzkiej, jak można by oczekiwać. Należy jednak pamiętać, że niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe podlegają w organizmie człowieka przemianom w szlaku COX-1, COX-2 oraz LOX, są prekursorami hormonów tkankowych i ich ilość w tkankach musi korelować z wydajnością generowania eikozanoidów.

Do eikozanoidów należą: prostaglandyny (PG), prostacykliny (PGI) i tromboksany (TX) określane wspólnie mianem prostanoidów oraz leukotrienów (LT). Prekursorami eikozanoidów są DGLA, AA i EPA. Pod wpływem cyklooksygenazy (COX) powstają związki cykliczne – PG, PGI i TX, natomiast lipoksygenazy katalizują syntezę związków niecyklicznych – LT, kwasów hydroperoksyeikozatetraenowego (HPETE) i hydroksyeikozatetraenowego (HETE). DGLA ulega przemianie do PG, PGI i TX monoenowych ( $PGE_1$ ,  $TXA_1$ ), AA-do związków dienowych ( $PGE_2$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$ ), a EPA – do trienowych ( $PGE_3$ ,  $PGI_3$ ,  $TXA_3$ ). AA jest również prekursorem leukotrienów  $A_4$ ,  $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$  i  $E_4$ , a EPA – leukotrienów  $A_5$ ,  $B_5$ ,  $C_5$ ,  $D_5$  i  $E_5$  [58, 65].

Typ, a także ilość syntezowanych eikozanoidów jest uzależniona nie tylko od dostępności prekursora, ale także aktywności fosfolipazy  $A_2$  i fosfolipazy C oraz cyklooksygenaz i lipoksygenaz. Jak wspomniano wcześniej najczęściej prekursorem eikozanoidów jest kwas arachidonowy. Eikozanoidy będące jego pochodnymi charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością biologiczną niż pochodne DGLA i EPA, nawet w bardzo małych ilościach [58, 65]. Schemat powstawania eikozanoidów w organizmie ludzkim przedstawia rysunek 20.

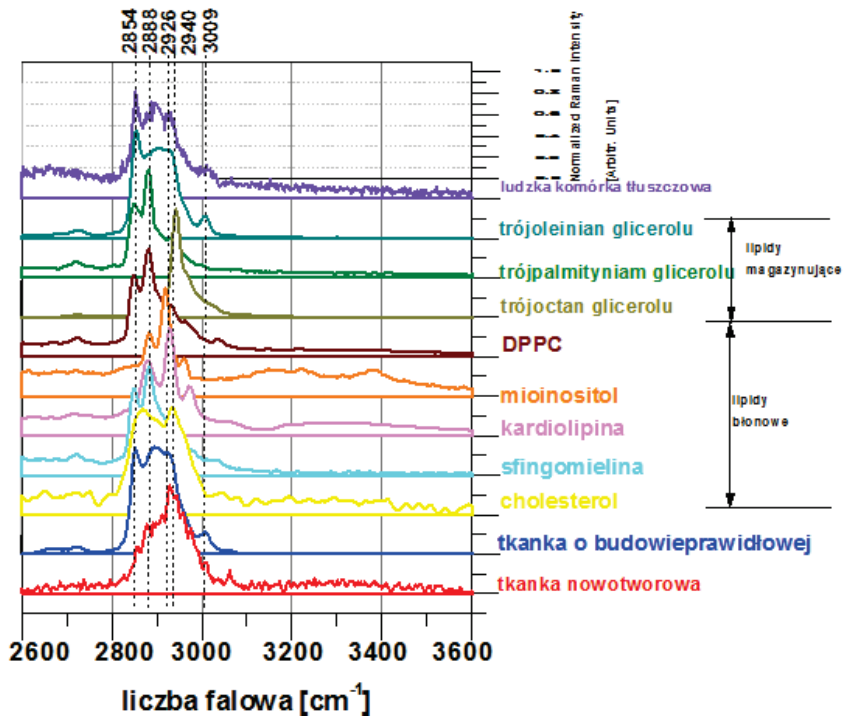
# Eikozanoidy



Rysunek 20. Drogi syntezy eikozanoidów [62]



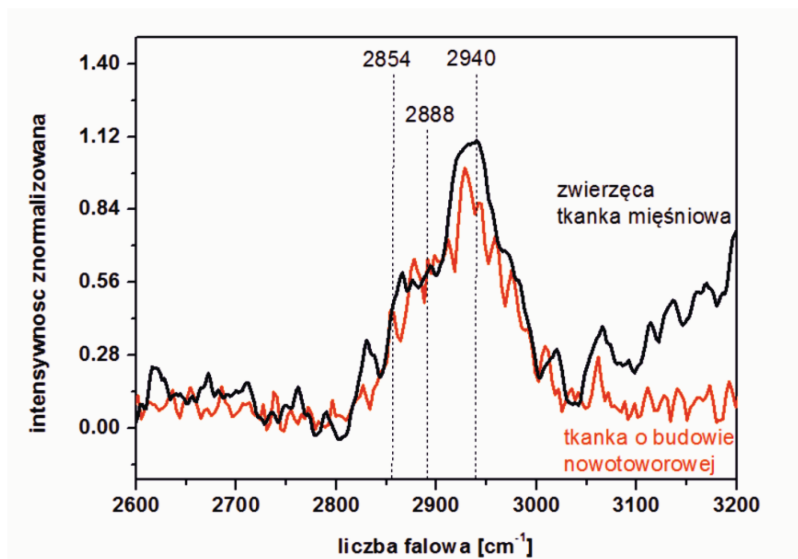
Ponieważ widma piersi ludzkiej zmienionej nowotworowo nie były idealnie odtwarzane przez kombinację widm WNKT, dokonano porównania widm gruczołu piersiowego z widmami takich składników organizmu ludzkiego jak: trójpodstawione pochodne glicerolu, D- $\alpha$ -fostatydylocholina, mioinositol, kardiolipina, sfingomielina, cholesterol. Wyniki porównania przedstawia rysunek 21.



**Rysunek 21.** Porównanie widm gruczołu piersiowego z trójpodstawionymi pochodnymi glicerolu, DPPC, mioinozolem, kardiolipiną, sfingomieliną, cholesterol

Ponieważ zakres spektralny 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczny dla widm ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie nowotworowej nadal nie był idealnie odtwarzany ani przez kombinacje widm kwasów  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 (rys.19), ani widma takich składników komórek jak: trójpodstawione pochodne glicerolu, D- $\alpha$ -fostatydylocholina, mioinositol, kardiolipina, sfingomielina, cholesterol (rys. 21),

zakres ten porównano z widmem Ramana zwierzęcej (świńskiej) tkanki mięśniowej zdominowanej przez białka. Rysunek 22 przedstawia porównanie widma Ramana białek zwierzęcych z widmem Ramana tkanki nowotworowej piersi ludzkiej [58].



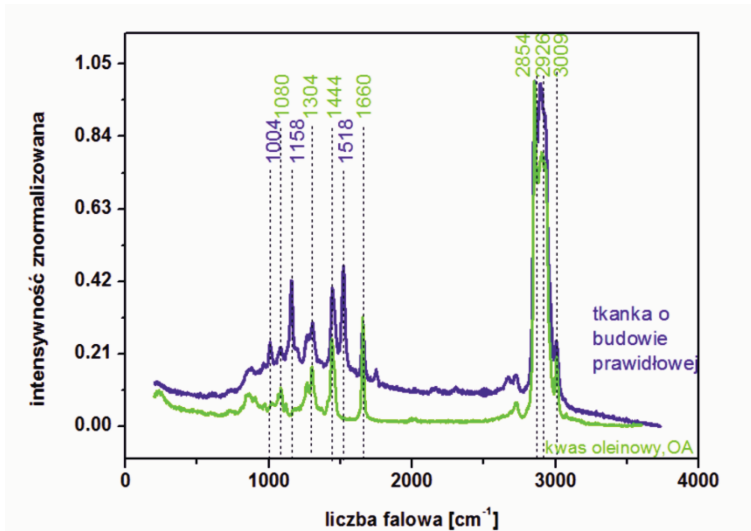
**Rysunek 22.** Porównanie widm Ramana białek z widmem Ramana tkanki nowotworowej [58]

Jak widać na rysunku 22 profil widma Ramana nowotworowej tkanki piersi ludzkiej jest bardzo dobrze odtwarzany przez widmo zwierzęcej tkanki mięśniowej zdominowanej przez białka. Spostrzeżenie to potwierdza wzrost udziału białek w tkankach nowotworowych w porównaniu z tkankami o budowie prawidłowej [58].

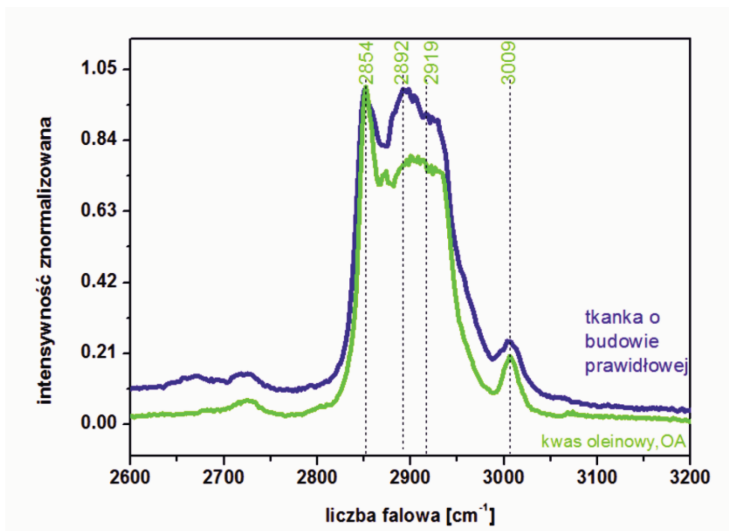
Widma Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej przedstawione na rysunku 19, zwróciły uwagę na dominującą rolę kwasu oleinowego w profilu lipidowym struktur zdrowych. Spostrzeżenie to skłoniło do przeprowadzenia szczegółowej analizy porównawczej dla tkanek piersi ludzkiej o budowie prawidłowej i kwasu oleinowego (OA).

Rysunek 23 przedstawia porównanie widm Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej z widmem Ramana kwasu oleinowego w zakresach spektralnych  $200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  [64].

a)



b)

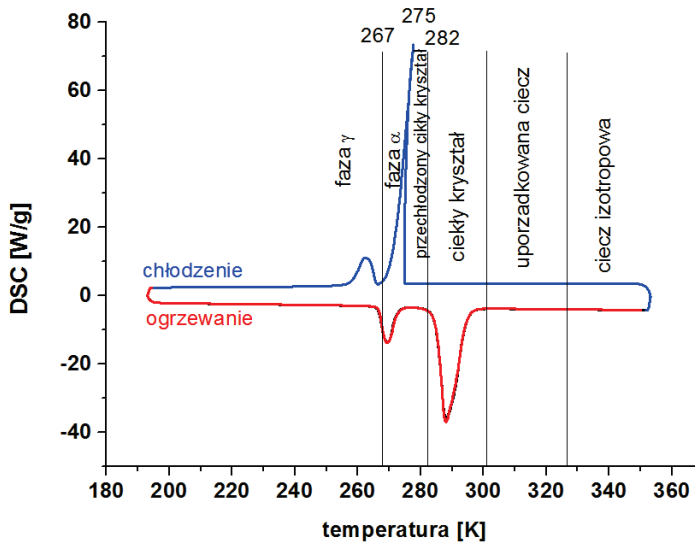


**Rysunek 23.** Porównanie widm Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej z widmem Ramana kwasu oleinowego w zakresach spektralnych: a) 200-4000  $\text{cm}^{-1}$  oraz b) 2600-3200  $\text{cm}^{-1}$  (OA) [64]

Jak widać na rysunku 23 widma Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i kwasu oleinowego w postaci czystej wykazują bardzo dużą zgodność spektralną.

Jak wykazano z wykorzystaniem różnych metod pomiarowych OA tworzy kwasismektyczną strukturę ciekłokrystaliczną w zakresie temperatur między 15 a 30°C. Struktura między 30 a 55°C składa się zaś z klasterów o mniej uporządkowanej strukturze. Powyżej 55°C kwas oleinowy przybiera postać izotropowej cieczy. Poniżej temperatury topienia kwas oleinowy tworzy trzy fazy:  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ . Fazy te zostały zidentyfikowane z wykorzystaniem technik: DSC, rentgenografii i technik spektroskopowych [76-82]. Jak wykazano, przejście między fazami  $\alpha$  i  $\gamma$  występuje w temperaturze  $-2.2^{\circ}\text{C}$  i odpowiada przejściu między fazą nieuporządkowaną i uporządkowaną. W fazie  $\alpha$  łańcuchy węglowodorowe po stronie grupy metylowej względem wiązania C=C wykazują strukturalne nieuporządkowanie, podczas gdy część przylegająca do grupy karboksylowej jest uporządkowana przestrzennie i charakteryzuje się konformacją *all-trans*. W fazie  $\gamma$  występuje większe uporządkowanie cząsteczek kwasu, w pseudoortorombowej komórce elementarnej występują zawsze cztery cząsteczki lub dwa połączone wiązaniami wodorowymi dimery [76, 77, 79, 80]. Faza  $\beta$  występuje zaś w dwóch odmianach: stabilnej  $\beta_1$  oraz niestabilnej  $\beta_2$ . Wygenerowanie fazy  $\beta$  jest trudne i w ramach prezentowanych badań nie zaobserwowano jej powstawania [76, 77, 79, 80].

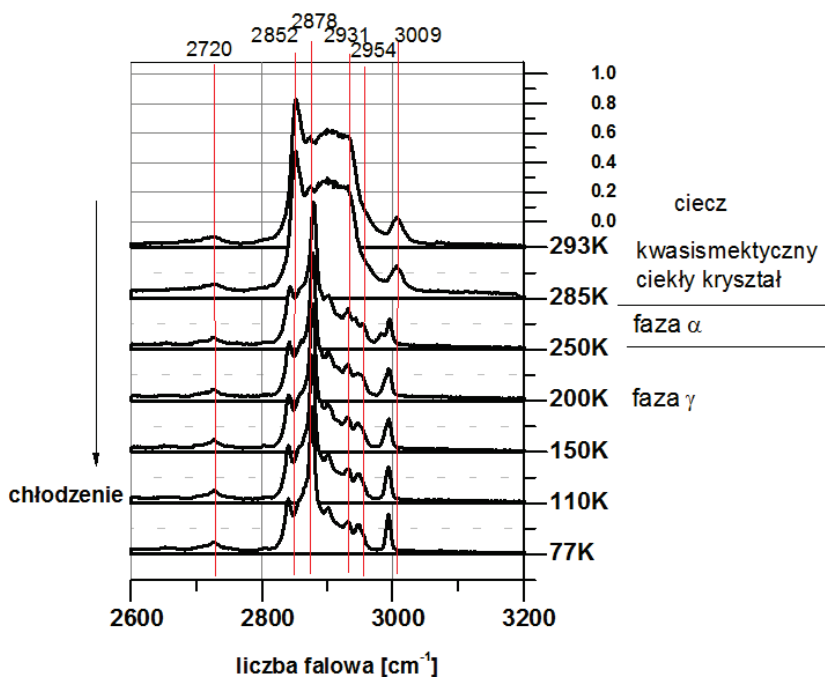
Rysunek 24 przedstawia termogramy kwasu oleinowego, jakie zarejestrowano z wykorzystaniem techniki DSC.



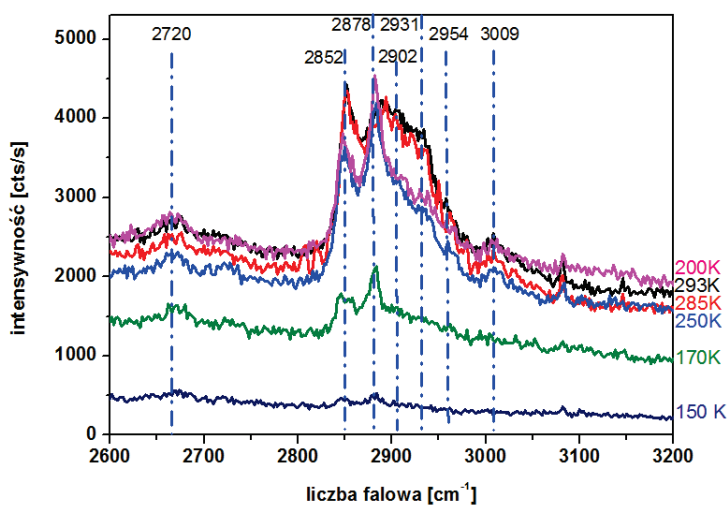
Rysunek 24. Termogram DSC kwasu oleinowego [64]

Jak widać na rysunku 24 technika DSC pozwoliła na zaobserwowanie m.in. przejścia fazowego  $\alpha \rightarrow \gamma$ , które zidentyfikowano także techniką niskotemperaturowej spektroskopii Ramana. By udowodnić, że kwas oleinowy jest dominującym składnikiem tłuszczowym występującym w tkankach zdrowych piersi ludzkiej zarejestrowano widma Ramana czystego kwasu oleinowego oraz tkanki o utkaniu prawidłowym w zakresie temperatur 293-77 K.

Rysunek 25 przedstawia widma Ramana czystego kwasu oleinowego w zakresie temperatur 293-77 K, zaś rysunek 26 widma Ramana tkanki o utkaniu prawidłowym w zakresie temperatur 293-150 K.



**Rysunek 25.** Widma Ramana kwasu oleinowego w postaci czystej, w zakresie temperatur 293-77 K [64]

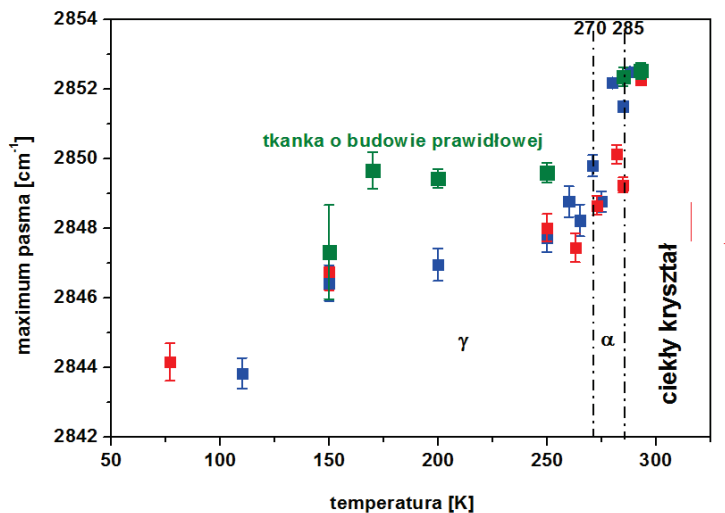


**Rysunek 26.** Widma Ramana ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej w zakresie temperatur 293-150 K [64]

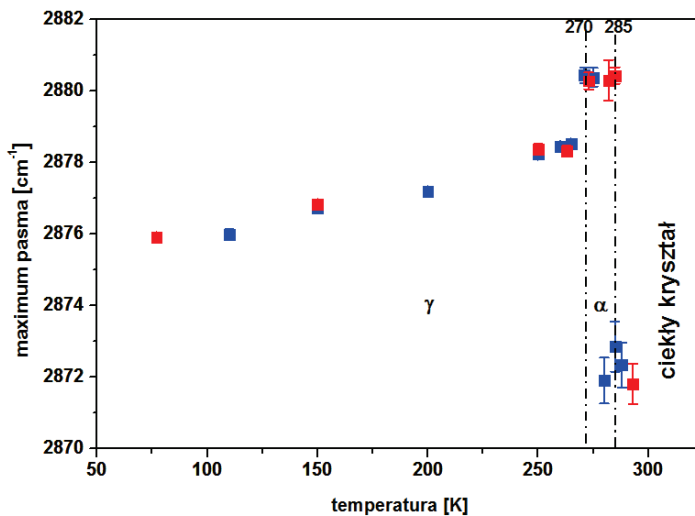
Rysunek 27 przedstawia zaś zależności zmian położenia maksimum pasm charakterystycznych dla drgań CH łańcuchów węglowodorowych kwasu oleinowego w postaci czystej i kwasu oleinowego zawartego w gruczole piersiowym o budowie prawidłowej [64].

Jak widać na rysunku 27 analiza niskotemperaturowych widm Ramana pozwoliła na identyfikację przejść fazowych charakterystycznych dla kwasu oleinowego. Temperaturę 285 K przypisano przejściu fazowemu między strukturą ciekłokrystaliczną a fazą  $\alpha$ , zaś temperatura 270 K odpowiada przejściu między fazami  $\alpha$  i  $\gamma$  charakterystycznymi dla OA. Jak widać z rysunku 27a takim samym zmianom podlega położenie pasma  $\nu_s(\text{CH}_2)$  obserwowanego dla czystego kwasu oleinowego i tkanki piersi o budowie prawidłowej [64]. Obserwacja ta potwierdza hipotezę, że kwas oleinowy jest głównym składnikiem komórek tłuszczowych typowych dla struktur prawidłowych gruczołu piersiowego.

