



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Veronika Laubrová

Fotogenerace singletního kyslíku verteporfinem

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 21. 5. 2021

podpis 

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu práce doc. RNDr. Romanu Dědicovi, Ph.D. za obětavé vedení, poskytnutí rad a cenných připomínek a především za jeho ochotu a trpělivost, díky nimž jsem mohla tuto práci dovést do konce i v této době těžké pro celý svět.

Název práce: Fotogenerace singletního kyslíku verteporfinem

Autor: Veronika Laubrová

Katedra / Ústav: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., KCHFO MFF UK

Abstrakt: Fotodynamická terapie je metoda, pomocí které lze léčit řadu onemocnění, např. onkologická onemocnění. Základem této metody je likvidace nemocné tkáně singletním kyslíkem získaným přenosem energie z fotosenzibilizátorů, mezi něž patří i verteporfin. Experimentální část této práce zkoumá absorpční a fluorescenční spektra verteporfinu pro různé koncentrace. Dále byly z kinetik luminiscence singletního kyslíku pro různé koncentrace získány doby života singletního kyslíku a tripletů verteporfinu a jejich závislost na koncentraci vzorku. Ze závislosti dob života singletního kyslíku na koncentraci verteporfinu byla určena zhášecí konstanta. Ze srovnání měření ve vzorku v rovnováze se vzduchem a s čistým kyslíkem byla určena zhášecí konstanta tripletů verteporfinu rozpuštěným kyslíkem.

Klíčová slova: singletní kyslík, luminiscence, verteporfin, fotodynamická terapie

Title: Photogeneration of singlet oxygen by Verteporfin

Author: Veronika Laubrová

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., KCHFO MFF UK

Abstract: Photodynamic therapy is a method that can be used to treat a number of diseases, such as oncological diseases. The basis of this method is the elimination of diseased tissue by singlet oxygen obtained by energy transfer from photosensitizers, including verteporphin. The experimental part of this work examines the absorption and fluorescence spectra of verteporphin for different concentrations. Furthermore, from the kinetics of singlet oxygen luminescence for different concentrations, lifetimes of singlet oxygen, verteporphin triplets and their dependence on the sample concentration were obtained. The quenching constant was determined from the dependence of singlet oxygen lifetimes on verteporphin concentration. From the comparison of the measurements in the sample in equilibrium with air and with pure oxygen, the quenching constant of the verteporphin triplets with dissolved oxygen was determined.

Keywords: singlet oxygen, luminescence, verteporphin, photodynamic therapy

Obsah

Seznam zkratk	2
1 Úvod	3
2 Singletní kyslík ($^1\text{O}_2$)	4
2.1 Energetické hladiny a orbitály kyslíku	4
2.2 Vznik $^1\text{O}_2$ fotosenzibilizací	4
2.3 Reakce singletního kyslíku	5
2.4 Reaktivní formy kyslíku	6
3 Fotodynamická terapie (PDT)	7
3.1 Historie	7
3.2 Princip PDT	7
3.2.1 Podání PS	8
3.2.2 Selektivní akumulace v tkáni	9
3.2.3 Fotoefekt I. a II. typu	9
3.3 Výhody PDT oproti jiným terapeutickým možnostem	10
3.4 Aplikace PDT	10
3.5 Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD)	11
3.6 Vlastnosti ideálního fotosenzibilizátoru	12
3.6.1 Typy PS	13
3.6.2 Verteporfín	14
4 Experimentální metody	16
4.1 Absorpční spektroskopie	16
4.2 Fluorescenční spektroskopie	16
4.3 Časově rozlišená detekce fosforescence	17
5 Materiály	19
6 Experimentální uspořádání	20
6.1 Absorpční spektrometr	20
6.2 Fluorescenční spektrometr a excitační laser	20
6.3 Aparatura pro detekci infračervené luminiscence	20
7 Výsledky	22
8 Diskuze	30
9 Závěr	32
Seznam použité literatury	33
Seznam obrázků	37

Seznam zkratk

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík ve stavu $^1\Delta_g^+$
$^3\text{O}_2$	kyslík v základním tripletním stavu $^3\Sigma_g^-$
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzibilizátor
DF	zpožděná fluorescence
ROS	reaktivní forma kyslíku
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace
DMF	dimethylformamid

1 Úvod

Fotodynamická terapie (PDT) je formou léčby řady vážných chronických onemocnění, jako jsou např. onkologická onemocnění či věkem podmíněná makulární degenerace (AMD). Při PDT se k likvidaci nemocné tkáně používá singletní kyslík $^1\text{O}_2$ generovaný přenosem energie ze světlem excitovaných tripletních stavů fotosenzibilizátorů (PS). Pro léčbu AMD je jako PS používán verteporfín, známý též pod obchodním názvem Visudyne[®].