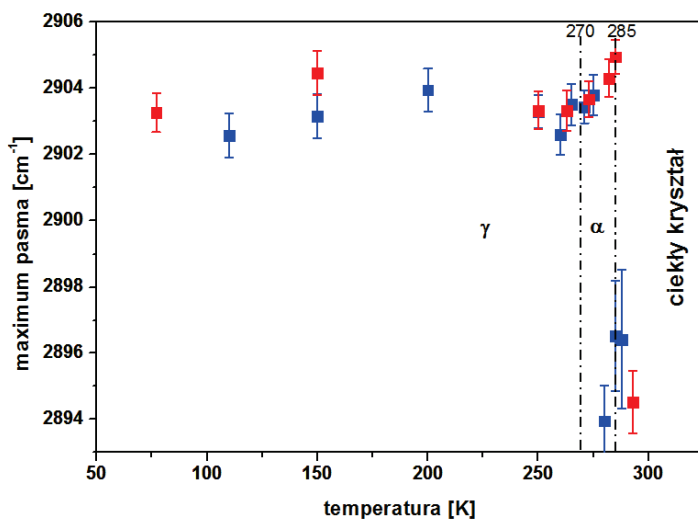
a)



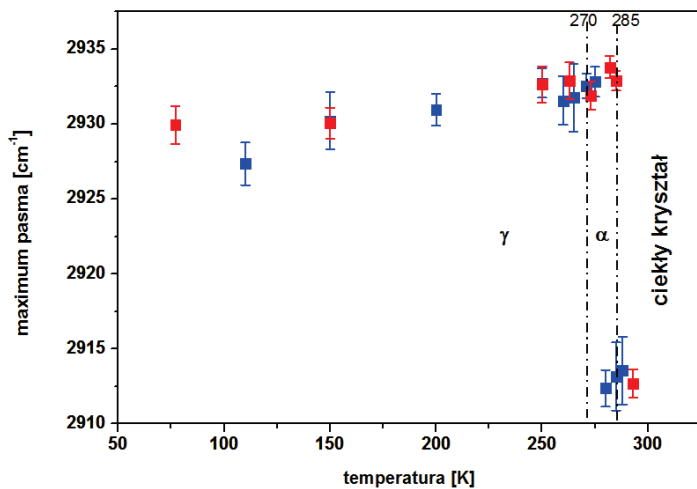
b)



c)

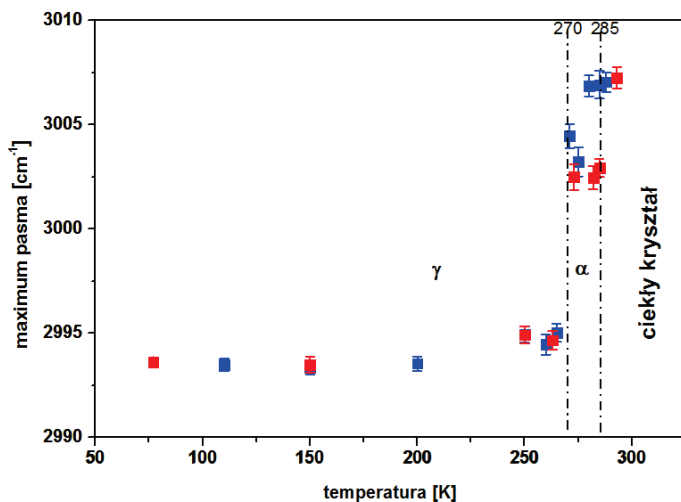


d)

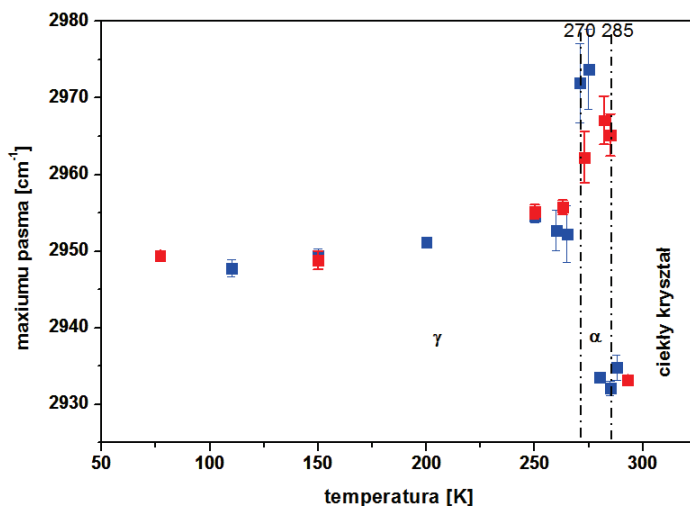




e)



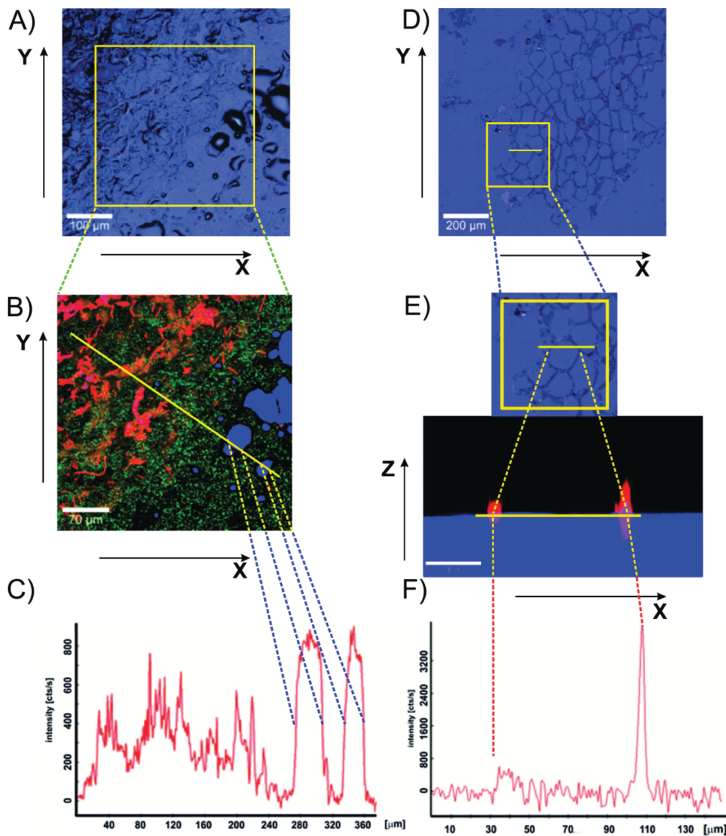
f)



**Rysunek 27.** Zmiana położenia maksimum pasm: (a)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , (b)  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ , (c)  $\nu(\text{CH}_2)$ , (d)  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ , (e)  $\nu(=\text{C}-\text{H})$ , (f)  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  [64]

Przedstawione dotychczas badania spektroskopowe preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego jednoznacznie potwierdzają dominującą rolę profilu lipidowego w różnicowaniu komórek o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo. By móc jednak wykorzystywać zakres spektralny charakterystyczny

dla drgań lipidów w diagnostyce onkologicznej piersi ludzkiej w procedurze przygotowywania preparatów, należy pominąć proces wytwarzania próbek z blozków parafinowych i deparafinizację, etapy charakterystyczne dla przygotowywania typowych preparatów histologicznych. Pomiary, jakie wykonano z wykorzystaniem techniki obrazowania Ramana potwierdzają bowiem, iż deparafinizacja zniekształca profil lipidowy badanych preparatów. Rysunek 28 przedstawia porównanie wyników otrzymanych dla próbki przygotowanej metodą kriogeniczną oraz preparatu po deparafinizacji.



**Rysunek 28.** Porównanie intensywności pasm lipidów z zakresu spektralnego  $2800\text{--}3110\text{ cm}^{-1}$  dla preparatu piersi ludzkiej przygotowanego metodą kriogeniczną oraz preparatu po deparafinizacji. Obraz mikroskopowy A), obrazowanie Ramana B), intensywność pasm lipidów z zakresu spektralnego  $2800\text{--}3110\text{ cm}^{-1}$  C) dla preparatu piersi ludzkiej przygotowanego metodą kriogeniczną. Obraz mikroskopowy D), obrazowanie Ramana E), intensywność pasm lipidów z zakresu spektralnego  $2800\text{--}3110\text{ cm}^{-1}$  F) dla preparatu piersi ludzkiej po deparafinizacji [58]

Jak widać na rysunku 28 C intensywność pasm z zakresu spektralnego 2800-3110  $\text{cm}^{-1}$  charakterystycznego dla lipidów w przypadku preparatu przygotowanego metodą kriogeniczną jest różna od zera w całym zakresie, w jakim dokonano analizy, czyli wzdłuż żółtej linii widocznej na obrazowaniu Ramana, rysunek 28B. Najintensywniejsze pasma w przypadku tego preparatu zarejestrowano dla obszarów oznaczonych na obrazowaniu Ramana kolorem niebieskim (rys. 28B), czyli dla komórek tłuszczowych obecnych w preparacie piersi ludzkiej. W przypadku preparatu po deparafinizacji analiza intensywności pasm z zakresu spektralnego 2800-3110  $\text{cm}^{-1}$  (rys. 28F), wzdłuż żółtej linii widocznej na rysunkach 28D i 28E pozwoliła na zaobserwowanie jedynie dwóch pasm, położenie których odpowiada błonom komórkowym adipocytów widocznych na obrazie mikroskopowym i obrazowaniu Ramana – rysunki 28D i 28E. Z rysunku 28F widać także, że zerowa intensywność pasm została zarejestrowana dla obszaru odpowiadającego wnętrzu komórki tłuszczowej potwierdzając, iż proces deparafinizacji zniósł profil lipidowy analizowanego preparatu ‘wyplukując’ lipidy z badanej próbki.

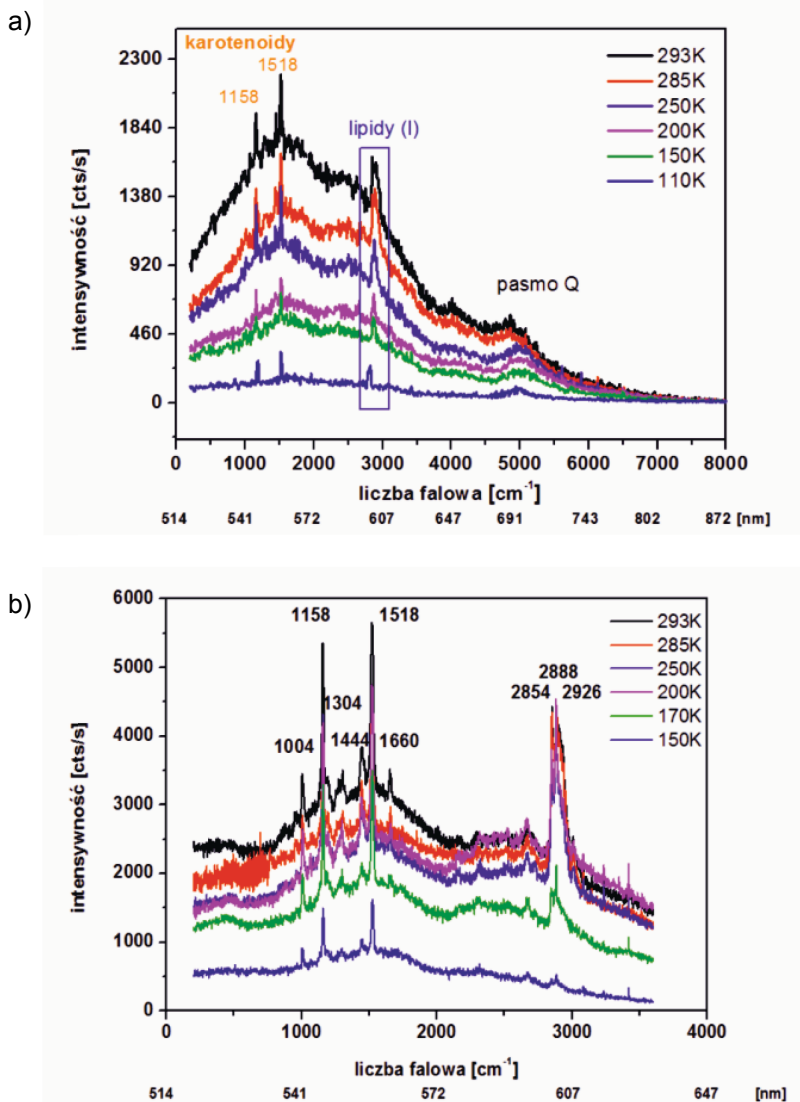
#### **4.2. Spektroskopia Ramana wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego zawierających fotouczulacz**

W ramach analizy własności wibracyjnych wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego wykonano także pomiary dla próbek nasączonych fotouczulaczami w postaci ftalocyjanin. W badaniach zastosowano sól czterosodową tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku oraz kwas tetrasulfonowanej ftalocyjaniny glinu.

Rysunek 29 przedstawia widma Ramana tkanki o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo nasączonych solą czterosodową tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku o stężeniu  $10^{-5}$  M.

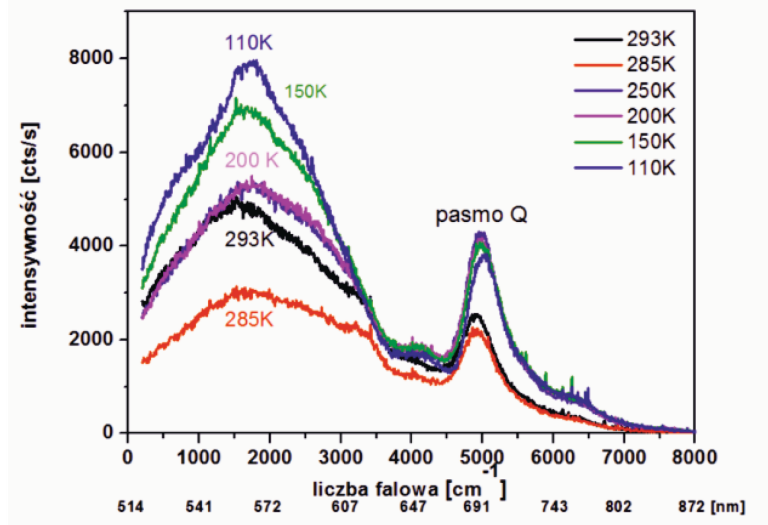
Jak widać na rysunkach 29a oraz 29c widma Ramana nasączonych ftalocyjaniną cynku tkanek o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo znacznie różnią się od siebie. Po pierwsze: pasma przy 560 nm i 690 nm są znacznie bardziej intensywne w przypadku tkanki nowotworowej niż dla tkanki o budowie prawidłowej, co więcej intensywność emisji dla tkanki nowotworowej po początkowym spadku rośnie wraz z obniżaniem temperatury, podczas gdy dla tkanki zdrowej obserwuje się jej systematyczny spadek, aż do temperatury 110 K. Dla tkanki o budowie prawidłowej nasączonej solą sodową tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku, podobnie jak dla tkanek nienasączonych ftalocyjaniną, widoczne są pasma 1004  $\text{cm}^{-1}$ , 1158  $\text{cm}^{-1}$ , 1304  $\text{cm}^{-1}$ , 1444  $\text{cm}^{-1}$ , 1518  $\text{cm}^{-1}$ , 1660  $\text{cm}^{-1}$  oraz 2854, 2888, 2126  $\text{cm}^{-1}$  (rys. 29b), które nie występują dla tkanki

nowotworowej. Porównanie rysunków 29a i 29d potwierdza, że wymienione pasma pochodzą od tkanki, nie zaś od ftalocyaniny [83].

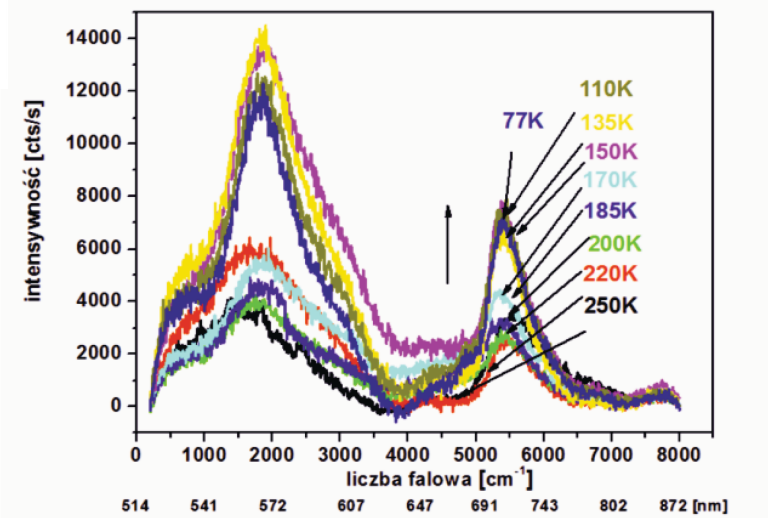


**Rysunek 29.** Widma Ramana: (a) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $ZnPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-5} M$ ), (b) tkanki nowotworowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $ZnPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-5} M$ )

c)

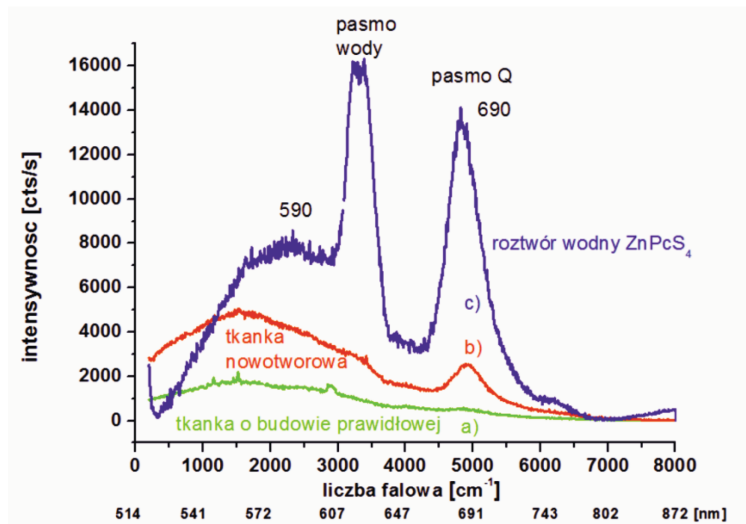


d)



**Rysunek 29 (cd.).** Widma Ramana: (c) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego dla tego samego pacjenta P55, (d) roztworu ZnPcS<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O ( $c = 10^{-5}$  M) [83]

Rysunek 30 przedstawia porównanie widm Ramana tkanki nowotworowej, tkanki o budowie prawidłowej nasączonych roztworem ZnPcS<sub>4</sub> ( $c = 10^{-5}$  M) i roztworu wodnego ZnPcS<sub>4</sub> o stężeniu  $c = 10^{-5}$  M w temperaturze pokojowej.



**Rysunek 30.** *Widma Ramana: (a) tkanki nowotworowej, (b) tkanki o budowie prawidłowej nasączonej roztworem  $ZnPcS_4$  ( $c = 10^{-5} M$ ) dla tego samego pacjenta P55, (c) roztworu wodnego  $ZnPcS_4$  ( $c = 10^{-5} M$ ) w temperaturze pokojowej [83]*

Jak widać na rysunku 30 roztwór  $ZnPcS_4$  wykazuje dwa silne pasma emisji przy 590 nm i 690 nm oraz silne pasma wibracyjne przy 3250 i 3410  $cm^{-1}$  pochodzące od drgań cząsteczek wody. Pasma 690 nm zinterpretowano jako pasmo emisji związane z przejściami elektronowymi typowymi dla monomerów ftalocyjanin. Emisji przy 590 nm, mimo wielu lat badań, nie przyporządkowuje się jednoznacznej interpretacji. W literaturze pasmo 590 nm przypisuje się: formie zredukowanej ftalocyjaniny ( $MePc$ ) $^{\bullet-}$  [84], emisji  $S_2 \rightarrow S_0$  [85], emisji  $T_n \rightarrow T_1$  [46], przeniesieniu ładunku (*ang. charge transfer, CT*) między jonem centralnym a ligandami [86], emisji  $\pi^* \rightarrow n$  [84] lub emisji pochodzącej od pasma B [87].

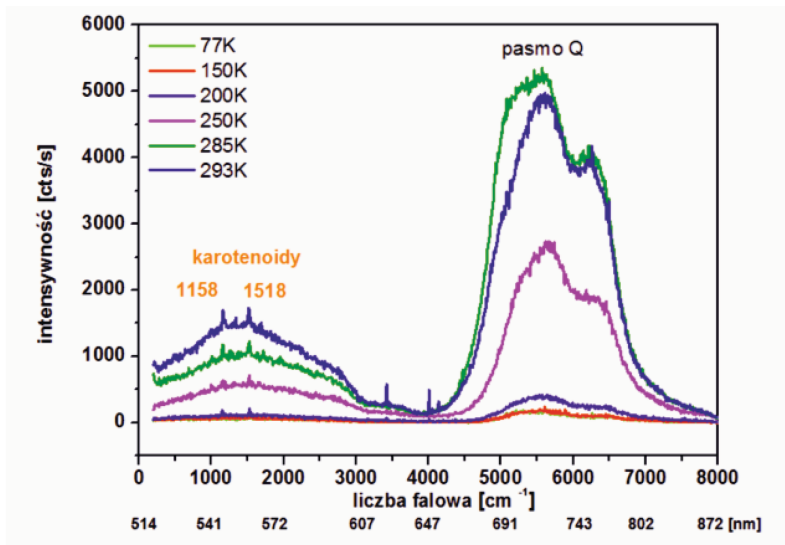
Na rysunku 30 widać także, że profil emisji obserwowanej w roztworze jest bardzo podobny do profilu emisji obserwowanej dla tkanki nowotworowej nasączonej ftalocyjaniną. Analiza zależności temperaturowej emisji przy 690 nm również wskazuje na analogiczne zachowanie roztworu ftalocyjaniny oraz tkanki nowotworowej nasączonej fotouczulaczem. Oznacza to, iż emisja nasączonego ftalocyjaniną preparatu tkanki nowotworowej jest zdominowana przez ftalocyjaninę zaadsorbowaną na powierzchni próbki gruczołu piersiowego. Niższa intensywność emisji w przypadku tkanki o budowie prawidłowej w porównaniu z tkanką nowotworową może być powodowana dwoma czynnikami: a) niższym stężeniem fotouczulacza w tkance zdrowej i b) od-miennymi kanałami dyssypacji energii w tkance zdrowej i zmienionej chorobowo.

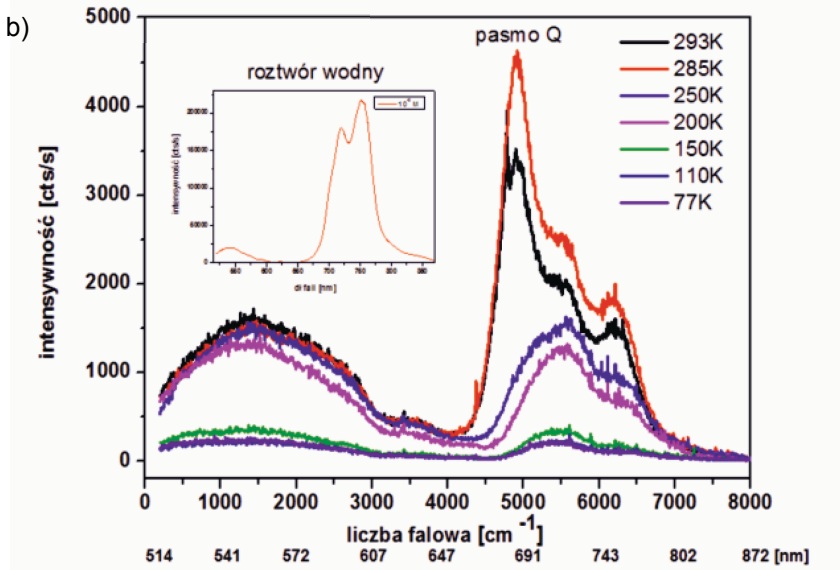
Bezpromienne kanały dyssypacji energii są bardziej efektywne w przypadku dimerów, które powstają wydajnie dla wyższych stężeń fotouczulacza lub w niskich temperaturach, gdy odległość między cząsteczkami ftalocyjanin ulega zmniejszeniu. Wiele ftalocyjanin w warunkach obniżonej temperatury i zwiększonego stężenia efektywnie tworzy struktury typu ‘kanapkowego’ (*ang. ring stacked*). Agregacja ftalocyjanin zależy oczywiście od rodzaju jonu centralnego i podstawników: ich rodzaju i liczby w strukturze makrocyklu. Zagadnienie agregacji ftalocyjanin jest niezwykle istotne w kontekście praktycznego stosowania ftalocyjanin, jako fotouczulaczy w terapii PDT, bowiem zdolność do agregacji determinuje wydajność generowania tlenu singletowego.

W celu porównania różnych fotouczulaczy podobną analizę wykonano dla ftalocyjaniny glinu. Rysunek 31 przedstawia widma Ramana (a) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego oraz (b) tkanki nowotworowej nasączonych roztworem ftalocyjaniny glinu ( $c = 10^{-4}$  M) oraz wodnego roztworu  $\text{AlPcS}_4$  ( $c = 10^{-4}$  M) w temperaturze 293 K.

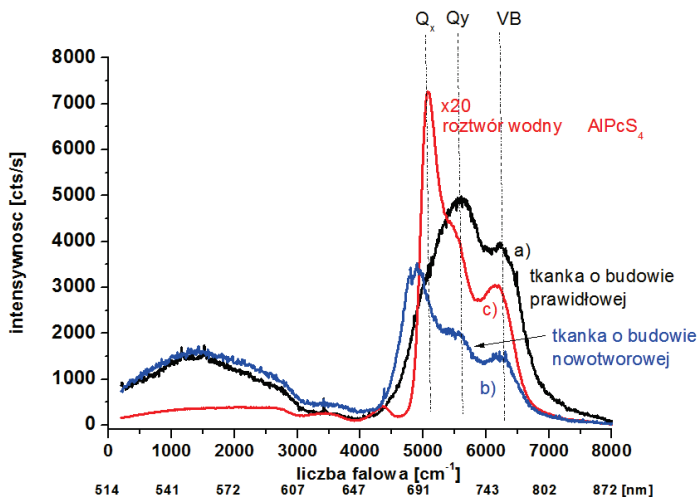
Rysunek 32 przedstawia zaś widma Ramana (a) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$  ( $c = 10^{-4}$  M), (b) tkanki nowotworowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$  ( $c = 10^{-4}$  M) dla pacjenta P55 oraz (c) roztworu  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$  ( $c = 10^{-4}$  M) w temperaturze 293 K [83].

a)





**Rysunek 31.** Widma Ramana: (a) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ), (b) tkanki nowotworowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ) dla pacjenta P58 oraz roztworu  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ) [83]

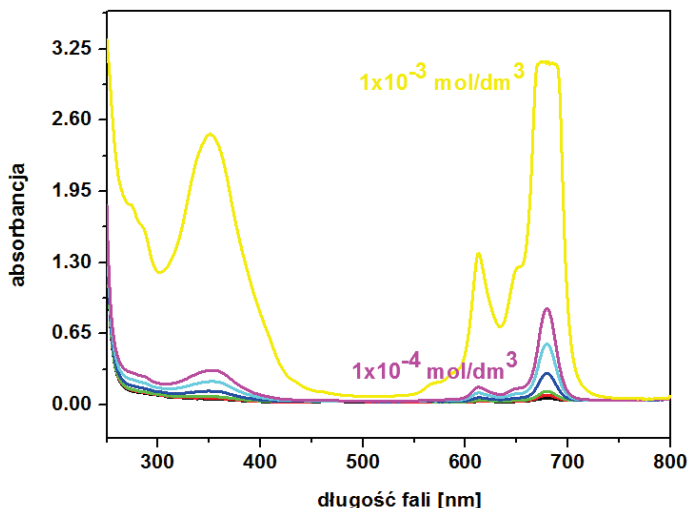


**Rysunek 32.** Widma Ramana: (a) tkanki o budowie prawidłowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ), (b) tkanki nowotworowej ludzkiego gruczołu piersiowego nasączonej roztworem  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ) dla pacjenta P55 oraz (c) roztworu  $AlPcS_4-H_2O$  ( $c = 10^{-4} M$ ) [83]

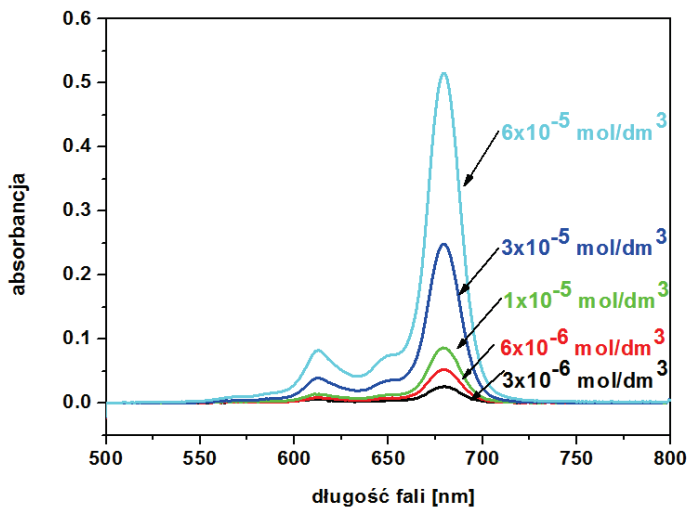


Na rysunku 32 widać, że widma tkanki nowotworowej nasączonej  $\text{AlPcS}_4$  i roztworu  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$  wykazują pasma Qx przy 695 nm, Qy przy 721 nm i pasmo wibronowe przy 759 nm. Tkanka o utkaniu prawidłowym nasączona  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$  wykazuje natomiast jedynie pasmo Qy oraz pasmo wibronowe. Maksimum fluorescencji w przypadku tkanki zdrowej jest również przesunięte w kierunku podczerwieni w porównaniu do tkanki nowotworowej i roztworu  $\text{AlPcS}_4\text{-H}_2\text{O}$ . Porównanie widm przedstawionych na rysunku 32 potwierdza więc, że mechanizmy dyssypacji energii i agregacji dla tkanki nowotworowej muszą być podobne jak dla roztworu, podczas gdy dla tkanki o budowie prawidłowej nasączonej fotouczulaczem mechanizmy te muszą być odmienne, a dużą rolę musi odgrywać powinowactwo struktur zdrowej i zmienionej nowotworowo tkanki piersi ludzkiej do wody. Wyniki otrzymane dla  $\text{AlPcS}_4$  zwróciły także uwagę na strukturę pasma Q tej ftalocyjaniny. Struktura pasma Q obserwowana dla ftalocyjaniny glinu jest bowiem bardzo specyficzna i powodowana ligandowaniem jonu centralnego przez cząsteczki wody, które obniżają symetrię kompleksu [83].

Agregację ftalocyjanin, tak istotną z punktu widzenia zastosowań praktycznych w PDT, przebadano dla różnych przedstawicieli tej klasy związków, wykorzystując m.in. technikę spektroskopii absorpcyjnej z zakresu UV-Vis [88, 89]. Otrzymane wyniki zostaną omówione na przykładzie soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku. Rysunki 33 i 34 przedstawiają widma absorpcyjne  $\text{ZnPcS}_4$  w DMSO.

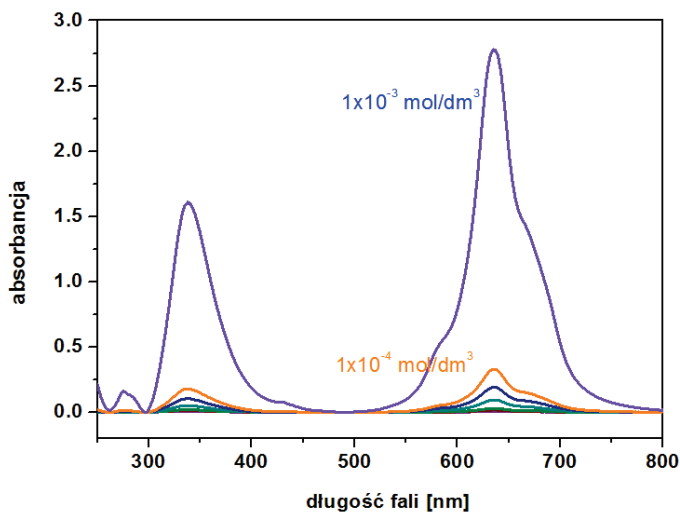


**Rysunek 33.** Widma absorpcyjne soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $\text{ZnPcS}_4$ ) w DMSO, zakres spektralny 200-800 nm [89]

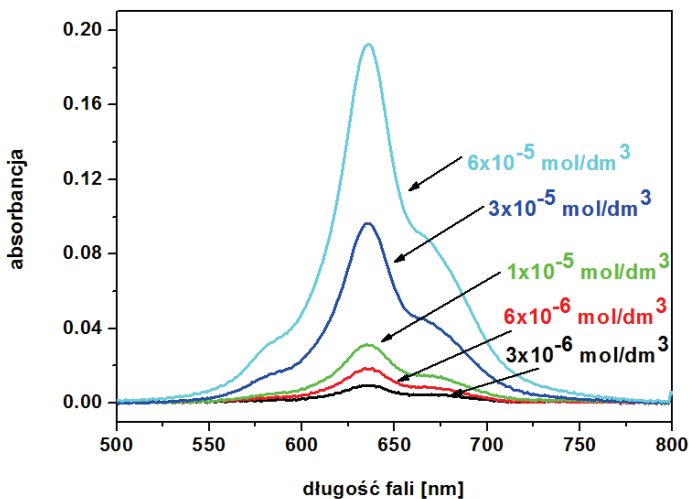


**Rysunek 34.** Widma absorpcyjne soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $\text{ZnPcS}_4$ ) w DMSO, zakres spektralny 500-800 nm [89]

Rysunki 35 i 36 przedstawiają zaś widma absorpcyjne soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku  $\text{ZnPcS}_4$  w  $\text{H}_2\text{O}$  [89].



**Rysunek 35.** Widma absorpcyjne soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $\text{ZnPcS}_4$ ) w  $\text{H}_2\text{O}$ , zakres spektralny 200-800 nm [89]



**Rysunek 36.** Widma absorpcyjne soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $ZnPcS_4$ ) w  $H_2O$ , zakres spektralny 500-800 nm [89]

Jak widać na rysunkach 33 oraz 35  $ZnPcS_4$  w roztworach DMSO występuje w przeważającej ilości w formie monomeru, podczas gdy w roztworach wodnych przeważa forma dimeru.

W celu wyznaczenia stałej dimeryzacji  $K$ , przy założeniu braku agregatów wyższych niż dimery, skorzystano z równania:

$$K = [d] / [m]^2$$

gdzie  $[d]$  i  $[m]$  opisują stężenia substancji w formie dimeru i monomeru, stężenie całkowite  $[c_t]$ :

$$c_t = 2[d] + [m]$$

$$\text{i } [m] = \frac{J \cdot c_t}{J + 2}; \quad J = \frac{A_m}{A_d}$$

Absorbancję  $A$  można więc ostatecznie opisać równaniem:

$$A = (\varepsilon_m [m] + 2\varepsilon_d [d])l$$

gdzie  $l$  jest długością drogi optycznej,  $\varepsilon_m$  i  $\varepsilon_d$  to molowe współczynniki absorpcji odpowiednio monomeru i dimeru wyrażone w  $[dm^3/(mol \text{ cm})]$ .

Po przekształceniu równań można ostatecznie zapisać:

$$A = (\varepsilon_m c_t + (\varepsilon_m - \varepsilon_d))[-1 + \sqrt{(1 + 8K_d c_t)}] / 4K_d$$

Ostatecznie w celu wyznaczenia wartości stałej dimeryzacji  $K$  najpierw wyznaczono w oparciu o prawo Lamberta-Beera wartości molowych współczynników absorpcji monomeru i dimeru. Następnie wyznaczono wstępną wartość  $K$ . Kolejnym krokiem było sporządzenie wykresu  $A/l$  ( $A$  – absorbancja,  $l$  – długość drogi optycznej) w funkcji stężenia całkowitego. Ostateczne wartości  $\varepsilon_m$ ,  $\varepsilon_d$  i  $K$  otrzymano na drodze dopasowania funkcji  $A = (\varepsilon_m c_t + (\varepsilon_m - \varepsilon_d))[-1 + \sqrt{(1 + 8K_d c_t)}] / 4K_d$  do punktów eksperymentalnych.

Dla tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku otrzymano wartości  $K$  zestawione w poniższej tabeli 1.

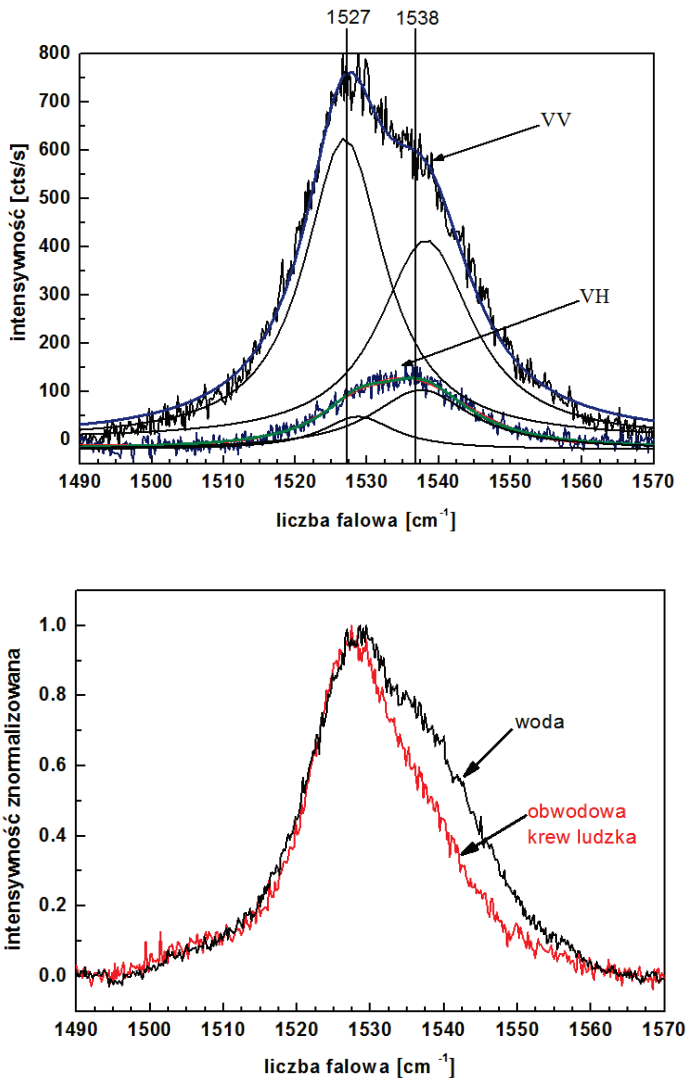
Tabela 1. *Wartości stałej dimeryzacji  $K$  dla tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku w roztworach DMSO i  $H_2O$  [89]*

|                                      | $K$   | $\varepsilon_m$ [ $\text{dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1})$ ] | $\varepsilon_d$ [ $\text{dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1})$ ] |
|--------------------------------------|---|---|---|
| ZnPcS <sub>4</sub> /DMSO             | $0,89 \times 10^3 \pm 0,2$<br>$\times 10^3$ | $8,42 \cdot 10^4 \pm 4,3 \times 10^2$<br>dla 679 nm                 | $1,22 \cdot 10^4 \pm 1,1 \times 10^2$<br>dla 652 nm                 |
| ZnPcS <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O | $9,87 \times 10^5 \pm$<br>$2,5 \times 10^4$ | $3,31 \cdot 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$<br>dla 676 nm                 | $3,4 \cdot 10^4 \pm 5,1 \times 10^2$<br>dla 633 nm                  |

Wyniki zawarte w tabeli 1 potwierdzają wyższy stopień dimeryzacji ZnPcS<sub>4</sub> w roztworach wodnych niż w DMSO. Analogiczna zależność została osiągnięta dla innych tetrasulfonowanych ftalocyjanin, takich jak ftalocyjaniny: miedzi czy magnezu, wyjątkiem okazała się ftalocyjanina glinu, która jak wykazano na rysunkach 31 i 32 nawet dla stężeń rzędu  $10^{-4}$  M występuje w wodzie w formie monomeru [83, 88-91].

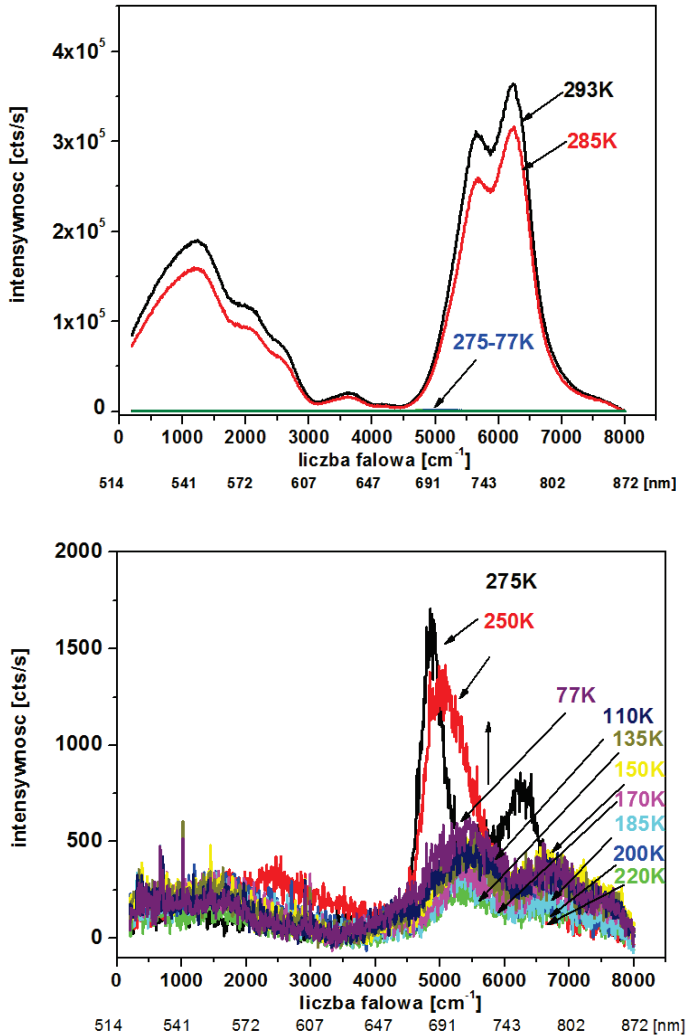
Wysoka tendencja do agregacji ftalocyjanin: cynku, miedzi, magnezu w roztworach wodnych mogłaby sugerować ich niską przydatność w PDT [88-91]. Jednak badania roztworów ftalocyjanin w krwi ludzkiej, y "obecność białek osocza – HSA (*ang. human serum albumine*) potwierdziły, że HSA powoduje przesunięcie równowagi dimeryzacji na korzyść monomerów. Rysunek 37 przedstawia widma Ramana soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny miedzi, jakie zarejestrowano w roztworze wodnym i krwi ludzkiej. Jak widać na rysunku 37 w roztworze

wodnym ftalocyjanina miedzi występuje w znacznej ilości w formie dimeru (pasmo 1538  $\text{cm}^{-1}$ ), podczas gdy w krwi ludzkiej równowaga jest wyraźnie przesunięta na korzyść monomeru (pasmo 1527  $\text{cm}^{-1}$ ) [88].



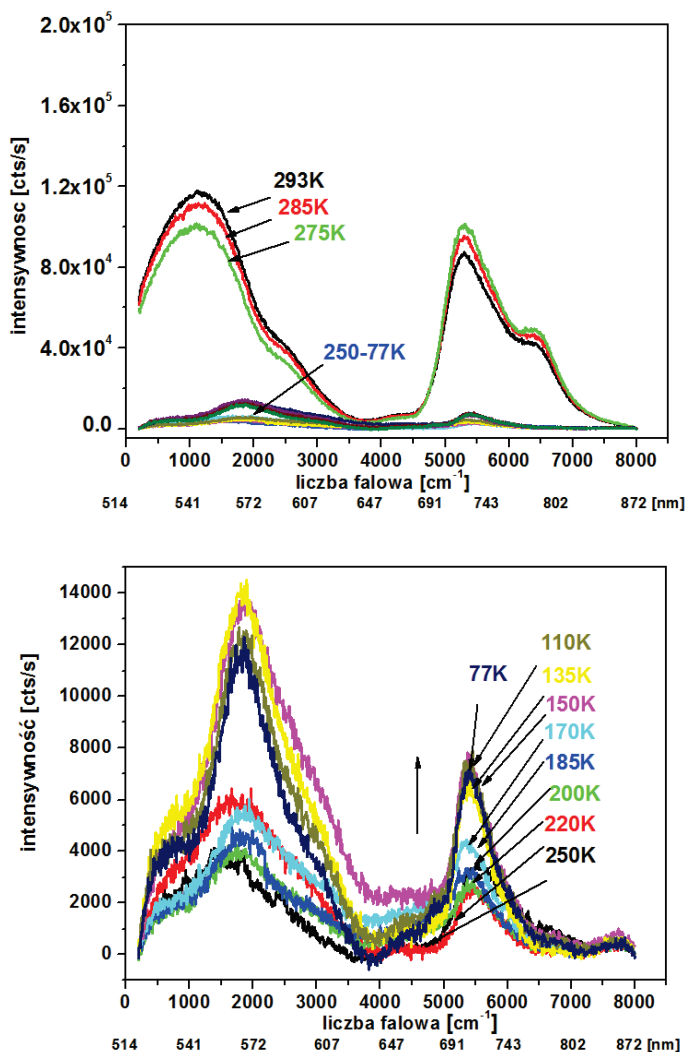
**Rysunek 37.** Widma Ramana soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny miedzi w roztworze wodnym i krwi ludzkiej [88]

Spektroskopię Ramana zastosowano także do identyfikacji form rodnikowych ftalocyjanin z wykorzystaniem pomiarów niskotemperaturowych. Rysunek 38 przedstawia widma Ramana roztworu  $ZnPcS_4$  w DMSO o stężeniu  $10^{-2}$  M. Dla porównania rysunek 39 przedstawia widma Ramana  $ZnPcS_4$  w  $H_2O$  o tym samym stężeniu  $10^{-2}$  M [89].



D

**Rysunek 38.** Widma Ramana tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $ZnPcS_4$ ) w MSO o stężeniu  $10^{-2}$  M [89]

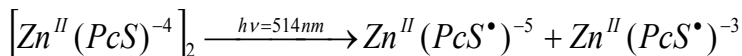


**Rysunek 39.** Widma Ramana tetrasulfonowanej ftalocyjaniny cynku ( $ZnPcS_4$ ) w  $H_2O$  o stężeniu  $10^{-2} M$  [89]

Porównanie rysunków 38 oraz 39 pozwala zauważyć, że w przypadku obu rozpuszczalników w zakresie spektralnym charakterystycznym dla pasma Q w miarę obniżania temperatury wybudowuje się pasmo z maksimum przy około 711 nm.

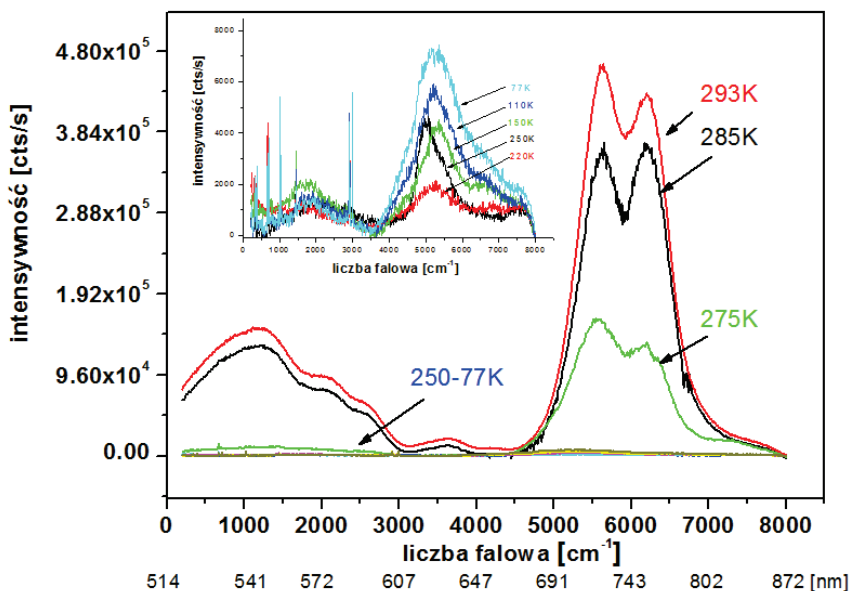
Ze względu na własności pasma przy 711 nm, intensywność tego pasma rośnie wraz ze spadkiem temperatury; uzasadnione jest przypisanie tego pasma formom rodnikowym ftalocyjaniny. W niskich temperaturach, gdy odległości

międzycząsteczkowe maleją, zwiększa się prawdopodobieństwo przeniesienia ładunku między sąsiadującymi pierścieniami makrocykli i tym samym zwiększa się możliwość powstawania rodników generowanych zgodnie z reakcją:



Aby udowodnić, czy pasmo to nie pochodzi od form ponadtlenkowych ftalocyjaniny wykonano pomiary dla próbek odgazowanych [89].

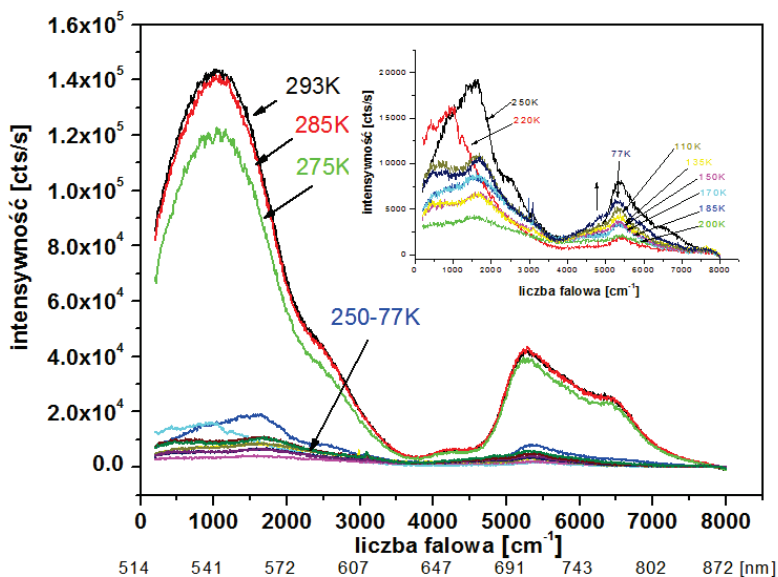
Rysunek 40 przedstawia widma Ramana roztworu  $\text{ZnPcS}_4$  o stężeniu  $10^{-2} \text{ M}$  w DMSO dla próbki odgazowanej, rysunek 41 przedstawia wyniki otrzymane dla tego samego stężenia ftalocyjaniny, ale roztworu wodnego [89].



**Rysunek 40.** Widma Ramana roztworu ftalocyjaniny cynku  $\text{ZnPcS}_4$  o stężeniu  $10^{-2} \text{ M}$  w DMSO dla próbki odgazowanej [89]

Porównując rysunki 40 oraz 41 można zauważyć, iż dla ftalocyjaniny cynku w  $\text{H}_2\text{O}$ , dla próbki odgazowanej, pasmo z maksimum około 711 nm jest wciąż widoczne, co oznacza, że pasmo to nie może pochodzić od związków ponadtlenkowych, jednakże tlen wpływa na intensywność obserwowanego pasma. Wyniki te potwierdzają więc hipotezę, iż pasmo to może pochodzić od zredukowanej formy rodnika ftalocyjaniny. Podobną analizę przeprowadzono także dla ftalocyjanin magnezu i miedzi [88, 90, 91], a wnioski pozostają spójne z wyciągniętymi dla ftalocyjaniny cynku [89].