V teoretické části této práce se zaměříme obecně na PDT (její historii, princip a využití) a $^1\text{O}_2$. Cílem praktické části bakalářské práce pak je charakterizace případných agregačních vlastností konkrétního PS, verteporfinu, pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie a především studium generace singletního kyslíku prostřednictvím časově rozlišené detekce jeho slabé infračervené luminiscence.

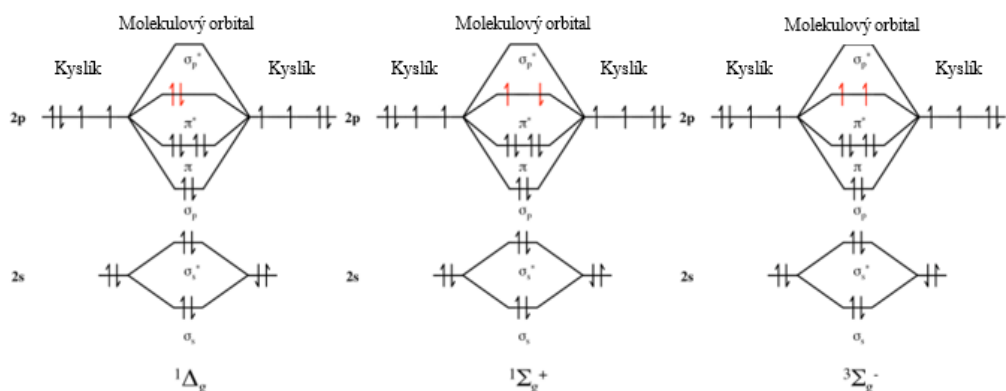
2 Singletní kyslík ($^1\text{O}_2$)

2.1 Energetické hladiny a orbitály kyslíku

Základním stavem většiny molekul je singletní stav [1]. O tomto stavu můžeme hovořit, má-li molekula alespoň dva elektrony ve stejném orbitalu. Dle Pauliho vylučovacího principu musí pak být jejich spinová funkce antisymetrická.

Naproti tomu, základním stavem kyslíku je tripletní stav (bývá označován $^3\Sigma_g^-$ [2]), tedy má dva nespárované elektrony (jejich spinová funkce je symetrická). Důvodem je degenerace vazebných orbitalů π_x a π_y a jim odpovídajících antivazebných orbitalů vlivem symetrie molekuly. Molekula se přirozeně nachází v energeticky nejvýhodnějším stavu, kterým je pro kyslík stav s nespárovanými elektrony. Singletní stav $^1\Delta_g^+$ je tak pro kyslík prvním excitovaným stavem [1]. Tento stav bývá obvykle označován jako singletní kyslík, $^1\text{O}_2$.

Na obr. 1 můžeme vidět znázornění molekulových orbitalů kyslíku. Jako $^1\Sigma_g^+$ je označen další singletový stav.



Obr. 1: Znázornění molekulových orbitalů kyslíku (upraveno z [34])

2.2 Vznik $^1\text{O}_2$ fotosenzibilizací

Energie ve formě světla je absorbována fotosenzibilizátorem (PS). Tato látka je tak ze základního singletního stavu excitována do prvního excitovaného singletního stavu a to takovým způsobem, že jeden ze dvojice elektronů z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu přejde do orbitalu s vyšší energií [3].

V tomto stavu však látka zůstává velmi krátce. Následně buď látka přejde zpět do základního singletního stavu vyzářením světla (fluorescencí) nebo nezářivě, nebo se převrátí spin excitovaného elektronu a vzniká tak první tripletní stav.

Zabýváme-li se reakcemi $^1\text{O}_2$ s biomolekulami, jsou pro nás významné reakce s dvojnou uhlíkovou vazbou, především u alkenů. Při této reakci je přerušena dvojná vazba alkenů a za vzniku hydroperoxidu se z přilehlého uhlíku odtrhává vodík a dochází k posunutí dvojných vazeb.

$^1\text{O}_2$ reaguje s atomy jako např. fosfor, dusík a síra, které mají volný elektronový pár. Touto reakcí buď kyslík přechází do stavu $^3\text{O}_2$, nebo je reagující atom vlivem $^1\text{O}_2$ oxidován.

Dalšími významnými jsou reakce, při nichž ze dvou π -vazeb vznikají dvě σ -vazby. Tyto reakce označujeme jako cykloadiční.

$^1\text{O}_2$ také reaguje s látkami, jako jsou kyselina olejová či máselná, které tvoří tuky a fosfolipidy – ty tvoří základ pro buněčné membrány. Dále též oxiduje některé aminokyseliny, čili i proteiny z nich tvořené [1].

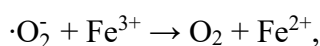
V nukleových kyselinách reaguje $^1\text{O}_2$ především s guaninem.