**Rysunek 41.** Widma Ramana roztworu ftalocyjaniny cynku  $ZnPcS_4$  o stężeniu  $10^{-2}$  M w  $H_2O$  dla próbek odgazowanej [89]

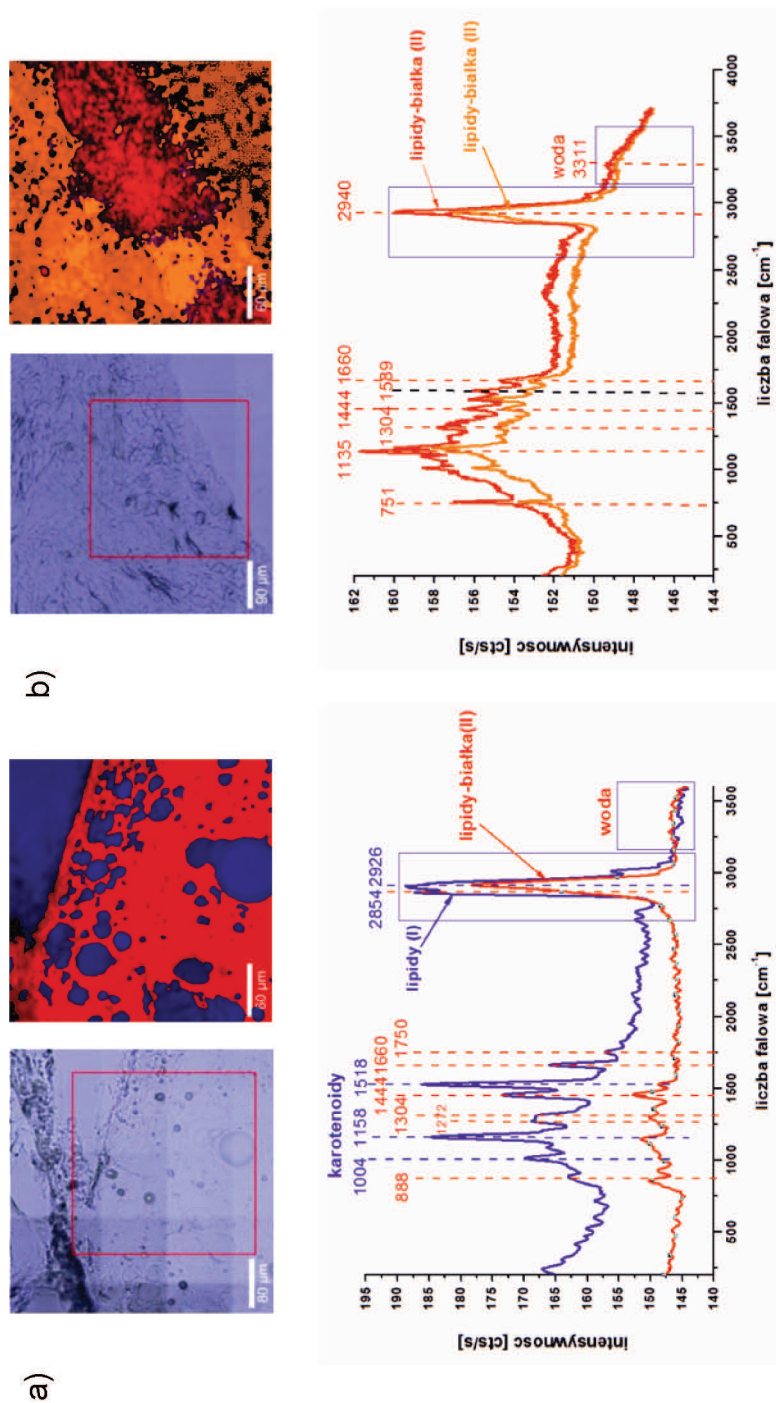
W ramach badań, jakie przeprowadzono dla preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego nasączanych roztworami ftalocyjanin wykonano także obrazowanie Ramana.

Rysunki 42 i 43 przedstawiają obrazowanie Ramana tkanek o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo dla preparatów piersi ludzkiej bez dodania fotouczulacza i nasączonych tetrasulfonowaną ftalocyjaniną glinu [83].

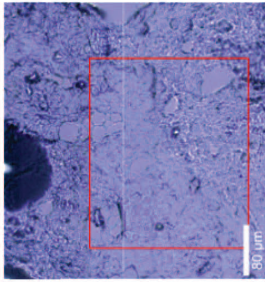
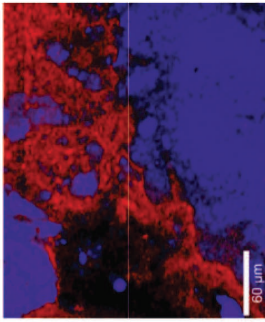
Porównanie wyników przedstawionych na rysunkach 42 i 43 po raz kolejny potwierdza rolę karotenoidów, lipidów, białek oraz wody w odróżnianiu tkanki o budowie prawidłowej od zmienionej nowotworowo. Nasączenie preparatów piersi ludzkiej ftalocyjaniną glinu nie przesłoniło pasm markerów nowotworowych zidentyfikowanych metodą spektroskopii Ramana [83].

Rysunek 44 przedstawia obrazy mikroskopowe a), obrazowanie Ramana b), analizę PCA c) oraz widma Ramana typowe dla obszarów wyróżnionych odpowiednim kolorem na obrazowaniu Ramana preparatów pacjenta P58 [83].

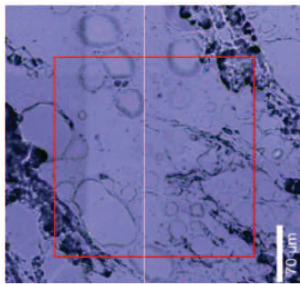
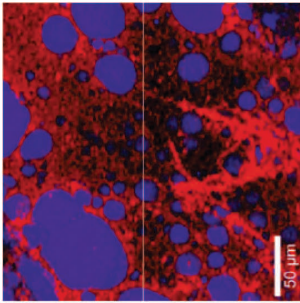
Rysunki 44A oraz 44B przedstawiają m.in. analizę PCA wykonaną dla badanych zbiorów widm Ramana tkanek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo, pochodzących od pacjenta P58. Rola metod chemometrycznych w analizie wielowymiarowych danych zostanie omówiona w kolejnym rozdziale: Analiza PCA.



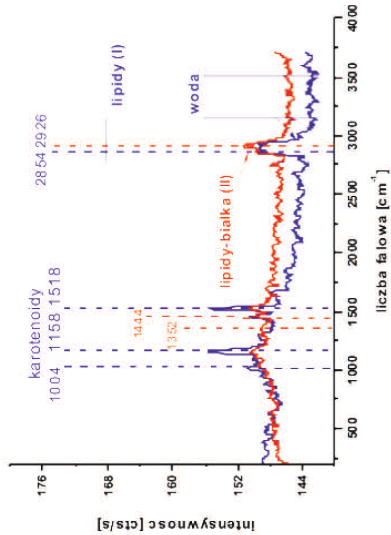
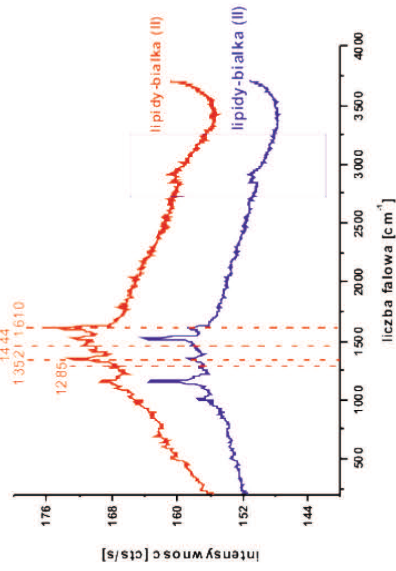
**Rysunek 42.** (a) Obraz mikroskopowy, obrazowanie Ramana i widma Ramana tkanki gruczołu piersiowego pobranej z marginesu bezpieczeństwa, (b) obraz mikroskopowy, obrazowanie Ramana i widma Ramana tkanki gruczołu piersiowego pobranej z masy guza – rak zrazikowy naciekający (ILC, *lac. carcinoma lobulare infiltrans mammae*), obrazowanie Ramana ( $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ ) wykonano dla obszaru oznaczonego czerwoną ramką na obrazie mikroskopowym tkanki. Preparaty wykonano z tkanek pochodzących od pacjenta P58 [83]



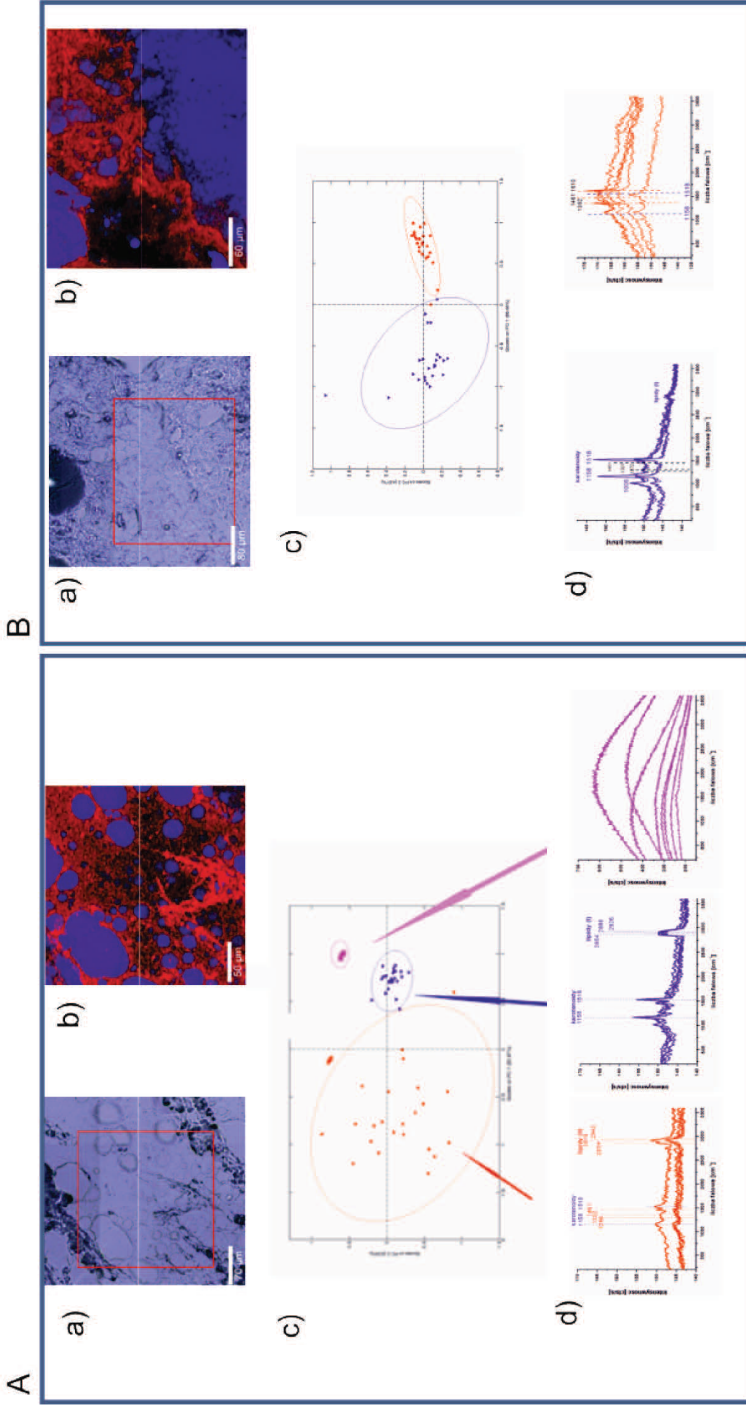
b)



a)



**Rysunek 43.** (a) Obraz mikroskopowy, obrazowanie Ramana i widma Ramana tkanki gruczołu piersiowego pobranej z marginesu bezpieczństwa, (b) obraz mikroskopowy, obrazowanie Ramana i widma Ramana tkanki gruczołu piersiowego pobranej z masy guza (ILC, łac. carcinoma lobulare infiltrans mammae) nasączonych roztworem AIP-c-Si<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O ( $c = 10^{-4}$  M), obrazowanie Ramana ( $250 \times 300 \mu\text{m}$  dla tkanki zdrowej,  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$  dla nowotworu) wykonano dla obszaru oznaczonego czerwoną ramką na obrazie mikroskopowym tkanki. Preparaty wykonane z tkanek pochodzących od pacjenta P58 /83/



**Rysunek 44.** (a) Obrazy mikroskopowe, (b) obrazowanie Ramana, (c) analiza PCA, (d) widma Ramana typowe dla obszarów wyróżnionych odmiennymi kolorami dla tkanki: zdrowej A oraz zmienionej nowotworowo B nasączonych roztworem ftalocyaniny  $\text{AlPcS}_7\text{H}_2\text{O}$  ( $c = 10^{-4}$  M). Preparaty wykonano z tkanek pochodzących od pacjenta P58[83]

### 4.3. Analiza PCA

Analiza PCA (*ang. Principal Component Analysis*) jest jedną ze statystycznych metod analizy czynnikowej, którą stosuje się do analizy wielowymiarowych zbiorów danych. Analiza PCA została przedstawiona po raz pierwszy przez Hotellinga w 1933 roku [92, 93].

W roku 1901 Pearson opublikował pracę o prostych i płaszczyznach, które są najlepiej dopasowane do zbioru próbek w przestrzeni pomiarowej. Następnie, po 22 latach, Fisher i MacKenzie zaproponowali pierwszy algorytm PCA, znany obecnie jako algorytm NIPALS. Kolejne modyfikacje metody PCA zawdzięczamy Woldowi i Hottelingowi.

Najczęściej analizę głównych składowych stosuje się w celu redukcji danych, wówczas analiza PCA polega na opisanu danych o dużej liczbie cech – o dużym wymiarze, za pomocą danych o mniejszej liczbie cech, zachowując jednocześnie maksimum zawartej informacji [92, 93]. Często zdarza się, bowiem, że tylko część informacji wnoszonej przez każdą ze zmiennych jest swoista, a reszta jest powtórzeniem informacji wnoszonej przez inne zmienne. Dlatego główne składniki, w analizie PCA, konstruuje się jako liniową kombinację oryginalnych zmiennych (wzajemnie nieskorelowanych) tak, aby każdy następny składnik opisywał największą zmienność danych i był ortogonalny do poprzedniego. Główne składowe mogą być wyznaczane w kolejności malejącego zasobu informacji, dlatego pierwsza główna składowa zawiera największy zasób zmienności. Jeśli między rozważanymi zmiennymi wyjściowymi istnieją znaczące korelacje, to liczba głównych składowych konieczna do poprawnego opisanie danych jest znacznie mniejsza niż liczba zmiennych wyjściowych, dzięki czemu łatwiej analizować badane zbiory, a uwaga jest koncentrowana na najistotniejszych aspektach danych. Dotychczas nie istnieje jedno niezawodne kryterium wyboru liczby istotnych składowych. W przypadku wykresów dwuwymiarowych można wykorzystać tylko dwie składowe, a w przypadku wykresów przestrzennych trzy składowe.

Najistotniejszą cechą analizy głównych składowych jest skoncentrowanie się na pozyskiwaniu informacji o różnicach pomiędzy próbkami, a nie ich podobieństwach, analiza PCA jest więc idealnym narzędziem do wskazania różnic między komórkami piersi ludzkiej o budowie prawidłowej i nowotworowej.

Wszystkie dane wykorzystywane w analizie PCA zawsze wymagają obróbki wstępnej, polegającej np. na ich centrowaniu (średnia równa zero) oraz autoskalowaniu (średnia równa zero i odchylenie standardowe równe jeden). Zadaniem

autoskalowania jest nadanie każdej zmiennej ten samej wagi w analizie. Przy obróbce danych należy zwrócić także uwagę na jakość widm używanych w analizie, duże szумы, tzw. „duchy”, czy też „sklejki” mogą wpływać niekorzystnie na otrzymany wynik końcowy.

Podsumowując, zadaniem PCA jest przedstawienie danych,  $\mathbf{X}$ , o  $m$  obiektach i  $n$  zmiennych, jako iloczynu dwóch nowych macierzy  $\mathbf{T}$  ( $m \times f$ ) i  $\mathbf{P}$  ( $n \times f$ ), gdzie  $f \ll n$ , które zawierają współrzędne obiektów i parametrów na kierunkach maksymalizujących opis wariacji danych. O liczbie kolumn macierzy  $\mathbf{T}$  i  $\mathbf{P}$ , czyli o kompleksowości modelu PCA, decyduje rząd chemiczny macierzy  $\mathbf{X}$ , który jest, co najwyżej równy jej rzędowi matematycznemu. Model PCA można wyrazić następująco:

$$\mathbf{X}_{[m,n]} = \mathbf{T}_{[m,f]} \mathbf{P}_{[f,n]}^T + \mathbf{E}_{[m,n]}$$

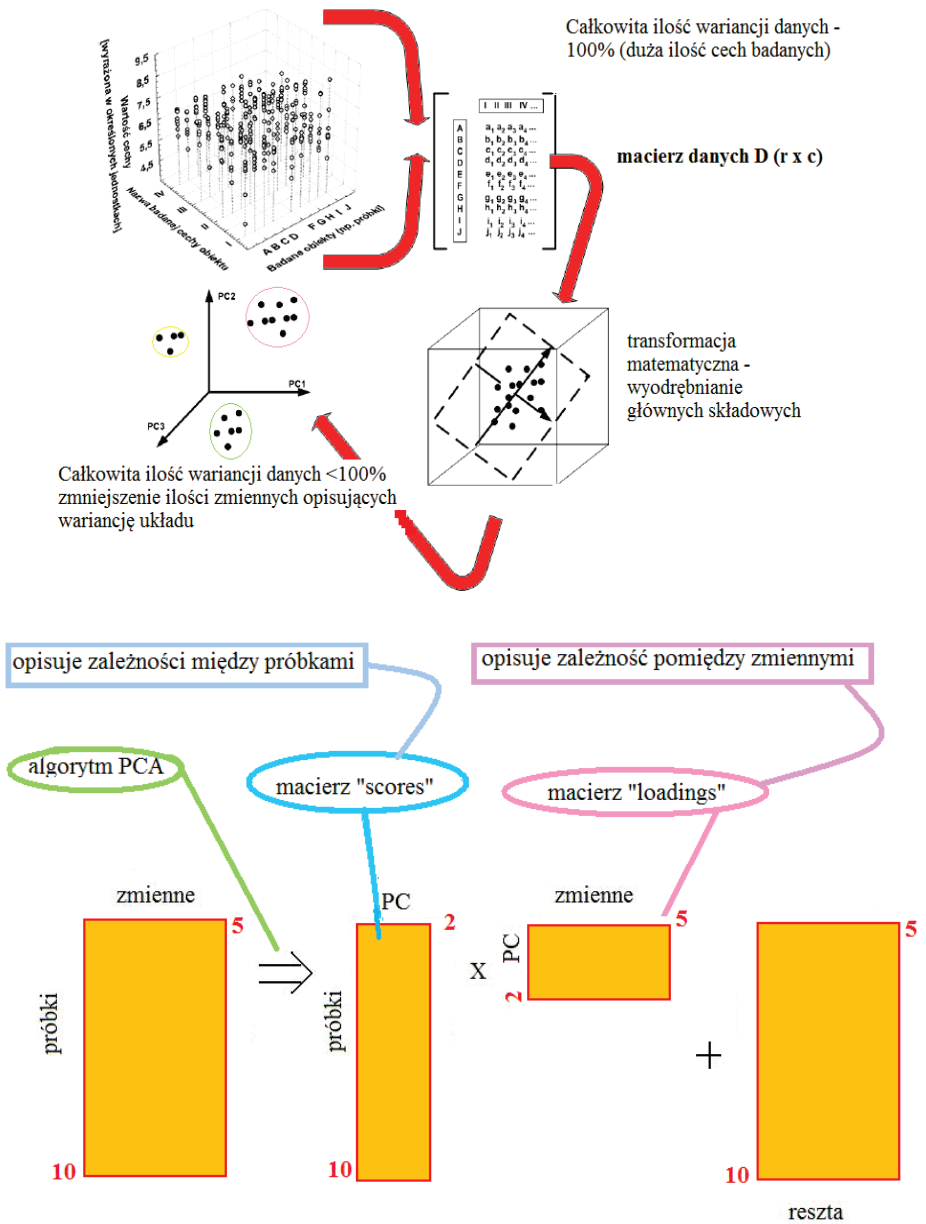
gdzie  $\mathbf{E}$  macierz reszt modelu PCA z  $f$  czynnikami głównymi.

Kolumny macierzy  $\mathbf{T}$  i  $\mathbf{P}$  zawierają współrzędne obiektów i parametrów na nowych ukrytych zmiennych, nazywanych czynnikami głównymi. Czynniki główne są konstruowane iteracyjnie tak, aby maksymalizować opis wariacji danych. Każdy kolejny czynnik główny opisuje niewyjaśnioną przez poprzednie czynniki wariację danych i dlatego jego wkład do opisu całkowitej wariacji danych jest mniejszy. Kolumny  $\mathbf{T}$  są ortogonalne, a kolumny  $\mathbf{P}$  ortonormalane. Z każdym czynnikiem głównym stowarzyszona jest tzw. wartość własna  $v_i$ . Oblicza się ją jako sumę kwadratów wartości wyników dla danego czynnika głównego. Wartości własne określają ilościowo wariację danych opisaną przez kolejne czynniki [92, 93]. Modele analizy PCA przedstawiono na rysunku 45.

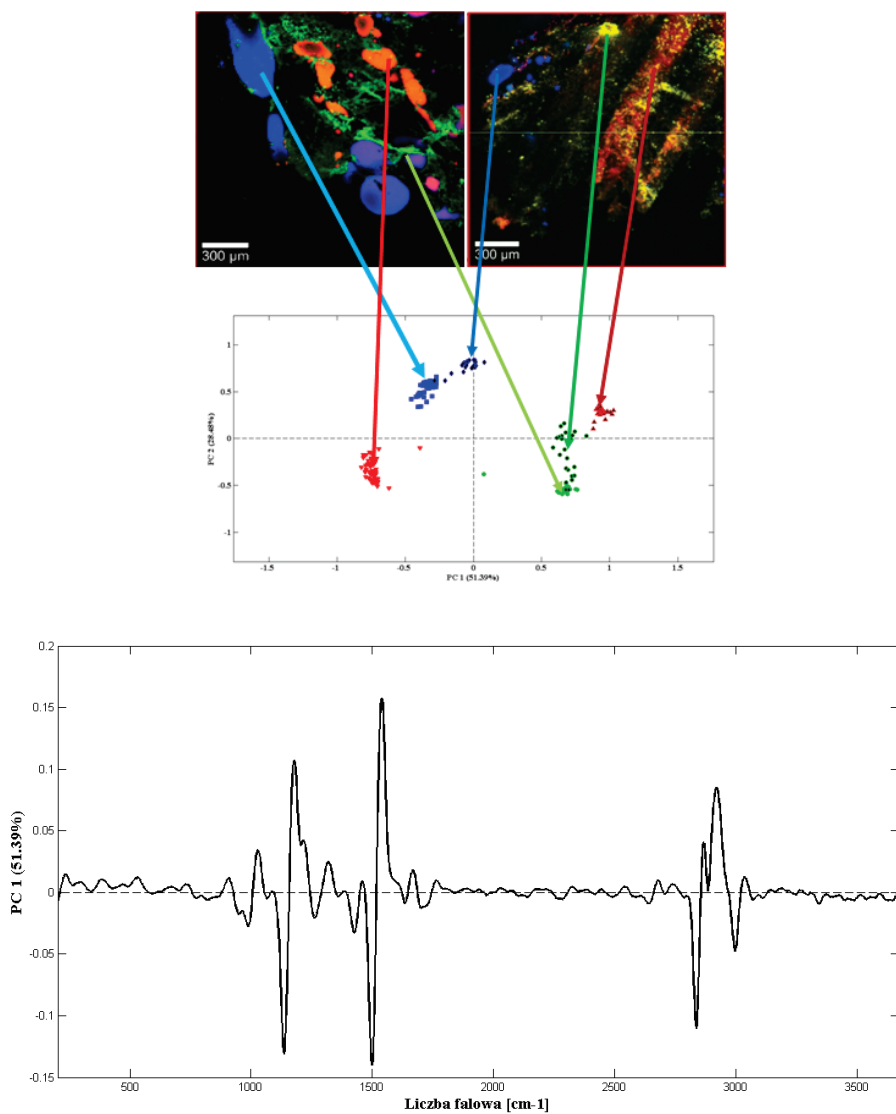
Podsumowując, analiza głównych składowych zmniejsza liczbę zmiennych bez istotnej straty zawartych w nich informacji (funkcja redundacyjna) oraz uporządkowuje i klasyfikuje obiekty w ortogonalnych przestrzeniach czynnikowych (funkcja delimitacyjna).