2.4 Reaktivní formy kyslíku

Kromě $^1\text{O}_2$ rozlišujeme ještě dva druhy reaktivních forem kyslíku (ROS) – molekulové radikály a neradikálové molekuly.

Reaktivita molekulových radikálů je způsobena nespárovaným elektronem. Do této skupiny patří superoxidový anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) nebo peroxylový radikál ($\text{R-OO}\cdot$). Tečku ve vzorcích užíváme k označení radikálového elektronu.

$\cdot\text{O}_2^-$ je důležitý pro svou reakci



kteřá popisuje, že $\cdot\text{O}_2^-$ dokáže redukovat ionty železa. Významným pro vznik $\cdot\text{O}_2^-$, který vzniká v mitochondriích či endoplazmatickém retikulu, je enzym xanthinoxidáza. $\cdot\text{O}_2^-$ slouží jako katalyzátor peroxidace lipidů, jejíž produkty jsou hydroperoxydy a nenasycené aldehydy [6].

$\cdot\text{OH}$ je velmi reaktivní. Dokáže odtrhnout vodík z biomolekul, způsobit adici dvojných vazeb [7] a procházet buněčnou membránou. Interaguje s fibroblasty, epitelovými buňkami a bakteriemi [6].

Neradikálovými ROS jsou oxidační činidla jako peroxid vodíku (H_2O_2), organické peroxidy (R-OOH) a ozon (O_3) [1].

H_2O_2 se váže s bílkoviny. Za přítomnosti tranzitních kovů, např. železa, dochází k rychlé redukci H_2O_2 , tzv. Fentonově reakci,



3 Fotodynamická terapie (PDT)

3.1 Historie

Kořeny PDT, tak jak ji známe dnes, můžeme nalézt na přelomu 19. a 20. století. Niels Finsen tehdy zjistil, že červené světlo zabraňuje praskání neštovicových postul. O několik let později získal Nobelovu cenu za objev, že pomocí UV záření lze léčit kožní formu tuberkulózy.

Zhruba ve stejné době bylo zkoumáno, jak ovlivňuje fotochemoterapie buněčnou smrt. Bylo též zjištěno, že v nádorové tkáni se akumuluje fluorescenční barvivo [8].

Označení *fotodynamická terapie* pochází z práce Tappeinera a Jodlebauera [9].

Tappeiner s dermatologem Jesionekem byli první, kdo použili světlo k léčbě kožního tumoru.

Díky Policardovu zjištění ze dvacátých let víme, že některé nádory červenooranžově fluoreskují při stimulaci UV zářením [9].

Za otce PDT bývá označován Dougherty, který provedl první rozsáhlejší studii. Léčil 25 pacientů s kožními nádory pomocí PDT. Ze 113 ložisek jich 98 bylo vyléčeno úplně [10].

3.2 Princip PDT

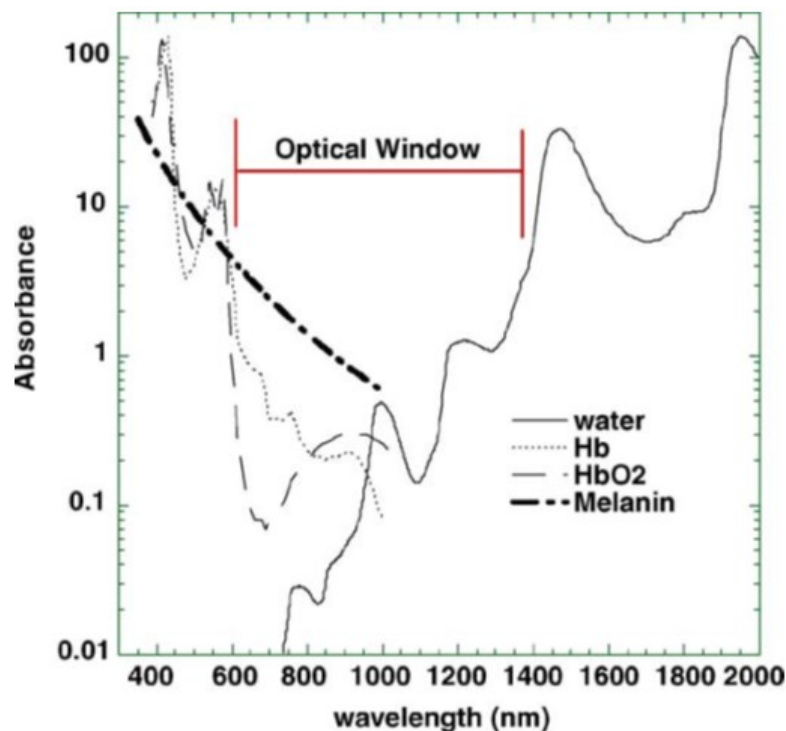
Pro provedení PDT je třeba PS, $^3\text{O}_2$ a světlo vhodné vlnové délky. PS je podán pacientovi a postupně se nahromadí v nádorových či jinak poškozených tkání (způsoby podání a důvody nahromadění budeme probírat v následujících částech). Postiženou tkáň ozáříme světlem vlnové délky shodné s hlavním absorpčním pásem PS. Přitom musíme dbát, aby světlo nebylo absorbováno hemoglobinem, oxyhemoglobinem, melaninem (pohlcují světelné paprsky s vlnovou délkou do 600 nm) nebo vodou (ta pohlcuje světlo s vlnovou délkou nad 1300 nm). Mezi těmito hodnotami proniká světlo do tkáně nejhlouběji, záleží však i na optických vlastnostech tkáně. Tato oblast se nazývá optické okno a je znázorněná na obr. 3.

Nejčastěji tedy používáme světlo s vlnovou délkou mezi 650 nm a 750 nm, čili červené světlo.

PS je světlem excitován do prvního excitovaného singletového stavu, ve kterém však nevydrží dlouho. Následně přejde buď fluorescencí do základního stavu, nebo mezisystémovou konverzí do tripletového stavu, v němž může reagovat s okolními

molekulami. Rozlišujeme 2 typy fotoefektu, ke kterým zde může dojít. Tyto typy také rozebereme v následujících částech.

V obou typech fotoefektu nakonec vznikají ROS, které oxidativně porušují okolní buněčné struktury. Snažíme se dosáhnout smrti buněk nekrózou. Je-li však nádor příliš



Obr. 3: Optické okno ve tkáních. Absorpční spektra důležitých chromoforů, v logaritmické škále (převzato z [3])

velký nebo koncentrace PS nízká, dochází k řízené buněčné smrti, apoptóze [11]. Ta je sice pro tělo pacienta výhodnější, neboť na rozdíl od nekrózy nevyvolává zánětlivou reakci, a rekonvalescence je tak rychlejší. Ovšem dávka terapie způsobující apoptózu je nižší a nemusí být dostatečná pro likvidaci celé léze a je tak nutné opakování terapie. Často se tedy volí vyšší dávka, vyvolávající nekrózu, aby byl terapeutický efekt zajištěn.

3.2.1 Podání PS

PS můžeme podávat topicky, na dané místo, nebo systémově. Při topickém podání aplikujeme PS pouze na určené místo například potřením kůže. Při systémovém podání se PS dostává do krevního oběhu. Obecně je při systémovém podání větší riziko nežádoucích účinků.

Při systémovém podání PS aplikujeme perorálně, ústy, nebo intravenózně. Při intravenózním podání se látka rychleji akumuluje v tkáni a později i rychleji vyloučí.

Informace v částech 3.2 a 3.2.1 byly čerpány z [3], [8], [9], [11], [12].

3.2.2 Selektivní akumulace v tkáni

Při PDT chceme, aby se PS hromadil pouze v poškozené tkáni a my tak neničili i tkáň zdravou. K této akumulaci skutečně dochází. V nádorových buňkách je totiž málo železa a tedy nižší aktivita ferochelatázy (enzym podílející se na tvorbě hemu) [12]. Verteporfin se také hromadí v novotvořené tkáni, neboť se při intravenózní aplikaci váže k plazmovým lipoproteinům. Rychle se množící buňky potřebují pro svůj růst a dělení mnoho stavebních látek, proto vychytávají LDL z krevní plazmy mnohem rychleji než ostatní buňky [9].

V nádorových tkáních též dochází k tzv. EPR efektu (Enhanced Permeation and Retention Effect). Krevní cévy v nádoru bez lymfatické drenáže jsou více propustné. Nádor tak může získat látky, aby mohl růst. Koncentrace polymerních látek je zde 5krát až 10krát větší než v krevní plazmě den po intravenózním podání [13]. Doba, po kterou PS v tkáni zůstává, je prodlužovaná sníženou lymfatickou drenáží.

Přestože se PS v nádorové tkáni skutečně hromadí, není rozdíl koncentrace v ní a mimo ni tak výrazný, jak bychom potřebovali. Aby tedy nedocházelo k ničení zdravé tkáně, je třeba použité světlo co nejpřesněji zacílit do daného místa [12].

3.2.3 Fotoefekt I. a II. typu

Vraťme se nyní k principu PDT, do fáze, kdy je PS excitovaný do prvního excitovaného tripletního stavu. Jak jsme již zmiňovali výše, rozlišujeme dva typy fotoefektu, kterými může PS reagovat s okolními molekulami.

Při fotoefektu typu I reaguje PS s biomolekulami. Dochází k přesunu vodíku nebo elektronu za vzniku oxidovaných substrátů a redukovaných PS. Ty pak reagují s $^3\text{O}_2$ a vznikají radikálové formy ROS. Jejich působením dochází k oxidativnímu poškození buňky. Fotoefekt typu I je ovlivněn koncentrací cílových substrátů, jeho význam tedy stoupá s koncentrací PS [3], [14], [15].