Analiza PCA przeprowadzona dla analizowanego zbioru pacjentów potwierdziła, iż częstościami różnicującymi tkanki o budowie prawidłowej od zmienionych nowotworowo, jak widać z rysunku 46, są częstości charakterystyczne dla karotenoidów, lipidów, białek, wody.

Rysunek 46 przedstawia wyniki analizy PCA dla pacjenta P33, zaś rysunek 47 dla wybranej grupy 70 pacjentów.

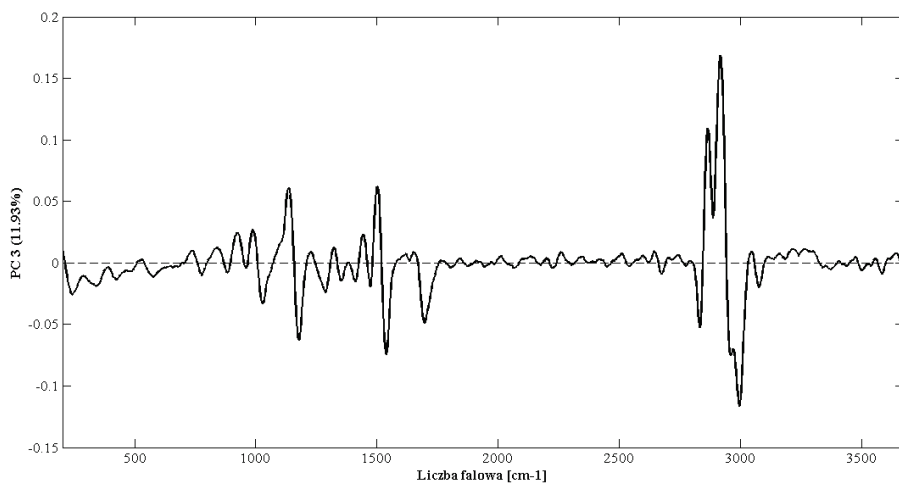
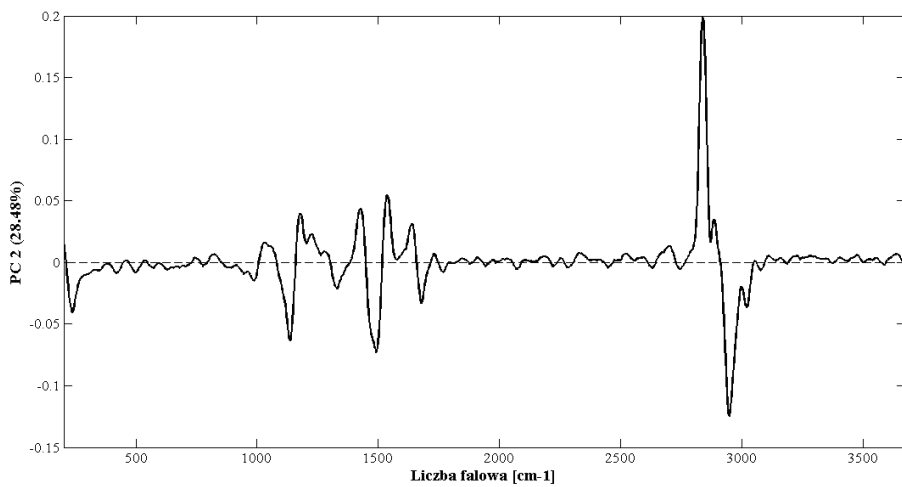


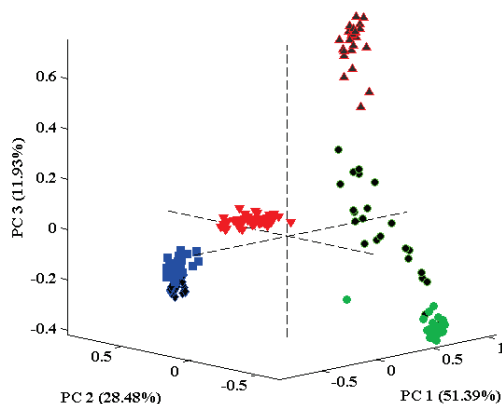
Rysunek 45. Schemat analizy PCA [92,93]



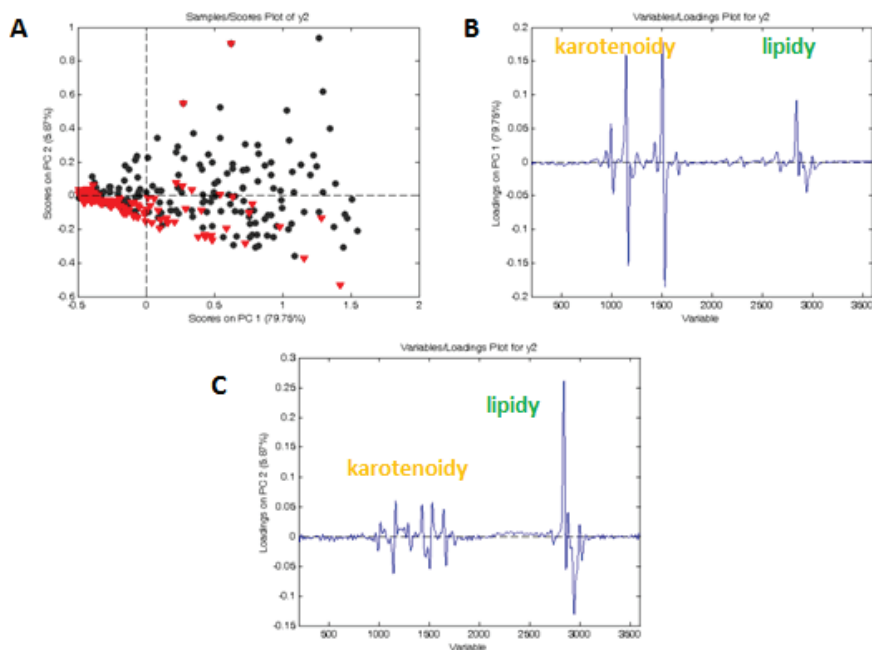
**Rysunek 46.** Analiza PCA widm Ramana preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego. Zależności wartości czynników głównych  $PC_1$ ,  $PC_2$ ,  $PC_3$  w funkcji liczby falowej dla pacjenta P33 oraz zależność wag trzech czynników głównych w trójwymiarowym układzie współrzędnych dla zbioru danych pochodzących od pacjenta P33







**Rysunek 46 (cd.).** Analiza PCA widm Ramana preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego. Zależności wartości czynników głównych PC1, PC2, PC3 w funkcji liczby falowej dla pacjenta P33 oraz zależność wag trzech czynników głównych w trójwymiarowym układzie współrzędnych dla zbioru danych pochodzących od pacjenta P33



**Rysunek 47.** Analiza PCA dla zbioru 70 pacjentów: (A) projekcja widm Ramana na płaszczyznę czynników PC1 oraz PC2, (B) projekcja wag czynnika PC1 w funkcji liczby falowej, (C) projekcja wag czynnika PC2 w funkcji liczby falowej

#### 4.4. Czulość i swoistość spektroskopii Ramana w analizie zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego

Jednym z głównych celów pracy było oszacowanie czulości i swoistości spektroskopii Ramana, a tym samym oszacowanie wiarygodności zastosowanej metody spektroskopowej.

Czulość (*ang. sensitivity*) opisuje odsetek wyników dodatnich testu diagnostycznego wśród osób faktycznie chorych. Są to tzw. wyniki prawdziwie dodatnie [94]. Test o dużej czulości gwarantuje niewielkie ryzyko przeoczenia choroby – jego wynik ujemny pozwala w dużym stopniu wykluczyć chorobę.

Swoistość (*ang. specificity*) opisuje odsetek wyników ujemnych wśród osób faktycznie zdrowych. Są to tzw. wyniki prawdziwie ujemne [94]. Dodatni wynik wysoce swoistego testu z dużym prawdopodobieństwem chorobę potwierdza.

Czulości i swoistości metody oszacowano dla widm z zakresu 200-3600  $\text{cm}^{-1}$  względem pasma przy częstości 1518  $\text{cm}^{-1}$  (pasma pochodzącego od karotenoidów) oraz 2854  $\text{cm}^{-1}$  (pasma pochodzącego od lipidów).

Czulość wyznaczona względem pasma pochodzącego od karotenoidów przy 1518  $\text{cm}^{-1}$  wyniosła 60%. Wartość ta ilustruje liczbę próbek zmian nowotworowych wykazujących brak pasma przy 1518  $\text{cm}^{-1}$  względem wszystkich próbek zmian nowotworowych.

Swoistość względem pasma 1518  $\text{cm}^{-1}$  wyniosła zaś 95% i została wyznaczona jako suma wszystkich widm, w których obserwowano pasmo 1518  $\text{cm}^{-1}$  względem wszystkich widm Ramana próbek gruczołu piersiowego o utkaniu prawidłowym.

Wyznaczona czulość metody względem pasma 2854  $\text{cm}^{-1}$  lipidów wyniosła 87%, a swoistość 89%.

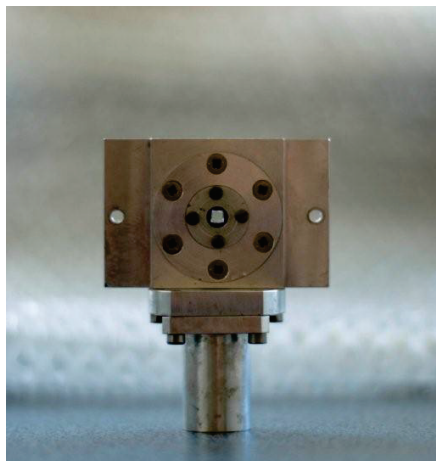
Czulość i swoistość zastosowanej metody spektroskopowej obliczono według poniższych wzorów:

$$\text{Czulość}_{\text{wzgl. karotenoidów lub lipidów}} = \frac{\text{liczba widm bez pasm karotenoidów lub lipidów pochodzących od próbek opisanych jako nowotworowa}}{\text{liczba wszystkich widm pochodzących od próbek opisanych jako nowotworowe}} \times 100\%$$

$$\text{Swoistość}_{\text{wzgl. karotenoidów lub lipidów}} = \frac{\text{liczba widm z pasmami karotenoidów lub lipidów pochodzących od próbek opisanych jako zdrowa}}{\text{liczba wszystkich widm pochodzących od próbek opisanych jako zdrowa}} \times 100\%$$

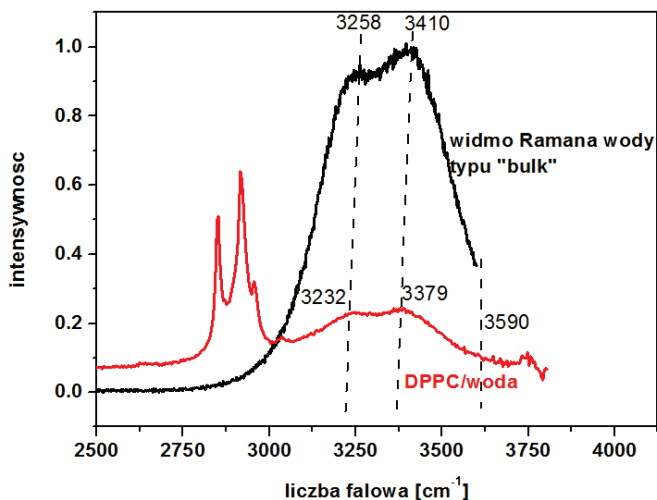
#### 4.5. Spektroskopia IR preparatów ludzkiego gruczołu piersiowego, DNA oraz lipidów na przykładzie DPPC w warunkach kontrolowanej wilgotności

Ze względu na kluczową rolę zakresu spektralnego charakterystycznego dla drgań cząsteczek wody w różnicowaniu tkanek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo, w celu głębszego scharakteryzowania oddziaływań cząsteczek wody z głównymi składkami budulcowymi komórek ludzkiego gruczołu piersiowego, w trakcie badań eksperymentalnych zarejestrowano także widma IR DPPC w funkcji kontrolowanej wilgotności próbki. Wybór DPPC był podyktowany faktem, iż związek ten jest głównym składnikiem ludzkich błon komórkowych. Pomiary wykonano dla wilgotności 100, 75, 23 oraz 0% przy zastosowaniu odpowiednio: czystej wody, wodnego nasyconego roztworu NaCl, wodnego nasyconego roztworu  $\text{CH}_3\text{COOK}$  i  $\text{P}_2\text{O}_5$ , które były umieszczone w specjalnym pojemniku będącym integralną częścią kuwety zaprojektowanej do pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii IR. Rysunek 48 przedstawia kuwetę, jaką wykorzystano w pomiarach o kontrolowanej wilgotności próbki.



**Rysunek 48.** *Kuweta wykorzystywana do pomiarów IR w funkcji kontrolowanej wilgotności próbki (źródło: materiały własne LLSM)*

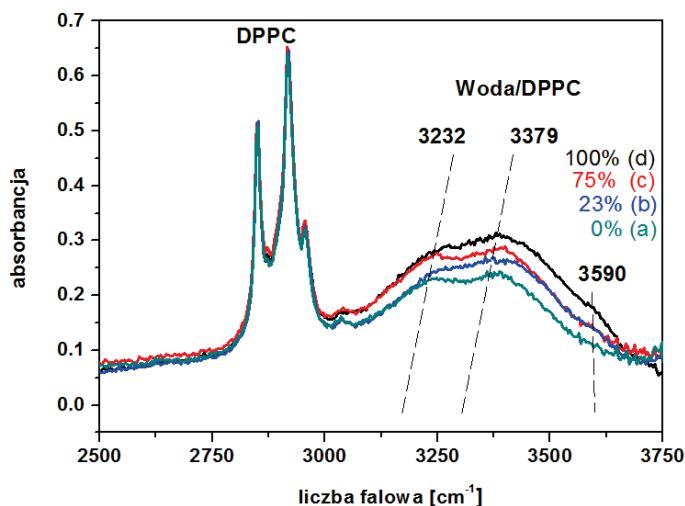
Zarejestrowanie widm DPPC na granicy faz DPPC-woda pozwoliło przeanalizować oddziaływania między cząsteczkami wody obecnymi w badanym układzie a cząsteczkami DPPC. Rysunek 49 przedstawia widma IR DPPC dla wilgotności 0% oraz wody typu ‘bulk’.



**Rysunek 49.** Widmo IR DPPC (wilgotności 0%) oraz widmo Ramana wody typu „bulk”

Jak widać na rysunku 49 położenia maksimum pasm przypisanych drganiom cząsteczek wody widocznych w układzie DPPC-woda są zupełnie inne niż w przypadku czystej wody typu „bulk”. Przy przejściu od wody typu „bulk” do wody związanej powierzchniowo z DPPC widoczne jest przesunięcie maksimum pasm przypisanych drganiom grup OH w stronę niższych liczb falowych od  $3258\text{ cm}^{-1}$  i  $3410\text{ cm}^{-1}$  do odpowiednio  $3232\text{ cm}^{-1}$  i  $3379\text{ cm}^{-1}$ . Podobne przesunięcie zaobserwowano także wykonując pomiary IR dla filmów DPPC dla wilgotności innych niż 0%. Rysunek 50, przedstawia widma DPPC dla wilgotności od 0 do 100%.

Na rysunku 50, podobnie jak na rysunku 49, położenia maksimum pasm przypisanych drganiom grupy OH wody ulegają przesunięciom w stronę niższych liczb falowych, przy czym przesunięcie jest tym większe, im mniejsza jest zawartość wody w badanym układzie. Dla wilgotności 0% można przyjąć, iż w układzie obecna jest jedynie woda międzyfazowa *ang.* „*interfacial water*”, natomiast dla wyższych wilgotności należy niewątpliwie rozpatrywać mieszaninę wody typu „bulk” i wody międzyfazowej. Obserwowane przesunięcie ku niższym liczbom falowym świadczy oczywiście o zmianie charakteru oddziaływań między cząsteczkami lipidu i wody na granicy faz, a tym samym o zmianie siły wiązań wodorowych występujących w badanej próbce.



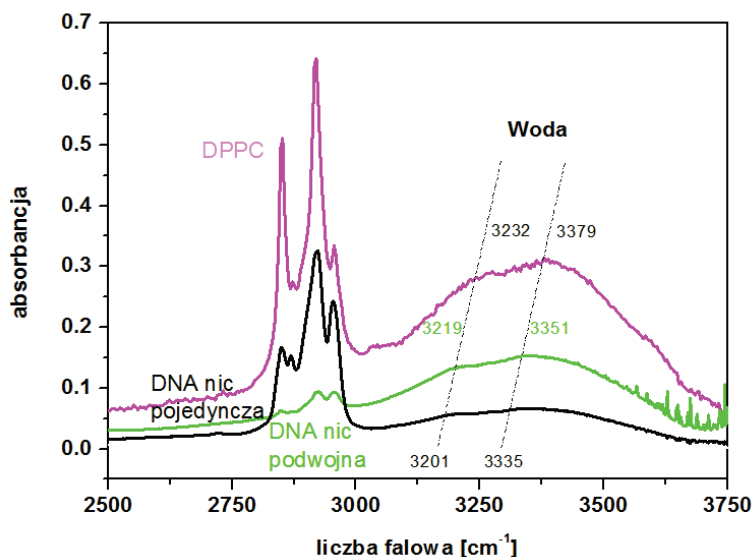
**Rysunek 50.** Widma IR układu DPPC-woda w funkcji wilgotności próbki od 0% do 100%

W literaturze pasmo przy ok.  $3200\text{ cm}^{-1}$  przyporządkowywane jest tetraedrycznie koordynowanym cząsteczkom wody zwanym również strukturą „ice-like” [95, 96]. Kolejne pasmo przy ok.  $3400\text{ cm}^{-1}$  jest natomiast przypisywane cząsteczkom wody o strukturze nieuporządkowanej, odpowiadającej luźniejszej niż w pierwszym przypadku strukturze wiązań wodorowych, zwanej strukturą „water-like” [95]. W układach fosfolipid-woda pierwsze pasmo przy ok.  $3200\text{ cm}^{-1}$  jest często przypisywane drganiu symetrycznemu grupy OH cząsteczek wody silnie oddziałujących z polarnymi „głowami” lipidów w warstwie bimolekularnej błon biologicznych [97], podczas gdy pasmo przy ok.  $3400\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się strukturze „water-like” [98].

Rysunek 51 przedstawia widma IR zakresu przypisanego drganiom grupy OH wody dla układów woda-DNA (nici pojedynczej i podwójnej) oraz DPPC-woda.

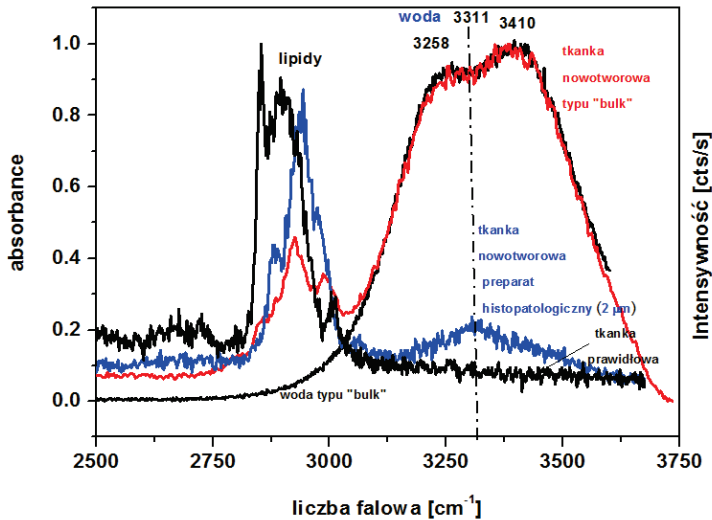
Jak widać na rysunku 51 sygnał pochodzący od wody międzyfazowej jest wrażliwy na strukturę układu biologicznego. Przesunięcie położenia maksimum w stronę niższych liczb falowych jest wyraźnie większe w przypadku DNA niż dla DPPC. Pasma przy ok.  $3220\text{ cm}^{-1}$  w układzie DNA-woda zinterpretowano jako superpozycję pasm przypisanych drganiu symetrycznemu grupy  $\text{NH}_2$  adeniny oraz drganiom rozciągającym grupy NH tyminy, natomiast pasmo przy

ok.  $3350\text{ cm}^{-1}$  jako pasmo pochodzące od drgań antysymetrycznych grupy  $\text{NH}_2$  [99]. Pasmo przypisane drganiom rozciągającym grupy OH wody międzyfazowej w pobliżu grupy fosforanowej DNA występuje przy około  $3550\text{ cm}^{-1}$ . Przesunięcia w stronę podczerwieni w porównaniu do wody typu „bulk” rzędu  $26$  i  $31\text{ cm}^{-1}$  dla pierwszego pasma w układzie fosfolipidy-woda oraz  $57\text{ cm}^{-1}$  i  $75\text{ cm}^{-1}$  dla drugiego pasma potwierdzają, że oddziaływania o charakterze wiązań wodorowych są w tym układzie o wiele silniejsze niż w czystej wodzie. Większe przesunięcie dla pojedynczej nici DNA w porównaniu z nicią podwójną potwierdza zaś fakt, że w przypadku pojedynczej nici DNA cząsteczki wody mają większą możliwość tworzenia wiązań wodorowych z tyminą lub adeniną dzięki mniejszej zawadzie przestrzennej.



**Rysunek 51.** Widma IR filmów DPPC-woda i DNA-woda

Strukturę pasm wibracyjnych przypisanych grupie OH wody przeanalizowano również dla preparatów histologicznych i tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego w postaci wycinków śródoperacyjnych. Rysunek 52 przedstawia widma wibracyjne zakresu odpowiadającego drganiom lipidów oraz drganiom rozciągającym grupy OH dla wody typu „bulk”, nowotworowej tkanki gruczołu piersiowego w postaci wycinka śródoperacyjnego, tkanki o budowie prawidłowej oraz tkanki zmienionej nowotworowo w postaci preparatów histologicznych grubości  $2\text{ }\mu\text{m}$  (IDC) [99].



**Rysunek 52.** *Widma wibracyjne zakresu odpowiadającego drganiom lipidów oraz drganiom rozciągającym grupy OH dla: wody typu „bulk”, nowotworowej tkanki gruczołu piersiowego w postaci wycinków śródoperacyjnych, tkanki o budowie prawidłowej oraz tkanki zmienionej nowotworowo w postaci preparatów histopatologicznych grubości  $2\mu\text{m}$  (IDC)*

Jak widać na rysunku 52 cząsteczki wody w tkance typu wycinków śródoperacyjnych reprezentują głównie wodę typu „bulk”. Oznacza to, że wiązka laserowa ma utrudniony dostęp do powierzchni międzyfazowej, bowiem warstwa hydratacyjna jest zbudowana zaledwie z kilku cząsteczek wody, przez co jej monitorowanie jest bardzo utrudnione.