Při reakci označované jako fotoefekt typu II dochází k přenosu energie z PS rovnou na $^3\text{O}_2$. Vzniká tak $^1\text{O}_2$, který je 1000x reaktivnější než kyslík v základním stavu. Okamžitě začíná reagovat s biomolekulami (membránovými lipidy, proteiny a DNA), které tato oxidační reakce poničí. Fotoefekt typu II závisí na koncentraci kyslíku [8], [9], [12].

Při destrukci tkáně pravděpodobně převažuje fotoefekt typu II.

3.3 Výhody PDT oproti jiným terapeutickým možnostem

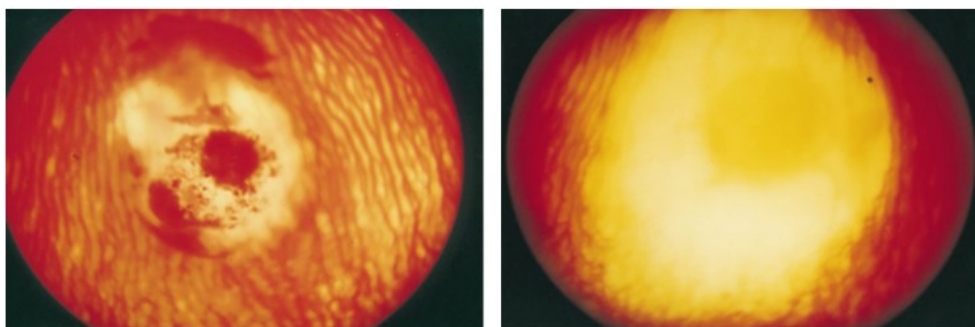
Jak již bylo řečeno výše, koncentrace PS je vyšší v poškozené tkáni a dokážeme zacílit světelný zdroj tak, abychom ozařovali pouze potřebnou tkáň. PDT tedy působí pouze na nádorovou či jinak postiženou tkáň a pro okolní tkáň je její toxicita jen nízká. To je velká výhoda oproti chemoterapii, kde je ovlivněn celý organismus, nebo radioterapii (ozařování), při níž dostává dávku záření i okolní tkáň (ačkoli i zde existují postupy, jak tento nedostatek omezit) [8], [12], [14], [16].

Další nespornou výhodou PDT je absence vedlejších účinků známých z chemoterapie a radioterapie, jako je osteoporóza, atrofie kůže, nevolnost a únava, genetické mutace a vznik nádorů [17], [16] [18].

I PDT má samozřejmě nežádoucí účinky. Jsou jimi bolest při aplikaci a fotosenzitivita kůže.

3.4 Aplikace PDT

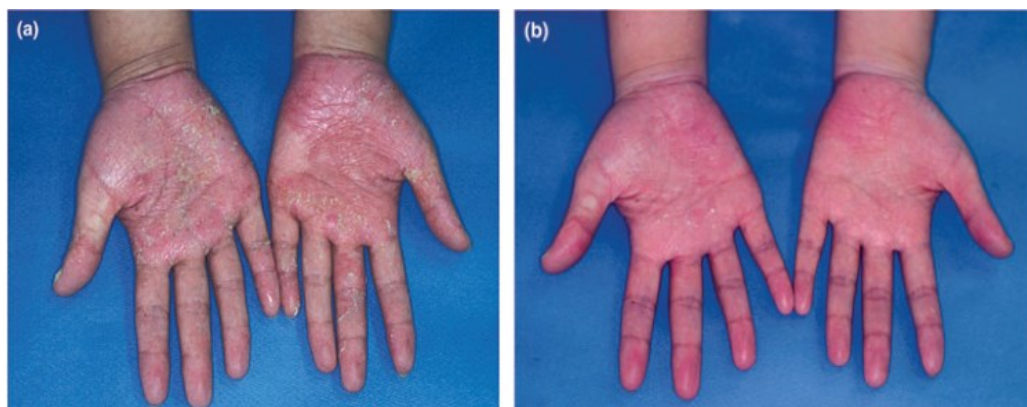
Asi nejdůležitější a nejdiskutovanější aplikací PDT, jak je zřejmé již z předchozího textu, je využití při léčbě onkologických onemocnění. Na obr. 4 můžeme nahlédnout, jak vypadá nádor v oftalmoskopii před aplikací PDT (vlevo), a že dva týdny poté je menší a bezcévný (vpravo). PDT lze také využít při odhalování onkologických onemocnění.



Obr. 4: Nádor před PDT a dva týdny po ní viděn pomocí oftalmoskopie (převzato z [4])

Není to ovšem jediná aplikace PDT.