Widma dla preparatów grubości kilku mikrometrów raka przewodowego naciekającego zarejestrowano by sprawdzić, czy sposób przygotowania próbek ma wpływ na widma wibracyjne wody obecnej w badanych tkankach ludzkich. Szczegółowa analiza zakresu odpowiadającego drganiom rozciągającym grupy OH przedstawionego na rysunku 52 pozwala zauważyć, że w przypadku preparatów grubości kilku mikrometrów zamiast dwóch pasm o położeniu maksimum przy  $3258\text{ cm}^{-1}$  i  $3410\text{ cm}^{-1}$  widoczne jest tylko jedno pasmo o położeniu maksimum  $3311\text{ cm}^{-1}$ , które nie wykazuje żadnych dodatkowych składowych przy próbie dekonwolucji. Spostrzeżenie to potwierdza, że jedynie analiza preparatów o grubości kilku mikrometrów stwarza możliwości analizy własności wody w pobliżu powierzchni międzyfazowej, które różnią się znacznie od własności wody typu „bulk”. Zarejestrowanie pojedynczego pasma przy  $3311\text{ cm}^{-1}$  dla preparatu tkanki zmienionej nowotworowo wskazuje też na odmienne reguły wyboru dla cząsteczek wody na granicy



faz tkanka-woda. Sytuacje tę można porównać z efektem SERS z tą różnicą, że brak jest wzmocnienia powodowanego obecnością atomów metalu. Podsumowując, pasmo  $3311\text{ cm}^{-1}$  można przypisać drganiu antysymetrycznemu grupy OH na granicy faz woda-błona biologiczna [99].

#### **4.6. Spektroskopia UV-Vis, spektroskopia femtosekundowa na granicy faz fotouczulacz-komórki ludzkiego gruczołu piersiowego**

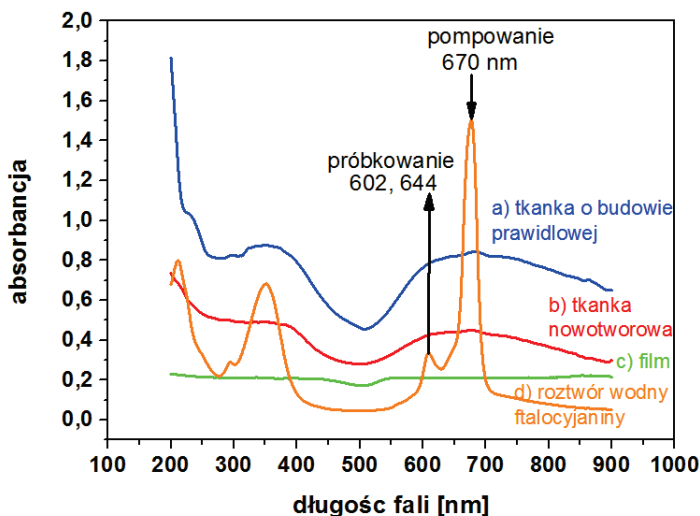
Kolejnym celem podjętych badań było wyjaśnienie mechanizmów dyssypacji energii na granicy faz fotouczulacz-komórki ludzkiego gruczołu piersiowego z wykorzystaniem stacjonarnej spektroskopii UV-Vis oraz femtosekundowej spektroskopii absorpcyjnej techniką wiązki pompującej i sondującej [100].

Podjęcie badań dotyczących filmów ftalocyjanin na powierzchni wytworzonej z komórek ludzkiego gruczołu piersiowego pozwoliło nie tylko scharakteryzować własności fotouczulacza na granicy faz fotouczulacz-tkanka piersi ludzkiej, ale zwróciło także uwagę na własności ftalocyjanin w fazach skondensowanych. Często wnioski wyciągnięte dla roztworów ftalocyjanin przenosi się bezpośrednio na fazy skondensowane, jak np. filmy deponowane na różnych podłożach. Nie jest to jednak podejście słuszne, a kanały relaksacji energii w fazach skondensowanych są całkowicie odmienne w porównaniu z roztworami [100].

Rysunek 53 przedstawia widma UV-Vis filmów ftalocyjaniny AlPcS<sub>4</sub> wytworzonych na podłożu z komórek prawidłowych i nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego osadzonych na BaF<sub>2</sub>, filmu AlPcS<sub>4</sub> wytworzonego na BaF<sub>2</sub> niewzbożonym o warstwę tkanki piersi ludzkiej oraz roztworu wodnego tej ftalocyjaniny. Jak widać z rysunku 53 pasmo Soreta i pasmo Q było obserwowane dla roztworu ftalocyjaniny przy długości fal odpowiednio 340 nm i 678 nm. Pasma Q odpowiadające przejściu ( $S_0 \rightarrow S_1$ , ( $a_{2u}$ ) $\rightarrow$ ( $e_g$ )) w roztworze wykazuje bardzo wąskie maksimum przy 678 nm oraz słabsze pasma boczne przy 643 nm i 607 nm. W przypadku filmów pasma rejestrowane dla AlPcS<sub>4</sub> są zaś bardzo szerokie. Stężenie ftalocyjaniny w filmie fotouczulacza przy założeniu jego grubości 100  $\mu\text{m}$  oszacowano na około  $10^{-2}\text{ M}$ , w związku z tym dokonując interpretacji otrzymanych wyników słuszne było wzięcie pod uwagę tendencji ftalocyjanin do agregacji w fazie skondensowanej.

Agregacja ftalocyjanin była badana z wykorzystaniem metod optycznych m.in. przez Tran-Thi [101] w latach 90. XX w. Literatura dostarcza wielu przykładów, iż dimeryzacja ftalocyjanin znacząco wpływa na dynamikę femtosekundową tej klasy związków, czasy życia stanów wzbudzonych homodimerów ftalocyjanin są znacznie

krótsze w porównaniu do monomerów, a przeniesienie ładunku między ligandami jest wówczas często efektywnym kanałem relaksacji energii.



**Rysunek 53.** Widma UV-Vis filmu ftalocyjaniny  $AlPcS_4$  na podłożu z komórek gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej a), nowotworowej b), czystego filmu  $AlPcS_4$  c) oraz roztworu wodnego  $AlPcS_4$  o stężeniu  $10^{-3}$  M d) [100]

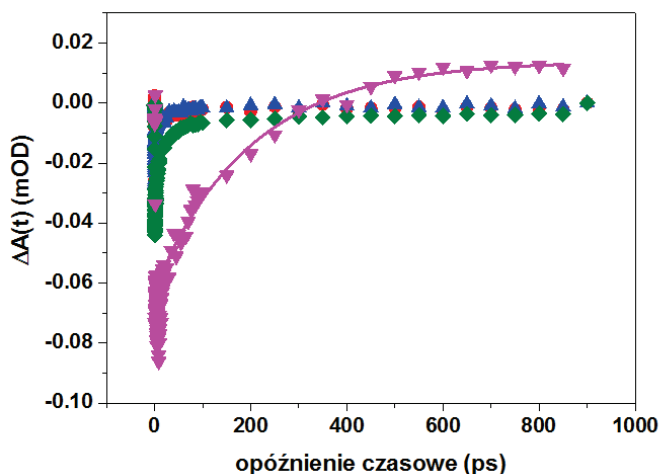
Nikolaitchik i wsp. [102] wykazali m.in., że w przypadku dimerów koplarnych, zgodnie z teorią ekscytonów, przejścia między stanem podstawowym i najniższym stanem wzbudzonym są zabronione ze względu na symetrię przejścia, a brak fluorescencji w takich układach oznacza, iż wyższy stan wzbudzony szybko relaksuje do stanu niższego, który podlega sekwencji przemian bezpromienistych z uwzględnieniem przejść międzysystemowych. Nikolaitchik i wsp. udowodnili także, że brak fluorescencji w układach dimerów kofacjalnych łączy się z obniżeniem wydajności kwantowej przejścia do stanu trypletowego i skróceniem czasów życia stanu trypletowego oraz drastycznym wzrostem stałych konwersji wewnętrznej nawet o 200-300 razy. Wzrost stałych konwersji wewnętrznej może być zaś związany z faktem, że rozszczepienie ekscytonowe powoduje przesunięcie niższego stanu ekscytonowego bliżej stanu podstawowego. Wzrost wartości stałych przejścia międzysystemowego może wiązać się także ze zmniejszeniem przerwy energetycznej między najniższym stanem ekscytonu i stanu trypletowego [102]. Podobne obserwacje poczynił Ma i wsp. [103] dla ftalocyjaniny żelaza. Ma wykazał bowiem, że w fazach skondensowanych efektywne oddziaływania międzycząsteczkowe prowadzą do skrócenia czasów życia stanów wzbudzonych i wysokiej wydajności

przejsć międzysystemowych. Wpływ agregacji ftalocyjanin na dynamikę wibracyjną tej klasy związków badali także Peyghambarian i wsp. [104], sugerując znaczącą rolę stanów przejściowych w relaksacji ekscytonów. Dimery ftalocyjanin charakteryzujące się fluorescencją badali natomiast Speirs i współp. [105], a w badaniach swych wykazali, że relaksacja promienista jest typowa dla dimerów o symetrii odchylonej od koplanej.

Pomiary z wykorzystaniem spektroskopii rozdzielczej w czasie dla  $\text{AlPcS}_4$  wykonano z wykorzystaniem impulsów o długości trwania około 50 fs. i długości fali 677 nm inicjującej przejście  $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $(a_{2u}) \rightarrow (e_g)$ , czyli przejście w zakresie pasma Q.

Cząsteczki wzbudzone promieniowaniem o długości fali 677 nm analizowano dla różnych długości fal próbkujących: 602 nm, 644 nm, 670 nm.

Rysunek 54 przedstawia widma absorpcji przejściowej  $\Delta A(t)$   $\text{AlPcS}_4$  zdeponowanej na komórkach ludzkiego gruczołu piersiowego, czystego filmu ftalocyjaniny  $\text{AlPcS}_4$  oraz roztworu ftalocyjaniny w funkcji opóźnienia czasowego między wiązką pompującą i sondującą dla linii wzbudzenia 677 nm i wiązki próbkującej o długości fali 664 nm [100].



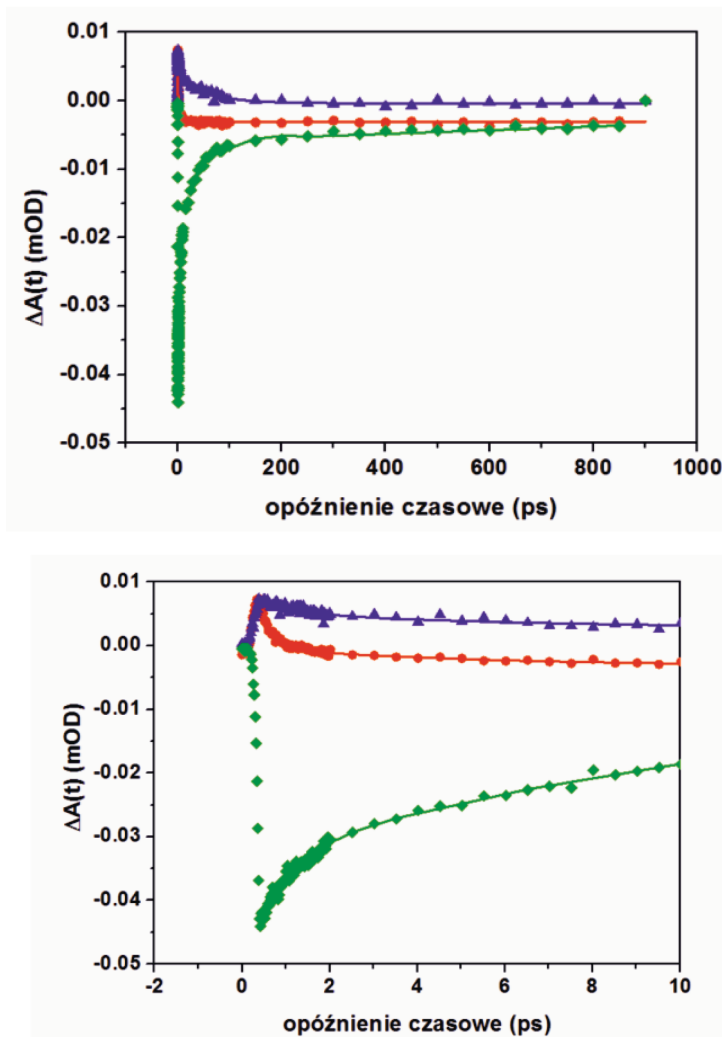
**Rysunek 54.** Widma absorpcji przejściowej  $\Delta A(t)$   $\text{AlPcS}_4$  zdeponowanej na komórkach ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej (●), nowotworowej (▲), czystego filmu ftalocyjaniny (◆) oraz roztworu  $\text{AlPcS}_4$  ( $c = 10^{-3}$  M) (▼) w funkcji opóźnienia czasowego między wiązką pompującą i sondującą dla linii wzbudzenia 677 nm i linii próbkującej 670 nm [100]

Jak widać na rysunku 54 dla filmów  $\text{AlPcS}_4$  wytworzonych na podłożu z komórek ludzkiego gruczołu piersiowego natychmiast po wzbudzeniu wiązką o długości fali 677 nm dla wiązki próbkującej o długości fali 670 nm rejestrowano

sygnał ujemny. Sygnał ten przypisano wybieleniu stanu podstawowego ftalocyjaniny  $S_0$  związanego z przejściami  $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $(a_{2u}) \rightarrow (e_g)$  w ramach pasma Q. Wybielenie następowało natychmiast po wzbudzeniu, w skali czasowej korespondującej do czasu trwania impulsu. Powrót do stanu podstawowego opisano trzema funkcjami wykładniczymi o stałych czasowych:  $130 \pm 0.10$  fs,  $1.53 \pm 0.19$  ps, i  $37.86 \pm 5.25$  ps dla tkanki nowotworowej oraz  $110 \pm 0.10$  fs,  $1.34 \pm 0.16$  ps, i  $40.72 \pm 7.86$  ps dla tkanki o budowie prawidłowej. Dla czystych filmów ftalocyjaniny  $AlPcS_4$  wyznaczono stałe czasowe na poziomie  $830 \pm 100$  fs,  $7.31 \pm 1.02$  ps, i  $56.03 \pm 6.58$  ps. dla roztworu zaś szczególnie charakterystyczną okazała się stała czasowa równa  $232.52 \pm 81.00$  ps. Oznacza to, że stałe czasowe charakterystyczne dla  $AlPcS_4$  na granicy faz fotouczulacz-tkanki piersi ludzkiej są zbliżone dla podłoża z komórek o utkaniu prawidłowym i zmienionych patologicznie i są o wiele krótsze niż dla czystego filmu  $AlPcS_4$  oraz roztworu tej ftalocyjaniny [100]. Stałe czasowe wyznaczone dla roztworu wodnego  $AlPcS_4$  dla przybliżenia funkcją dwuwykładniczą wynoszą  $5.09 \pm 0.99$  ps, i  $203.16 \pm 18.75$  ps [106], zaś dla funkcji trójwykładniczej równe są  $4.27 \pm 1.68$  ps,  $47.21 \pm 124.44$  i  $232.52 \pm 81.00$  ps [107]. Stałe czasowe dla roztworu wodnego  $AlPcS_4$  pozostają w zgodzie z danymi otrzymanymi przez Howe i wsp. [45] dla  $PcS_4$  i  $ZnPcS_4$  w DMSO dla wiązek sondujących o długości fali 720, 790, 820 nm.

Podsumowując, jak widać na rysunku 54 dynamika  $AlPcS_4$  w układach biologicznych jest o wiele szybsza niż w roztworze. Spostrzeżenie to po raz kolejny zwraca uwagę na fakt, iż agregacja ftalocyjanin wpływa na dynamikę relaksacji fotouczulacza, a wnioski słuszne w przypadku roztworów nie muszą pozostawać prawdziwe w przypadku filmów ftalocyjanin.

Rysunek 55 przedstawia wyniki otrzymane dla wiązki próbującej o długości fali 602 nm. Sygnał dodatni obserwowany dla tej długości fali przypisano absorpcji ze stanu wzbudzonego (ESA, *ang. excited state absorption*), czyli stanu  $S_1$  obsadzanego w drodze przejścia  $S_0 \rightarrow S_1$  w obrębie pasma Q. Wyniki pokazują jednoznacznie, że dynamika  $AlPcS_4$  na podłożu z komórek prawidłowych ludzkiego gruczołu piersiowego jest szybsza niż w przypadku komórek nowotworowych. Dla próbek zawierających komórki nowotworowe stałe czasowe oszacowano na poziomie  $810 \pm 40$  fs,  $5.63 \pm 5.49$  ps,  $59.90 \pm 12.85$  ps, zaś dla tkanki o utkaniu prawidłowym otrzymano stałe równe:  $176 \pm 20$  fs,  $847 \pm 422$  fs,  $6.03 \pm 1.92$  ps [100]. Jak widać na rysunku 55 ponownie dynamika dla próbek zawierających podłoże z tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego jest szybsza niż dla czystego filmu  $AlPcS_4$ . Spostrzeżenie to po raz kolejny zwraca uwagę na fakt, iż agregacja ftalocyjanin wpływa na dynamikę relaksacji fotouczulacza [100].



**Rysunek 55.** Widma absorpcji przejściowej  $\Delta A(t)$  AlPcS<sub>4</sub> zdeponowanej na komórkach ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej (●), nowotworowej (▲) oraz czystego filmu AlPcS<sub>4</sub> (◆) w funkcji opóźnienia czasowego między wiązką pompującą i sondującą dla linii wzbudzenia 677 nm i linii próbującej 602 nm [100]

Tabela 2 zawiera porównanie stałych czasowych charakterystycznych dla relaksacji stanu wzbudzonego S<sub>1</sub> AlPcS<sub>4</sub> w postaci filmu wytworzonego na podłożu z komórek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i nowotworowej, czystego filmu AlPcS<sub>4</sub> oraz roztworu dla linii wzbudzenia 677 nm i linii próbującej 602 nm.

Tabela 2. Porównanie stałych czasowych charakterystycznych dla relaksacji stanu wzbudzonego  $S_1$  AlPcS<sub>4</sub> w postaci filmu wytworzonego na podłożu z komórek ludzkiego gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i nowotworowej, czystego filmu AlPcS<sub>4</sub> oraz roztworu dla linii wzbudzenia 677 nm i linii próbującej 602 nm

| AlPcS <sub>4</sub>           | Stałe czasowe |             |                |                  |                 |
|------------------------------|---------------|-------------|----------------|------------------|-----------------|
| Tkanka o budowie prawidłowej | 176±20 fs     | 847±422 fs  | 6.03±1.92 ps   |                  |                 |
| Tkanka nowotworowa           |               | 810 ± 40 fs | 5.63 ± 5.49 ps | 59.90 ± 12.85 ps |                 |
| Film                         | 163±25 fs     |             | 1.56±0.42 ps   | 21.59±4.14 ps    |                 |
| Roztwór <sup>106</sup>       | 560 ± 94 fs   |             | 2.37±0.71 ps   | 28.07±24.18 ps   | 345.81±107.87ps |

Jak widać w tabeli 2 dynamika stanu wzbudzonego  $S_1$  dla tkanki o utkaniu prawidłowym jest o wiele szybsza niż dla komórek nowotworowych. Dynamika dla tkanki prawidłowej opisana stałymi czasowymi 176±20 fs, 847±422 fs, 6.03±1.92 ps nie zawiera długiej stałej czasowej charakterystycznej dla tkanki nowotworowej (59.90 ±12.85 ps), czystego filmu AlPcS<sub>4</sub> (21.59±4.14 ps) i roztworu (28.07±24.18 ps, 345.81±107.87ps).

Zgodnie z przedstawionymi dotychczas wynikami dynamika AlPcS<sub>4</sub> w stanie wzbudzonym jest opisana trzema stałymi czasowymi: a) bardzo szybką składową o czasie trwania kilkuset femtosekund, b) stałą o czasie trwania kilku ps oraz c) stałą o wymiarze 20-60 ps, w roztworze obserwowano dodatkową stałą czasową rzędu kilkuset pikosekund. Femtosekundowa stała czasowa jest interpretowana w literaturze w różny sposób [107, 108]. Savolainen i wsp. [107] przypisują najkrótszą stałą czasową procesom odpowiedzi dielektrycznej układu związanej z solwatacją, Fournier i wsp. [108] przypisali zaś tę stałą, obserwowaną dla NiPc i CuPc, do czasu charakterystycznego dla konwersji wewnętrznej  $S_2 \rightarrow S_1$ , Rao i współp. [109] przypisują stałą < 170 fs relaksacji w ramach stanu  $S_n$ . Wyniki otrzymane w LLSM dla AlPcS<sub>4</sub> w roztworach wodnych i rozpuszczalnikach organicznych wykazują jednak, że najszybsza składowa nie jest wrażliwa na dynamikę solwatacji, ponieważ stałe czasowe nie zależą od rozpuszczalnika [106]. Dlatego nie wydaje się słuszne przypisywanie tej stałej odpowiedzi dielektrycznej w procesie solwatacji. Stałą femtosekundową składową sygnału ESA dla AlPcS<sub>4</sub> w roztworze przypisano dynamice wibracyjnej paczki falowej dla wyższych stanów elektronowych generowanych natychmiast po wzbudzeniu.

Podsumowując, szczegółowa analiza stałych czasowych otrzymanych dla wiązki pompującej o długości fali 677 nm i wiązek próbkujących o długościach fal 670 i 602 nm pozwala zauważyć, że dynamika w fazie skondensowanej na granicy faz fotouczulacz-tkanka jest całkowicie inna niż w przypadku roztworów. Ponieważ ultraszybka składowa rzędu kilkuset femtosekund jest widoczna tak dla wzbudzonego stanu  $S_1$  próbkowanego przy 602 nm, jak i stanu podstawowego próbkowanego przy 670 nm, oznacza to, że interpretacja słuszna dla roztworu nie może być przeniesiona na fazę stałą. Wziąwszy pod uwagę, że nie stwierdzono długiej stałej czasowej dla układu AlRcS<sub>4</sub>-tkanka gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej typowej dla roztworów (232 ps [106], 2.9 ns [107], [45]), możliwe jest, że ultraszybka składowa 110 fs obserwowana w tkance nie-nowotworowej odpowiada specyficznemu kanałowi relaksacji energii na drodze relaksacji bezpromienistej w postaci przejść stożkowych [108]. W przypadku tkanki nowotworowej składowa 110 fs nie była obserwowana w procesie relaksacji wzbudzonego stanu  $S_1$  (tabela 2). Stała czasowa 810 fs, która jest znacząco dłuższa, musi więc bezpośrednio odzwierciedlać odmienne drogi relaksacji energii w układzie AlPcS<sub>4</sub>-tkanka nowotworowa. Jak wiadomo efektywność działania fotouczulaczy ftalocyjaninowych w terapii PDT wiąże się z przekazywaniem energii wzbudzenia fotouczulacza do stanu podstawowego cząsteczek tlenu (stanu trypletowego) z wytworzeniem tlenu singletowego. W tym typie reakcji fotouczulacz podlega przejściu intersystemowemu ze stanu  $S_1$  do stanu  $T_1$  z ostatecznym odtworzeniem stanu  $S_0$ .

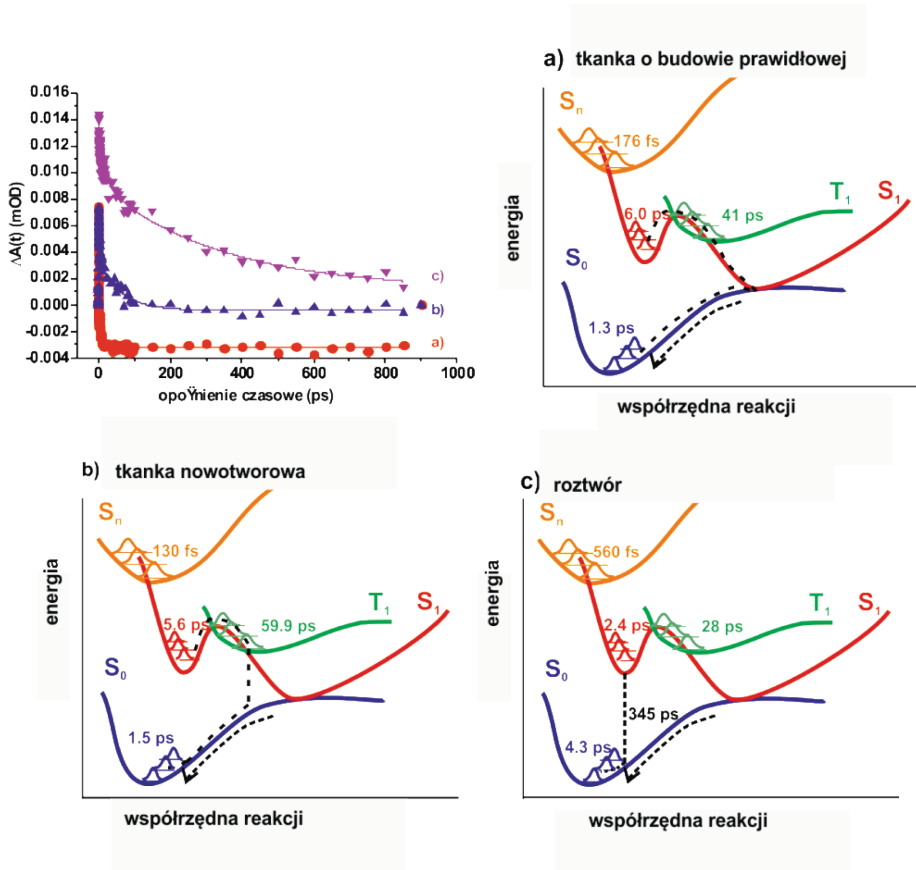
Składowej  $847 \pm 422$  fs nie obserwowano także w tkance prawidłowej potwierdzając, że dynamika stanów wzbudzonych w przypadku tkanki o utkaniu prawidłowym jest zdominowana przez składową ultraszybką 176 fs związaną z przejściami stożkowymi.

Rysunek 56 przedstawia główne kanały relaksacji energii w roztworze i układzie biologicznym. W roztworze, po wzbudzeniu stan  $S_1$  fotouczulacza relaksuje ze stałą czasową 560 fs w reżimie Francka-Condon i obserwowany jest powrót do stanu podstawowego  $S_0$  na drodze fluorescencji z czasem życia w stanie wzbudzonym 345 ps. Drugi kanał relaksacji prowadzi przez przejście międzysystemowe do stanu  $T_1$ , który relaksuje następnie do stanu  $S_0$  na drodze fosfofluorescencji z czasem życia trypletu rzędu 28 ps.

W przypadku układu tkanka nowotworowa-AlPcS<sub>4</sub> po absorpcji fotonu obserwowano bardzo szybką relaksację w ramach stanów  $S_n$ , po której następowało przejście międzysystemowe do stanu trypletowego, z czasem życia w stanie wzbudzonym  $T_1$  rzędu 59.9 ps i powrót do stanu  $S_0$  na drodze fosfofluorescencji, drugi kanał relaksacji obejmował zaś relaksację wibracyjną w stanie  $S_1$  ze stałą

czasową równą 5.6 ps, po której obserwowano przejście stożkowe do stanu  $S_0$  z relaksacją wibracyjną w tym stanie o stałej czasowej rzędu 1.5 ps.

W tkance o budowie prawidłowej również obserwowano dwa kanały relaksacji energii. Główny kanał relaksacji jest związany z przejściami bezpromienistymi na drodze przejścia stożkowego i jest charakteryzowany przez stałe czasowe rzędu 176 fs i 6 ps odpowiadające relaksacji paczki falowej w reżymie Franka-Conдона w stanie  $S_1$  i relaksacji wibracyjnej w ramach stanu  $S_1$ . Relaksacja w ramach stanu  $S_0$  została opisana stałą czasową równą 1.3 ps. Drugi kanał relaksacji obejmował zaś przejście międzysystemowe do stanu  $T_1$  z czasem życia w stanie trypletowym  $T_1$  równym 41 ps [100]. Główne kanały relaksacji energii w układach biologicznych ALPcS<sub>4</sub> – tkanki piersi ludzkiej i roztworze ALPcS<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>O przedstawia rysunek 56.



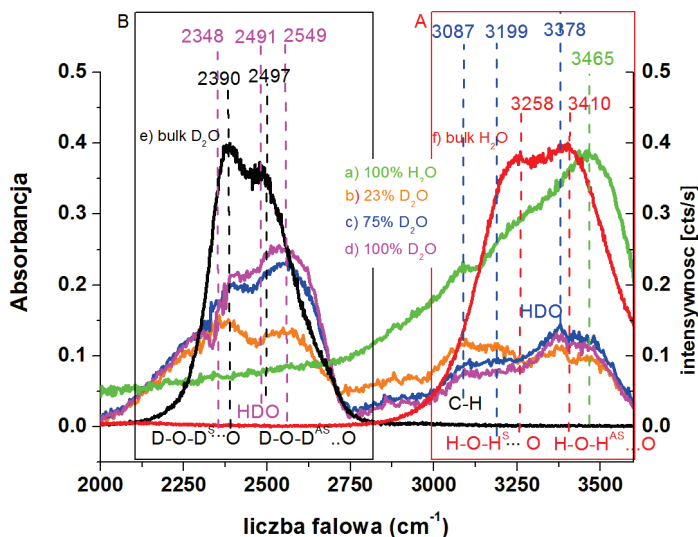
**Rysunek 56.** Główne kanały relaksacji energii w układach biologicznych ALPcS<sub>4</sub> – tkanki piersi ludzkiej i roztworze ALPcS<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>O [100]



## 4.7. Spektroskopia IR filmów ftalocyjaniny glinu

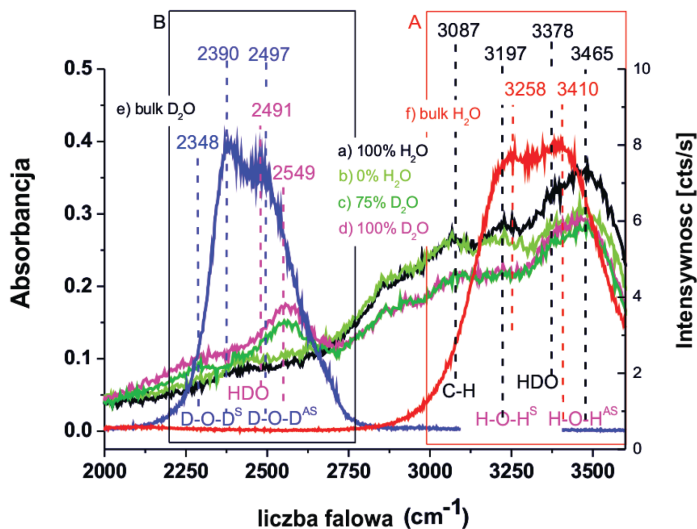
W ramach analizy oddziaływań cząsteczek wody z fotouczulaczami przeanalizowano także widma wibracyjne AlPcS<sub>4</sub> w postaci filmów wytworzonych na podłożu z azotku krzemu z zastosowaniem spektroskopii IR. W analizie wykorzystano okienka z azotku krzemu, ponieważ materiał ten charakteryzuje się wysoką transmitancją w szerokim zakresie spektralnym. Pomiary wykonano dla filmów tetrasulfonowanej ftalocyjaniny glinu w postaci kwasu oraz soli czterosodowej. W pomiarach wykorzystano kuetę, nasycone roztwory NaCl i CH<sub>3</sub>COOK oraz P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> jakie stosowano w analizie widm IR tkanek gruczołu piersiowego, DNA i DPPC w pomiarach o kontrolowanej wilgotności.

Rysunek 57 przedstawia widma IR ftalocyjaniny glinu w postaci kwasu w funkcji kontrolowanej wilgotności próbki.



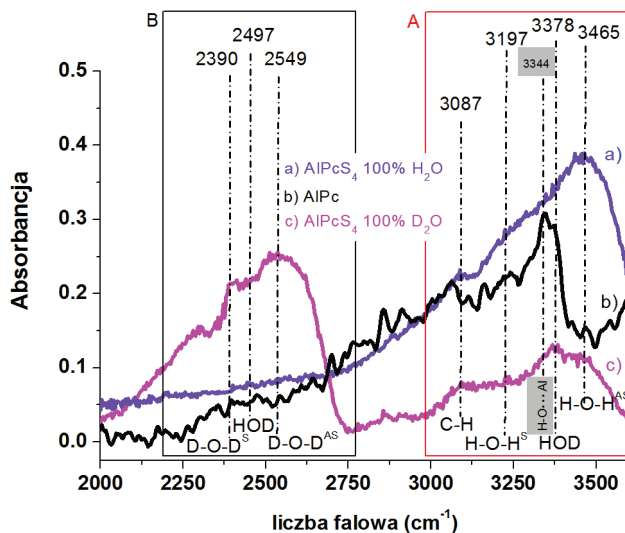
**Rysunek 57.** Widma IR ftalocyjaniny glinu w postaci kwasu w funkcji kontrolowanej wilgotności próbki oraz widmo Ramana wody typu „bulk” [110]

Podobną analizę wykonano dla ftalocyjaniny glinu w postaci tetrasulfonowanej soli czterosodowej. Rysunek 58 przedstawia widma IR ftalocyjaniny glinu w postaci soli w funkcji kontrolowanej wilgotności próbki oraz widmo Raman wody typu „bulk”.



**Rysunek 58.** Widma IR ftalocyjaniny glinu w postaci soli w funkcji wilgotności próbki oraz widmo Ramana wody typu „bulk” [110]

Analiza widm IR objęła także wykonanie pomiarów dla niesulfonowanej ftalocyjaniny glinu celem zbadania wpływu podstawników w makrocyklu fotoczułacza na widma z zakresu IR. Wyniki otrzymane dla niesulfonowanej ftalocyjaniny glinu przedstawia rysunek 59.



**Rysunek 59.** Porównanie widm IR tetrasulfonowanej ftalocyjaniny glinu oraz ftalocyjaniny niesulfonowanej [110]

Szczegółowa analiza widm IR przedstawionych na rysunkach 57-59 pozwala na wyciągnięcie następujących wniosków: własności wibracyjne hydratowanych filmów ftalocyjanin silnie zależą od rodzaju podstawników oraz obecności metalu centralnego, a drgania grupy OH mogą być wykorzystywane jako próbniki oddziaływań o charakterze wiązań wodorowych w filmach ftalocyjaniny glinu między makrocyklem cząsteczki ftalocyjaniny a cząsteczkami wody obecnymi w badanym układzie.

Analiza widm IR pozwala także zidentyfikować drgania OH zaangażowane w wiązania wodorowe utworzone z grupą sulfonową i atomem centralnym ftalocyjaniny glinu, pasmo  $3197\text{ cm}^{-1}$  w widmach IR filmów ftalocyjaniny glinu przypisano drganiom symetrycznym cząsteczek wody związanych wiązaniem wodorowym z obszarami hydrofilowymi (grupami sulfonowymi) makrocyklu ftalocyjaniny. Położenie tego pasma jest identyczne z położeniem pasm drgań symetrycznych grupy OH wody typu „bulk”. Pasma  $3465\text{ cm}^{-1}$  w filmach ftalocyjaniny glinu przypisano zaś drganiom antysymetrycznym cząsteczek wody zaangażowanym w tworzenie wiązania wodorowego z grupami sulfonowymi makrocyklu ftalocyjaniny. Pasma te są znacząco przesunięte w porównaniu z drganiami antysymetrycznymi wody typu „bulk”, obserwowanymi dla wody w masie przy  $3410\text{ cm}^{-1}$ . Pasma  $3197\text{ cm}^{-1}$  przypisano więc drganiu typu symetrycznego silniej uporządkowanej wody międzyfazowej, zaś pasma  $3465\text{ cm}^{-1}$  pasmu typu antysymetrycznego wody o strukturze mniej uporządkowanej, czyli o strukturze, w której układ tetraedyczny wiązań wodorowych został zakłócony przez makrocykl ftalocyjaniny. Pasma  $3344\text{ cm}^{-1}$  przypisano cząsteczkom wody oddziałującym z atomem centralnym makrocyklu, pasma  $3378\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2491\text{ cm}^{-1}$  przyporządkowano drganiom OH oraz OD cząsteczek HDO w układach zdeuterowanych [110].

Analiza widm wibracyjnych ftalocyjaniny glinu, w tym z zastosowaniem deuterowania pozwoliła więc na identyfikację oddziaływań zachodzących między cząsteczkami wody a makrocyklem ftalocyjaniny glinu.

## 5. PODSUMOWANIE I WIOSKI

Wyniki badań eksperymentalnych otrzymanych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, obrazowania Ramana, spektroskopii IR, spektroskopii UV-Vis oraz laserowej spektroskopii femtosekundowej zaprezentowane w niniejszej rozprawie jednoznacznie potwierdzają użyteczność metod spektroskopowych w identyfikacji i biochemicznej charakteryzacji zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego, analizie własności fotouczulaczy na przykładzie metaloftalocyjanin: cynku, magnezu, miedzi i glinu oraz analizie mechanizmów dyssypacji energii w układach fotouczulacz-tkanki piersi ludzkiej.

Szczegółowe wnioski wypływające z przeprowadzonych badań są następujące: spektroskopia Ramana umożliwia identyfikację zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego w oparciu o identyfikację charakterystycznych pasm Ramana tkanek o utkaniu prawidłowym pochodzących od karotenoidów (drżania wahadłowego grupy  $\text{CH}_3$  sprzężonego z drżaniem rozciągającym C-C ( $1004 \text{ cm}^{-1}$ ), drżania rozciągającego C-C łańcucha ( $1158 \text{ cm}^{-1}$ ), drżania rozciągającego C=C ( $1518 \text{ cm}^{-1}$ ), lipidów (C-H drżania rozciągające ( $2800\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ )) oraz wody. W widmach Ramana wycinków gruczołu piersiowego ze zdiagnozowaną zmianą nowotworową otrzymanych z zastosowaniem spektrometru niesprężonego z mikroskopem nie obserwuje się pasm wibracyjnych, jedynie dwa lub jedno poszerzone pasmo pochodzące od autofluorescencji tkanki. Intensywność autofluorescencji tkanek nowotworowych o zmianach złośliwych jest znacząco wyższa niż tkanek o utkaniu prawidłowym. Intensywność autofluorescencji tkanek nowotworowych o zmianach łagodnych jest zaś porównywalna z tkankami o utkaniu prawidłowym. Przedstawione w rozprawie obrazowanie Ramana próbek w postaci wycinków śródoperacyjnych, jak i preparatów histologicznych o grubości kilku mikrometrów potwierdza zdolność spektroskopii Ramana sprzężonej z mikroskopem do różnicowania zmian nowotworowych od tkanek o budowie prawidłowej i potwierdza niehomogeniczny rozkład składników biochemicznych w analizowanych próbkach, takich jak karotenoidy, lipidy, białka i woda.

Porównanie widm Ramana tkanek o budowie prawidłowej i zmienionych nowotworowo z widmami Ramana wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wykazuje dominującą rolę kwasów  $\omega$ -3 w profilu widm tkanek o budowie prawidłowej i kwasów  $\omega$ -6 oraz białek w widmach tkanek o budowie nowotworowej.

Analiza PCA umożliwia interpretację otrzymanych wyników poprzez wizualizację graficzną zawartych w widmach informacji. Analiza PCA potwierdza dominującą rolę pasm karotenoidów, lipidów, białek i wody w różnicowaniu widm gruczołu piersiowego o budowie prawidłowej i zmienionej nowotworowo.

Konfokalna mikroskopia ramanowska wycinków śródoperacyjnych sutka zmienionych nowotworowo wykazuje obecność pasm wody przy częstościach 3258 i 3410  $\text{cm}^{-1}$ , a dla preparatu histologicznego obserwuje się pojedyncze pasmo przy 3311  $\text{cm}^{-1}$ . Cząsteczki wody badane w przypadku wycinków śródoperacyjnych reprezentują więc głównie wodę typu „bulk”. Wynika to z faktu, że wiązka laserowa ma utrudniony dostęp do powierzchni międzyfazowej, bowiem warstwa hydratacyjna jest zbudowana zaledwie z kilku cząsteczek wody. Analiza preparatów histopatologicznych o grubości 2-10  $\mu\text{m}$  stwarza możliwości analizy własności wody w pobliżu powierzchni międzyfazowej, które różnią się znacznie od własności wody w masie.

Spektroskopia Ramana oraz obrazowanie Ramana pozwalają także śledzić procesy akumulacji i agregacji ftalocyjanin w tkankach ludzkiego gruczołu piersiowego. Własności wibracyjne hydratowanych filmów ftalocyjaniny glinu silnie zależą od rodzaju podstawników oraz obecności metalu centralnego w makrocyklu. Drgania grupy OH mogą być wykorzystywane jako próbnik oddziaływań o charakterze wiązań wodorowych w filmach ftalocyjaniny glinu. Zastosowanie techniki IR pozwala na zidentyfikowanie drgań grupy OH zaangażowanych w wiązania wodorowe tworzone z grupą sulfonową i atomem centralnym ftalocyjaniny glinu. Pasma 3197  $\text{cm}^{-1}$  w widmach IR filmów ftalocyjaniny glinu zostało przypisane do drgań symetrycznych cząsteczek wody związanych wiązaniem wodorowym z obszarami hydrofilowymi (grupami sulfonowymi) makrocyklu ftalocyjaniny glinu. Położenie pasma 3197  $\text{cm}^{-1}$  w filmach AlPcS<sub>4</sub> jest identyczne z położeniem drgań symetrycznych grupy OH wody typu „bulk”. Pasma 3465  $\text{cm}^{-1}$  w filmach ftalocyjaniny glinu zostało przypisane drganiom antysymetrycznym cząsteczek wody zaangażowanych w tworzenie wiązania wodorowego z grupami sulfonowymi makrocyklu ftalocyjaniny. Pasma 3465  $\text{cm}^{-1}$  widoczne dla filmów ftalocyjaniny glinu jest znacząco przesunięte w porównaniu z drganiami antysymetrycznymi wody typu „bulk” obserwowanymi dla wody w masie przy 3410  $\text{cm}^{-1}$ . Pasma 3197  $\text{cm}^{-1}$  w filmach ftalocyjaniny glinu zostało przypisane drganiu typu symetrycznego (*ang. symmetric-like*) silniej uporządkowanej wody, zaś pasma 3465  $\text{cm}^{-1}$  pasmu typu antysymetrycznego (*ang. antisymmetric-like*) wody o strukturze mniej uporządkowanej, czyli o strukturze, w której układ tetraedyczny wiązań wodorowych został zakłócony przez makrocykl ftalocyjaniny. Pasma 3344  $\text{cm}^{-1}$  w filmach ftalocyjaniny glinu zostało przypisane cząsteczkom wody oddziałującym z atomem centralnym makrocyklu. Pasma 3378  $\text{cm}^{-1}$  oraz 2491  $\text{cm}^{-1}$  obserwowane w filmach AlPcS<sub>4</sub> przypisano drganiom OH oraz OD cząsteczek HDO w układach deuterowanych.

Badania wykonane z wykorzystaniem laserowej spektroskopii rozdzielczej w czasie dla układów komórki ludzkiego gruczołu piersiowego-fotouczulacz pozwalają zaś na wyciągnięcie następujących wniosków: dynamika AIPcS<sub>4</sub> w roztworze wodnym, jak i DMSO jest zdominowana przez dynamikę cząsteczek AIPcS<sub>4</sub> w postaci monomerów. Czasy relaksacji charakterystyczne dla AIPcS<sub>4</sub> w postaci filmu na podłożu z BaF<sub>2</sub> są o wiele dłuższe niż w przypadku układów biologicznych zawierających tkanki piersi ludzkiej. W przypadku tkanki nowotworowej po absorpcji fotonu jest obserwowana bardzo szybka relaksacja w ramach stanów S<sub>n</sub>, po której następuje przejście międzysystemowe do stanu trypletowego, z czasem życia w stanie wzbudzonym T<sub>1</sub> rzędu 59.9 ps i powrót do stanu S<sub>0</sub> na drodze fosforescencji, drugi kanał relaksacji obejmuje zaś relaksację wibracyjną w stanie S<sub>1</sub> ze stałą czasową równą 5.6 ps, po której obserwuje się przejście stożkowe do stanu S<sub>0</sub> z relaksacją wibracyjną w tym stanie o stałej czasowej rzędu 1.5 ps. W tkance o budowie prawidłowej również obserwuje się dwa kanały relaksacji energii. Główny kanał relaksacji jest związany z przejściami bezpromienistymi na drodze przejścia stożkowego i charakteryzowany przez stałe czasowe rzędu 176 fs i 6 ps odpowiadające relaksacji paczki falowej w reżymie Franka-Condon w stanie S<sub>1</sub> i relaksacji wibracyjnej w ramach stanu S<sub>1</sub>. Relaksacja w ramach stanu S<sub>0</sub> jest opisana stałą czasową równą 1.3 ps. Drugi kanał relaksacji obejmuje zaś przejście międzysystemowe do stanu T<sub>1</sub> z czasem życia w stanie trypletowym T<sub>1</sub> równym 41 ps.

## 6. LITERATURA

- [1] K. Cendrowski, A. Lewicka, *Nowa Klinika*, **2009**, 16(13), 13021.
- [2] K. Cendrowski, A. Lewicka, *Nowa Klinika*, **2009**, 16(13), 13029.
- [3] <http://nih.gov/>
- [4] R. Kordek, *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy*, Via Medica, Gdańsk **2007**.
- [5] A. Kułakowski, A. Skowrońska-Gardas, *Onkologia. Podręcznik dla studentów medycyny*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa **2003**.
- [6] E. Leporowska, A. Kaczmarek, K. Lamperska, A. Mackiewicz, *Współcz. Onkol.* **2006**, 6, 303.
- [7] R.R. Alfano, C.H. Liu, W.L. Sha, H.R. Zhu, D.L. Akins, J. Cleary, R. Prudente, E. Cellmer, *Lasers Life Sci.*, **1991**, 4, 23.
- [8] T.S. Gansler, CH. J. Frank, D. C. B. Redd, R. L. McCreery, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 319.
- [9] K.E. Shafer-Peltier, A.S. Haka, M. Fitzmaurice, J. Crowe, J. Myles, R.R. Dasari, M.S. Feld, *J. Raman Spectrosc.*, **2002**, 33, 552.
- [10] J. Kneipp, T. Bakker Schut, M. Kilffen, M. Menke-Pluijmers, G. Puppels, *Vib. Spectrosc.*, **2003**, 32, 67.
- [11] A.S. Haka, K.E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R.R. Dasari, M.S. Feld, *PNAS*, **2005**, 102, 12371.
- [12] A.S. Haka, Z. Volynskaya, J.A. Gardecki, J. Nazemi, R.R. Dasari, M. S. Feld, *J. Biomed. Opt.*, **2009**, 14, 054023-054023-8.
- [13] M.V.P. Chowdary, K.K. Kumar, J. Kurien, S. Mathew, C.M. Krishna, *Biopolymers*, **2006**, 83, 556.
- [14] N. Stone, K. Faulds, D. Graham, P. Matousek, *Anal. Chem.* **2010**, 82(10),3969.
- [15] P. Matousek, N. Stone, *J. Biomed. Opt.* **2007**, 12(2), 024008.
- [16] N. Stone, R. Baker, K. Rogers, A. W. Parker, P. Matousek, *Analyst* **2007**, 132(9), 899.
- [17] N. Stone, P. Matousek, *Cancer Res.*, **2008**, 68(11), 4424.
- [18] M. Moreno, L. Raniero, E. Arisawa, A. M.do Espirito Santo, E. Aparecido Pereira dos Santos, R. Andrade Bitar, A. Abrahao Martin, *Theor. Chem. Acc.*, **2010**, 125, 329.
- [19] A. Downes, A. Elfick, *Sensors* **2010**, 10, 1871.
- [20] P. Venkatachalam, L. Lakshmana Rao, N. Krishna Kumar, Anupama Jose, Shaiju S. Nazeer. *Spectroscopy AIP Conf. Proc.* **2008**, 1075, 144.
- [21] C.H. Petter, N. Heigl, M. Rainer, R. Bakry, J. Pallua, G.K. Bonn, C.W. Huck, *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16(3), 318.
- [22] J. Backhaus, R. Mueller, N. Formanski, N. Szlama, H.G. Meerpohl, M. Eidt, P. Bugert, *Vib. Spectrosc.* **2010**, 52, 173.
- [23] M. Diem, L. Chiriboga, P.Lasch, A.Pacifico, *Biopolymers*. **2002**, 67, 349.
- [24] H. Fabian, P. Lasch, M. Boese, W. Haensch, *Biopolymers* **2002**, 67, 354.
- [25] G. Bellisola, C. Sorio, *Am. J. Cancer Res.* **2012**, 2(1), 1.
- [26] M. Diem, *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis* Wiley-Blackwell, **2008**.