V dermatologii se, mimo léčení kožních nádorů, pomocí PDT dosahuje úspěchů i např. v léčbě lupénky [19]. Na obr. 5 opět můžeme porovnat vzhled kůže před aplikací PDT a po ní.



Obr. 5: Léčba lupénky pomocí PDT. Vlevo stav před zahájením léčby, vpravo stav po léčbě (převzato z [35])

V oftalmologii se setkáváme s využitím PDT pro léčbu chorioidální neovaskularizace či věkem podmíněné makulární degenerace [9].

Z mnoha dalších oborů jmenujme ještě gastroenterologii, ve které se setkáváme s PDT jako se způsobem odhalování Barretova jícnu [19].

Zkoumané je také použití PDT v léčbě bakteriálních a virových infekcí, např. HIV a hepatitidy. Tato léčba se ovšem v praxi nepoužívá kvůli finanční náročnosti. PDT by se však mohla uplatnit v léčbě rezistentních bakteriálních kmenů [11].

Fotodynamické látky se kromě medicíny používají také jako pesticidy, detoxikační činidla či k čištění vody [6].

3.5 Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD)

Jako AMD označujeme degenerativní oční onemocnění vyskytující se především u osob starších 60 let. Rozlišujeme dva typy AMD.

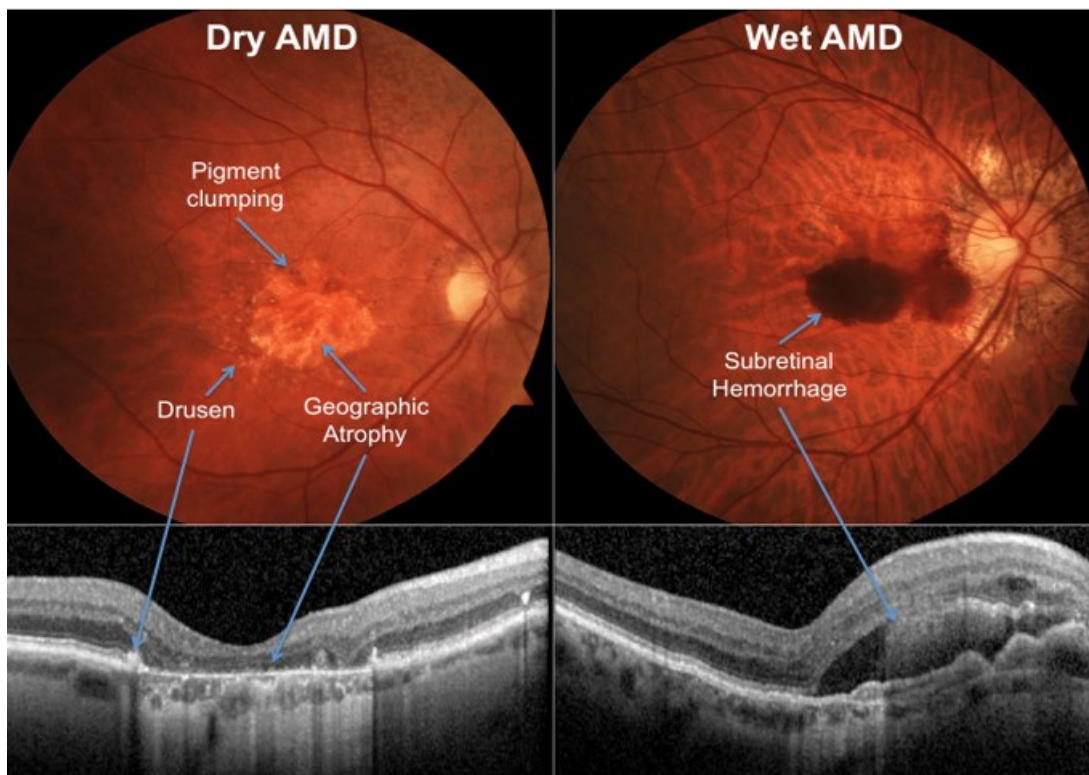
Při *suché* či *nonexsudativní* formě dochází k postupné ztrátě ostrosti zraku v centrální části zorného pole. Ačkoli přesná příčina onemocnění není známá, lze nalézt faktory, které riziko onemocnění zvyšují, jako jsou zvýšený cholesterol či zvýšený systolický tlak [9]. Lidé trpící AMD mají z více než 80 % suchou formu [4], [9].

Při *vlhké* (či *exsudativní* a *neovaskulární*) formě dochází ke vzniku nových cév v sítnici, většinou v oblasti pod středem foveální avaskulární zóny. Prorůstají Bruchovou membránou. Přesný důvod, proč nové cévy vznikají, není znám. Tyto nové cévy prosakují, což vede k odchlípení sítnice, krvácení pod sítnicí a vzniku jizev. Tyto

změny způsobují nevratnou ztrátu zraku. Oproti suché formě je postup vlhké formy mnohem rychlejší [4], [9].

Vlhkou formu AMD lze u malé části pacientů léčit PDT s verteporfinem [4]. Tato léčba je ovšem v současnosti vytlačována kombinovanou léčbou s anti-VEGF (vaskulární endotelový faktor) preparáty [9].

Na obr. 6 jsou znázorněny změny na sítnici v důsledku suché i vlhké formy AMD.



Obr. 6: Suchá AMD (vlevo) a vlhká AMD (vpravo) (převzato z [36])

3.6 Vlastnosti ideálního fotosenzibilizátoru

Jako o ideálním PS mluvíme o chemicky čisté látce známého složení, kterou je v případě potřeby snadné syntetizovat, uchovávat a vykonávat kontrolu kvality a to vše co nejlevněji [16], [18], [10].

Důležité je, aby se PS akumuloval přednostně v tkáni, kterou pomocí něj chceme léčit. Pro jiné tkáně by ideální PS ani jeho degradační produkty neměly být toxické, měl by snadno vytvářet ROS i $^1\text{O}_2$ [10], [20].

Absorpční maximum ideálního PS by se mělo nacházet v rozmezí vlnových délek terapeutického okna 600 nm až 800 nm [16], [18] ([10] uvádí 680 nm-800 nm).

PS postupem času v důsledku narušení chromoforu, které je způsobeno $^1\text{O}_2$ nebo fotoreakcemi typu I, ztrácí schopnost absorpce. Tento proces se nazývá vybělování,

photobleaching. PS je tím méně stabilní, čím vyšší vlnové délky absorbuje. Photobleaching snižuje nežádoucí účinky PDT, neboť PS již neabsorbuje světlo, což snižuje riziko poškození zdravé tkáně [10].

3.6.1 Typy PS

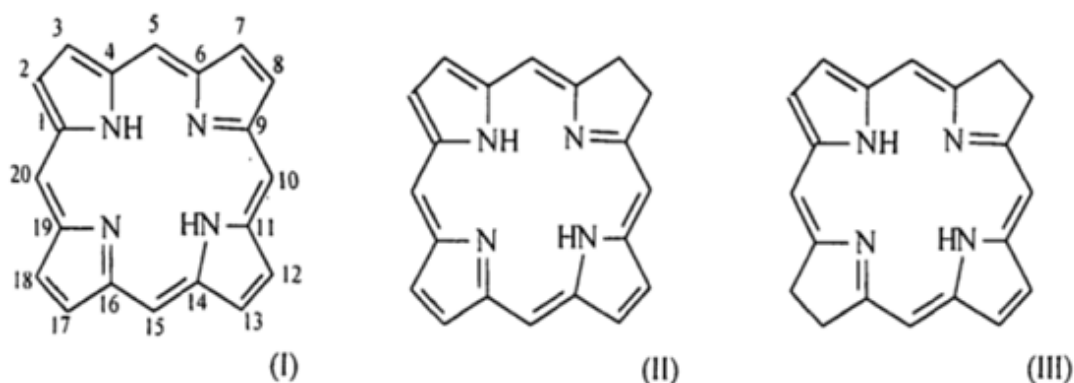
Dělit PS můžeme dle různých kritérií: podle vzniku, syntetické čistoty, cílení, chemické struktury či generace.

Kritérium vzniku rozděluje PS na přírodní (např. porfyriny, chlorofyl, bilirubin) a syntetické (např. fluorescein, eosin B) [6].

Dle chemické čistoty jednoduše dělíme PS na chemicky čisté a složené z několika komponent [21].

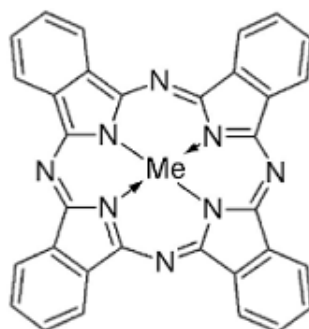
Různé PS se koncentrují v různých typech tkáně nebo cévním systému. V buňkách také mohou cílit na různé orgány. Toto nám shrnuje dělení dle cílení [21].

Dělíme-li PS dle strukturního hlediska, největší skupinou jsou cyklické tetrapyroly. Jsou to deriváty porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů [21]. Porfyriny nejvíce absorbují světlo s vlnovou délkou okolo 630 nm. U chlorinů, tetrapyrólů s redukovanou dvojnou vazbou se vlivem této redukce posunuje maximum absorpance na 650 nm až 690 nm. Bakteriochloriny mají redukované dvě dvojně vazby, maximum absorpance je posunuto až na 740 nm až 800 nm [3]. Struktura v tomto odstavci zmiňovaných látek je zakreslena na obr. 7.