- [27] A. Graczyk, *Biochemiczne i biofizyczne podstawy fotodynamicznej metody wykrywania i leczenia nowotworów, Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa **1999**.
- [28] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90*(12), 889.
- [29] A. Tudaj, H. Podbielska, J. Zychowicz, W. Stręk, *Światło leczy-wprowadzenie do terapii i diagnostyki fotodynamicznej, Diagnostyka i Terapia Fotodynamiczna*. Urban & Partner, Wrocław **2004**.
- [30] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*(5), 656.
- [31] M.R. Hamblin, P. Mróz, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*, Artech House, Boston-London, **2008**.
- [32] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90*(12), 889.
- [33] K. Berg, P.K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, B.O. Engesaeter, E. Angell-Petersen, T. Warloe, N. Frandsen, A. Hogset, *J. Microsc.* **2005**, *218*(Pt 2), 133.
- [34] A. Braun, J. Tcherniac, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 2709.
- [35] R.P. Linstead, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1016.
- [36] R.P. Linstead, J.M. Robertson, *J. Chem. Soc.* **1936**, 1736.
- [37] A.P.B. Lever, *Adv. Inorg. Radiochem.* **1965**, *7*, 27.
- [38] R. Taube, *Pure Appl. Chem.* **1974**, *38*, 427.
- [39] M. Gouterman, in *The Porphyrins*, vol. III, Part A. Physical Chemistry, D. Dolphin, Ed., Academic Press, New York, 1078, 1-165.
- [40] F.H. Moser, A.L. Thomas, *Phtalocyanine Compounds*, Reinhold, New York **1963**.
- [41] F.H. Moser, A.L. Thomas, *The Phtalocyanines*, vol. I, Properties, CRC Press, Boca Raton, FL, **1983**.
- [42] J. Simon, J.J. Andre in *Molecular Semiconductors: Photoelektrical Properties and Photo Cells*, Eds. J.M. Lehn and Ch. W. Rees, Springer-Verlag, NY, **1985**.
- [43] J.W. Owens, C.J.O'Connor, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 1.
- [44] S. Muralidharan, G. Ferraudi, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 4877.
- [45] I. Howe, J. Z. Zang, *J. Phys. Chem. A.* **1997**, *101*, 2307.
- [46] I. Ruckmann, A. Zeug, R. Herter, B. Roder, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 576.
- [47] E. Reddi, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1997**, *37*(3), 189.
- [48] Q. Peng, J.M. Nesland, *Ultrastruct. Pathol.* **2004**, *28*(5-6), 333.
- [49] E.S. Nyman, P.H. Hynninen, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2004**, *73*(1-2), 1.
- [50] M.C. Luna, A. Ferrario, N. Rucker, C.J. Gomer, *Cancer Res.* **1995**, *55*(9), 1820.
- [51] Q. Peng, J. Moan, L.S. Cheng, *Cancer Lett.* **1991**, *58*(1-2), 29.
- [52] A. Juzeniene, J. Moan, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2007**, *4*(1), 3.
- [53] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*(4), 279.
- [54] A.V. Nikolaitchik, O. Korth, A.M.J. Rodgers, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7587.
- [55] G. Ma, J. He, Ch.H. Kang, S.H. Tang, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *370*, 293.
- [56] V.S. Williams, S. Mazumdar, N.R. Armstrong, Z.Z. Ho, N. Peyghambarian, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 4500.
- [57] B. Brożek-Pluska, I. Placek, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir, H. Abramczyk, *J. Mol. Liq.* **2008**, *141*, 145.



- [58] B. Brożek-Pluska, J. Musiał, R. Kordek, E. Bailo, T. Dieing, H. Abramczyk, *Analyst* **2012**, *137* (16), 3773.
- [59] S.J. Shin, N. Kanomata, P.P. Rosen, *Histopathology*, **2000**, *37*, 456.
- [60] M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 1161.
- [61] H. Abramczyk, J. Surmacki, B. Brożek-Pluska, Z. Morawiec, M. Tazbir, *J. Mol. Struc.* **2009**, *924-926*, 175.
- [62] H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, J. Surmacki, J. Jabłońska-Gajewicz, R. Kordek, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2012**, *108*, 74.
- [63] F.S. Parker, *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*, Plenum Press, New York, **1983**.
- [64] B. Brożek-Pluska, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, H. Abramczyk, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3386.
- [65] R.K. Murray, D.K. Granner, V.W. Rodwell, *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa **2012**.
- [66] R. Doll, R. Peto, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1981**, *66*, 1191.
- [67] H. Bartsch, J. Nair, R.W. Owen. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2209.
- [68] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa **1997**.
- [69] Y.E.M. Dommels, G.M. Alink, P.J. van Bladern, B. van Ommen, *Environ. Toxicol. Phar.* **2002**, *12*, 233.
- [70] Menendez, L. Vellon, R. Colomer, R. Lupu, *Annal. Oncol.*, **2010**, *16*, 359.
- [71] E.A. de Deckere, *Eur. J. Cancer Prev.*, **1999**, *8*, 213.
- [72] H. Tapiero, G.N. Ba, *Biomed. Pharmacother.*, **2002**, *56*, 215.
- [73] M.J. Gonzalez, R.A. Schemmel, J.I. Gray, L. Dugan, L.G. Sheffield Jr, C.W. Welsh, *Carcinogenesis*, **1991**, *12*, 1231.
- [74] U. Reiss, A.L. Tappel, *Lipids*, **1973**, *8*, 199.
- [75] L.C. Hamilton, J.A. Mitchel, A.M. Tomlinso, T.D. Warner, *FASEB*, **1999**, *13*, 245.
- [76] F. Kaneko, J. Yano, K. Sato, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 417.
- [77] F. Kaneko, K. Yamazaki, K. Kitagawa, T. Kikyo, M. Kobayashi, Y. Kitagawa, Y. Matsuura, K. Sato, M. Suzuki, *M. J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 1803.
- [78] S. Abrahamsson, B. Dahlen, H. Lofgren, J. Pascher, *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **1978**, *16*, 125.
- [79] F. Kaneko, K. Tashiro, M. Kobayashi, *J. Cryst. Growth* **1999**, *198-199*, 1352.
- [80] M. Kobayashi, F. Kaneko, K. Sato, M. Suzuki, *M. J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 6371.
- [81] S.P. Verma, D.F.H. Wallach, *Biochem. Biophys. Acta* **1977**, *486*, 217.
- [82] Y. Kim, H.L. Strauss, R.G. Snyder, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 5080.
- [83] B. Brożek-Pluska, A. Jarota, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *TCRT*, **2012**, *4*, 317.
- [84] K. Tokumaru, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 77.
- [85] Q. Zhong, Z. Wang, Y. Liu, Q. Zhu, F. Kong, *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 5377.
- [86] P.C. Minor, M. Gouterman, A. B. P. Lever, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 1894.
- [87] S. Strickler, R.A. Berg, *J. Chem. Phys.* **1962**, 814.
- [88] B. Brożek-Pluska, I. Szymczyk, H. Abramczyk, *J. Mol. Struc.* **2005**, *744*, 481.
- [89] B. Brożek-Pluska, A. Jarota, K. Kurczewski, H. Abramczyk *J. Mol. Struc.* **2009**, *924-926*, 338.
- [90] B. Brożek-Pluska, M. Kurczewska, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *J. Mol. Liq.* **2008**, *141*, 140.

- [91] H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, K. Kurczewski, M. Kurczewska, I. Szymczyk, P. Krzyczmonik, T. Błaszczak, H. Scholl, W. Czajkowski, *J. Phys. Chem.*, **2006**, *110* (28), 8627.
- [92] M. Daszykowski, B. Walczak, *Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych*;  
<http://www.chemometria.us.edu.pl/AnalizaCzynnikowGlownych.pdf>
- [93] J. Mazerski, M. Daszkowski, *Chemometria- Materiały kursu szkoleniowego*, Poznań 28.11.**2006**.
- [94] P. Gajewski, R. Jaeschk, J. Brożek, *Podstawy EBM, czyli medycyny opartej na danych naukowych dla lekarzy i studentów medycyny*. Medycyna Praktyczna, Kraków **2008**.
- [95] D. Eisenberg, W. Kauzmann, W. *The structure and properties of water*. Oxford University Press, New York **1969**.
- [96] M.R. Yalamanchili, A.A. Atia, J.D. Miller, *Langmuir*, **1996**, *12*, 4176.
- [97] R. Torre, P. Bartolini, R. Righini, R. *Nature*, **2004**, *428*, 296.
- [98] K.B. Moller, R. Rey, J.T. Hynes, J.T. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, *108*, 1275.
- [99] H. Abramczyk, B. Brozek-Pluska, J. Surmacki, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, *Journal of Biophysical Chemistry*, **2011**, *2*, 158.
- [100] H. Abramczyk, B. Brozek-Pluska, E. Freysz, M. Tondusson, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 4999.
- [101] T.H. Tran-Thi, *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *160*, 53.
- [102] A.V. Nikolaitchik, O. Korth, M.A.J. Rodgers., *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7587.
- [103] G. Ma, J. He, Ch.H. Kang, S.H. Tang, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *370*, 293.
- [104] V.S. Williams, S. Mazumdar, N. R. Armstrong, Z. Z. Ho, N. Peyghambarian, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 4500.
- [105] N.M. Speirs, W.J. Ebenezer, A.C. Jones, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 247.
- [106] A. Jarota, M. Tondusson, G. Galle, E. Freysz, H. Abramczyk, *J. Phys. Chem. A*. **2012**, *116*, 4000.
- [107] J. Savolainen, D. van der Linden, N. Dijkhuizen, J. L. Herek, *J. Photochem. Photobiol. A*. **2008**, *196*, 99–105.
- [108] M. Fournier, C. Pepin, D. Houde, R. Ouellet, J. E. van Lier, ed. W. Domcke, D. R. Yarkony, H. Koppel, *Conical intersections. Theory. Computation and Experiment, Advances Series in Physical Chemistry 17*, **2012**.
- [109] S.V. Rao, D.N. Rao, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 233.
- [110] A. Jarota, B. Brozek-Pluska, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *J. Phys. Chem C* **2011**, *115* (50) 24920.

**Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy**

1. B. Brożek-Pluska, I. Szymczyk, H. Abramczyk, *J. Mol. Struc.* **2005**, 744, 481. IF: 1,611
2. H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, K. Kurczewski, M. Kurczewska, I. Szymczyk, P. Krzyczmonik, T. Błaszczak, H. Scholl, W. Czajkowski, *J. Phys. Chem.* **2006**, 110 (28), 8627. IF: 2,946
3. B. Brożek-Pluska, I. Placek, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir, H. Abramczyk, *J. Mol. Liq.* **2008**, 141,145. IF: 1,497
4. B. Brożek-Pluska, M. Kurczewska, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *J. Mol. Liq.* **2008**, 141,140. IF: 1,497
5. H. Abramczyk, J. Surmacki, B. Brożek-Pluska, Z. Morawiec, M. Tazbir, *J. Mol. Struc.* **2009**, 924-926, 175. IF:1,611
6. B. Brożek-Pluska, A. Jarota, K. Kurczewski, H. Abramczyk *J. Mol. Struc.* **2009**, 924-926, 338. IF:1,611
7. H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, J. Surmacki, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, *Journal of Biophysical Chemistry*, **2011**, 2, 158. IF:0
8. A. Jarota, B. Brożek-Pluska, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *J. Phys. Chem C* **2011**, 115 (50) 24920. IF:4,524
9. B. Brożek-Pluska, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, H. Abramczyk, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3386. IF: 5,207
10. H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, J. Surmacki, J. Jabłońska-Gajewicz, R. Kordek, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2012**, 108, 74. IF:4,539
11. B. Brożek-Pluska, A. Jarota, J. Jablonska-Gajewicz, R. Kordek, W. Czajkowski, H. Abramczyk, *TCRT*, **2012**, 4, 317. IF: 2,020
12. B. Brożek-Pluska, J. Musiał, R. Kordek, E. Bailo, T. Dieing, H. Abramczyk, *Analyst* **2012**, 137 (16), 3773. IF: 4,230
13. H. Abramczyk, B. Brożek-Pluska, E. Freysz, M. Tondusson, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 4999. IF: 4,524

**Całkowity IF: 35,817**

## SUMMARY

In the traditional approach breast cancer can be identified using different well established methods, such as computer tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), X-ray, ultrasound, biopsy and in cases of breast cancer also mammography or miraluma breast imaging. However, the preferred method for diagnosing breast cancer is histological analysis. Presently a histological analysis, being the standard procedure of breast cancer diagnostics, occurs to be sometimes inconvenient, time consuming and in a number of cases leads to ambiguous prone to human interpretations. This shows an evident need to develop new methods that would enable an unequivocal diagnosis within a short time.

In this work an application of spectroscopic methods such as: Raman spectroscopy and imaging, IR spectroscopy, UV-VIS spectroscopy and time-resolved laser spectroscopy techniques for breast cancer detection, biochemical characterization and description of energy dissipation mechanisms in noncancerous and cancerous breast tissues have been presented.

Results obtained by the Raman spectroscopy and images reveal an inhomogeneous distribution of different compounds, mainly carotenoids, proteins, fatty acids and products of fatty acids metabolism in the cancerous breast tissue that differs from that of the surrounding noncancerous breast tissue. Carotenoids, proteins and fatty acids as well as the products of fatty acids metabolism can be treated as Raman biomarkers to distinguish between the cancerous and noncancerous human breast tissues. The fatty acid composition of the cancerous breast tissue is markedly different from that of the surrounding noncancerous one. The cancerous breast tissue seems to be dominated by the protein component and the  $\omega$ -6 acids and products of  $\omega$ -6 acids metabolism - eicosanoids catalyzed by cyclooxygenase, while the noncancerous breast tissue seems to be dominated by monounsaturated oleic acid and  $\omega$ -3 acids spectra (LA, ALA and DHA).

The low temperatures Raman spectroscopy has been used to identified phase transitions characteristic for oleic acid in a pure form and confined in noncancerous breast tissue. The results obtained by Raman spectroscopy are identical as those obtained by DSC method.

The OH stretching vibrations of water also can be useful as potential Raman biomarkers to distinguish between the cancerous and the noncancerous human breast tissues. It has been found that water amount as well as the band shapes of the OH stretching bands of the cancerous breast tissue are markedly different

from that of the surrounding noncancerous one. It has been shown that water at DNA and lipid interfaces is represented by the bands of symmetric and antisymmetric like vibrations in the region of the OH stretching modes in contrast to water confined in the cancerous breast tissue where the single band at  $3311\text{ cm}^{-1}$  dominates in the Raman spectrum. Water in the cancerous breast tissue is very likely present as interfacial molecule, which is hydrogen bonded to some hydrophilic moieties in the tissue and the change of vibrational pattern of behavior may be due to the decoupling of the vibrations of the OH bonds in water molecule or change of the vibrational selection rules at biological interfaces.

The Raman spectra and images are also sensitive indicators of distribution of photosensitizers in the noncancerous and the cancerous structures of the breast tissue from the safety margin and the tumor mass. It has been shown that the aggregation and distribution of photosensitizers in the cancerous breast tissue are markedly different from that of the noncancerous breast tissues. Low temperatures Raman spectroscopy, IR spectroscopy and time resolved laser spectroscopy have been used to study aggregation and radical forms formation for various tetrasulphonated phthalocyanines. It has been proved that the dimerization of the tetrasulphonated phthalocyanines is significantly shifted towards monomeric form in DMSO solutions compared to aqueous solutions. Generation of the charge transfer species (CT) due to the charge transfer between the central metal ion and the ligand of the phthalocyanine macrocycle has been observed. The spectroscopic evidence of CT generation was observed in the region 500–600 nm both by the pump–probe femtosecond and the emission Raman spectroscopy. The charge transfer species were generated in competition with another channel of energy dissipation via  $T_1 \rightarrow T_n$  triplet absorption. The transient absorption observed by the pump–probe femtosecond and the emission at around 730 nm by low temperatures Raman spectroscopy has been assigned to the radical transient species generated in the process of the photoredox dissociation that is accompanied by the electron transfer between the adjacent phthalocyaninemacrocycles. The photoredox dissociation was result in the formation of the oxidized and reduced ligand radicals.

The excited-state dynamics of the tetrasulphonated aluminum phthalocyanine (AlPcS<sub>4</sub>) have been studied at biological interface of the human breast tissue by Raman, IR, fluorescence and pump-probe transient absorption laser spectroscopy providing information about the events occurring in time scale ranging from femtoseconds to nanoseconds. It has been shown that the dynamics in the interfacial regions of the biological tissue is markedly shorter than that in solutions and the photosensitizer responsible for harvesting of the light energy in biological tissue find their ways for a recovery through some special features of

the potential energy surfaces such as conical intersections, which facilitate the rate of radiationless transitions. The tetrasulphonated aluminum phthalocyanine interacts with the normal (noncancerous) breast tissue and cancerous tissue according to different pathways.

The dynamics in the noncancerous tissue is dominated by the radiationless decay at a conical intersection in contrast to the dynamics in solutions, which is dominated by the fluorescence. The dynamics in the cancerous tissue is dominated by the phosphorescence from the triplet state  $T_1$  state. The dynamics of  $AlPcS_4$  reveals three time scales: 110–170 fs, 1–7 ps, and 20–60 ps. The shortest time constants have been assigned to vibrational wavepacket dynamics in the Franck-Condon region down to the local minimum of the excited state  $S_1$ , a few picosecond component has been assigned to vibrational relaxation in the ground and excited electronic states, 20–60 ps components represent the decay from the triplet state  $T_1$  to the ground state  $S_0$ .

The sensitivity of Raman spectroscopy method in breast cancer detection was found equal to 60% for the carotenoids and 87% for lipids, while the specificity was equal to 95% for carotenoids and 89% for lipids.

## CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORKI

Beata Brożek-Płuska rozpoczęła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w roku 1993. W latach 1995-98 kontynuowała studia w trybie indywidualnym. W lipcu 1998 roku otrzymała dyplom magistra inżyniera technologii chemicznej o specjalności techniki fizykochemiczne i komputerowe z wyróżnieniem. W październiku 1998 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. W lipcu 2002 roku obroniła pracę doktorską „Uporządkowanie strukturalne i relaksacja wibracyjna fenyloacetyleny w roztworach ciekłych i matrycach zamrożonych w niskich temperaturach” (promotor: prof. dr hab. Halina Abramczyk). Praca została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Chemicznego PŁ.

Zainteresowania naukowe dr Beaty Brożek-Płuska dotyczą spektroskopii Ramana, obrazowania Ramana oraz rozdzielczych w czasie technik spektroskopii laserowej.

W latach 1998-2013 dr Beata Brożek-Płuska prowadziła zajęcia dydaktyczne na studiach dziennych i zaocznych Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej na kierunkach: technologia chemiczna chemia, nanotechnologia, papiernictwo i poligrafia, ochrona środowiska, inżynieria materiałowa; ćwiczenia z fizyki chemicznej, chemii fizycznej, laboratoria z analizy instrumentalnej, chemii fizycznej, spektroskopii molekularnej, wykłady z analizy instrumentalnej; od roku 2007 laboratoria, projekt oraz wykłady z chemii fizycznej dla Centrum Kształcenia Międzynarodowego Politechniki Łódzkiej w języku angielskim. Od roku 2012 dr Beata Brożek-Płuska jest kierownikiem przedmiotu analiza instrumentalna w ramach Kolegium Towaroznawstwa oraz Chemisty realizowanego dla Centrum Kształcenia Międzynarodowego PŁ. W latach 2002-2012 była opiekunem 11 prac magisterskich, w tym 4 wyróżnionych w ramach Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików oraz kierownikiem 1 pracy magisterskiej. W roku 2012 była promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim dr. inż. J. Surmackiego – rozprawa pt. „Diagnostyka zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego metodą spektroskopii Ramana” została wyróżniona przez Radę Wydziału Chemicznego PŁ.

Po ukończeniu I-szego roku studiów doktoranckich odbyła miesięczny staż naukowy w Colorado State University, w Fort Collins, w ramach grantu II funduszu polsko-amerykańskiego im. Marii Skłodowskiej-Curie pod kierunkiem prof. B. Ladanyi. Po ukończeniu studium doktoranckiego odbyła 12-miesięcznym staż naukowy w Laboratoire d'Optique Appliquee, CNRS, INSERM, Ecole Polytechnique – ENSTA, Palaiseau, France w grupie badawczej prof. Y.A. Gauguela.

Od października 2002 roku do chwili obecnej jest pracownikiem Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej na stanowisku adiunkta.

W roku 2011 ukończyła z wynikiem bardzo dobrym studia podyplomowe na Wydziale Elektrotechniki, Elektroniki, Informatyki i Automatyki Politechniki Łódzkiej z zakresu Technologii optoelektroniki. W roku 2011 pod kierunkiem dr Eleny Bailo i dr Thomasa Dieinga odbyła dwutygodniowy staż naukowy w WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Ulm, Germany – w ramach projektu pn. „Przygotowanie i realizacja nowych kierunków studiów w odpowiedzi na współczesne potrzeby rynku pracy i wymagania gospodarki opartej na wiedzy” realizowanego w ramach Priorytetu IV-Działanie 4.1\_Poddziałanie 4.1.1. W roku 2012 w ramach tego samego projektu odbyła 14-dniowy staż naukowy na Uniwersytecie w Bordeaux na Wydziale Fizyki w Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA) w grupie kierowanej przez dr Erica Freysza. W latach 2009 oraz 2011 uczestniczyła także w szkoleniach: Introduction to Confocal Raman and Scanning Probe Microscopy, Leibniz Institute of Polymer Research, Dresden, Germany, Modern Raman Techniques, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Dr Beata Brożek-Płuska jest współautorem 27 publikacji, 23 po uzyskaniu stopnia doktora, w tym 13 będących podstawą rozprawy habilitacyjnej oraz 2 rozdziałów w książkach. Publikacja B. Brożek-Płuska, I. Placek, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir, H. Abramczyk, Breast Cancer Diagnostics by Raman Spectroscopy, J. Mol. Liq 2008, 141,145-148 znalazła się na liście top 25 hottest articles X-XII 2008 roku. Jest także współautorem ponad 60 prezentacji konferencyjnych.

Była oraz jest kierownikiem dwóch projektów badawczych:

1. „Ultraszybkie procesy fotocyklu bakteriorodopsyny i jej modyfikowanych analogów badane piko/femtosekundowymi rozdzielczymi w czasie metodami rozpraszania ramanowskiego i absorpcji” grant MNiSW realizowany w latach 2004-2007, 3 T09A 139 26.
2. „Produkty wolnorodnikowej i enzymatycznej peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych – markery zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego” grant NCN realizowany w latach 2011-2014.

Dr Beata Brożek-Płuska była wykonawcą kolejnych 4 grantów KBN, MNiI oraz MNiSW:



1. „Uporządkowanie strukturalne i relaksacja wibracyjna fenyloacetyleny w ciekłych roztworach i matrycach zamrożonych w niskich temperaturach” grant KBN realizowany w latach 2000-2002, 3 T09A 086 19.
2. „Femtosekundowa spektroskopia Ramana. Procesy ultraszybkie w pochodnych fenyloacetyleny i ftalocyjaniny badane metodami spektroskopii laserowej” grant MNiI realizowany w latach 2001-2003, 7 T09A 111 20.
3. „Fotochemia fotouczulaczy III generacji oraz diagnostyczne zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu tkanek biologicznych” grant MNiSW realizowany w latach 2005-2008, 3 T11E 047 29.
4. „Diagnostyka tkanki nowotworowej piersi metodą spektroskopii Ramana” grant MNiSW/(NCN) realizowany w latach 2009-2012, N N518 384537.

W latach 2007-2009 była członkiem komitetów organizacyjnych trzech międzynarodowych konferencji naukowych:

1. Marie Curie Chair Conference, Recent advances in laser spectroscopy and laser technology, 29-31.05.2007, Łódź, Poland.
2. The Marie Curie Chair Workshop, Recent Advances in Medical Diagnostics by Optical Methods, 20-21.05.2008 MBI, Berlin, Germany.
3. The Marie Curie and ESF Summer School 2009 on Ultrafast Dynamics and Structure. Towards Biological and Biomedical Applications, 29.09-04.10. 2009, Rhodes, Greece.

W roku 2011 w ramach projektu WIKAMP i platformy e-learningowej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej opracowała materiały edukacyjne (wykłady, testy, laboratoria) w ramach przedmiotu Spektroskopia.

Była członkiem Komisji ds. Jakości Kształcenia Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej, kadencji 2008-2012.

Od 2011 roku jest członkiem Komisji Programowej kierunku Chemia Wydziału Chemicznego PŁ.

W roku 2008 otrzymała nagrodę Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej za działalność organizacyjną, a w latach 2009, 2012 nagrodę JM Rektora PŁ za działalność dydaktyczną.