Obr. 7: Struktura porfyrinu (I), chlorinu (II) a bakteriochlorinu (III) (převzato z [8])

Druhá skupina dle strukturního hlediska zahrnuje ftalocyaniny a naftalocyaniny. Maximum absorpance je nad vlnovou délkou 650 nm. Tyto látky jsou špatně rozpustné a špatně agregují [3]. Struktura ftalocyaninů je znázorněna na obr. 8.



Obr. 8: Struktura ftalocyaninů, Me je centrálně vázaný kovový ion (převzato z [8])

PS se také dělí podle generací. V první generaci nalzáme deriváty hematoporphyrinu (Photofrin®). Nevýhodou první generace PS jsou potřebné velké dávky a nežádoucí hromadění v kůži, které způsobuje fotosenzitivitu. Nejvíce absorbují vlnové délky v rozmezí 400 nm a 630 nm, takové světlo ovšem nepronikne v tkáni hluboko [14].

Důvodem vývoje druhé generace bylo omezit nevýhody první generace. PS druhé generace tak mají absorpční maximum pro vlnové délky 660 nm až 800 nm, které lépe pronikají do tkáně. V kůži se nehromadí dlouhodobě, čímž se omezí fotosenzitivita pacienta [14].

Dochází také k vývoji třetí generace PS, které budou zabaleny ve vhodných přenašečích a bude tak snazší dopravit PS do potřebné tkáně [8], [14].

3.6.2 Verteporfin

Představme si nyní blíže PS, o který se bude opírat praktická část této práce.

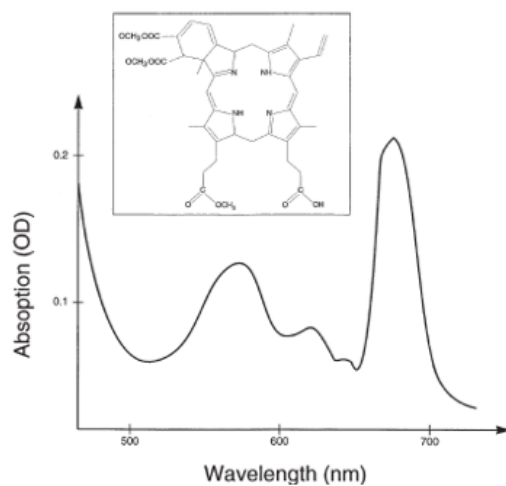
Verteporfin patří do druhé generace PS. Jedná se o derivát porfyrinu patřící mezi chloriny. V medicíně se s ním setkáváme pod obchodním názvem Visudyne®, byl vyvinut společností QLT Phototherapeutics v kanadském Vancouveru [20]. Jedná se o chemicky stabilní sloučeninu, která dobře produkuje $^1\text{O}_2$ [4].

Absorpční maximum verteporfinu můžeme najít v oblasti UVA, ale i mezi 680 nm a 695 nm (absorpční spektrum a struktura verteporfinu jsou vykresleny na obr. 9). Ve srovnání s hematoporphyrinem absorbuje verteporfin vlnové délky pronikající tkáni čtyřikrát více a buňky ničí až desetkrát účinněji [4].

Verteporfin je špatně rozpustný ve vodě, podává se tedy ve formě lipozomu, konkrétně lyofilizovaného prášku. V oběhu se snadno váže s LDL. Jimi vytvořený komplex se pak akumuluje v rychle se množících (proliferujících) buňkách [4]. Intravenózní aplikace bývá provedena pouze 15 minut před aktivací verteporfinu laserem

[10] (dle [20] 30 až 150 minut). Verteporfin se poměrně rychle z tkáně i vyplavuje. Následná fotosenzitivita kůže přetrvává až dva dny po léčbě [10].

Největších úspěchů bylo pomocí verteporfinu dosaženo v oftalmologii, kde se využívá k léčbě AMD. Působením PDT verteporfinem totiž dochází k narušení a uzávěru cév [10]. Byla provedena studie, do níž se zapojilo 609 pacientů. Po roce se stav 61 % procent pacientů léčených PDT verteporfinem zlepšil [22].



Obr. 9: Absorpční spektrum a struktura verteporfinu (převzato z [4])

4 Experimentální metody

4.1 Absorpční spektroskopie

Spektroskopie se zabývá zkoumáním látek na základě elektromagnetického záření. Je-li zdrojem tohoto záření zkoumaná látka, mluvíme o emisní spektroskopii. Zkoumáme-li naopak, jaké záření látka pohlcuje, jedná se o absorpční spektroskopii. Podle vlnové délky záření, které látka vyzářila, či pohltila, můžeme určit, o kterou látku se jedná [23].

K popsání množství světla, které bylo látkou pohlceno, je zavedena veličina zvaná absorbance A . Tato veličina je definována vztahem [24]

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi}, \quad (1)$$

v němž Φ_0 značí původní tok záření a Φ tok záření po průchodu zkoumanou látkou. Absorbanci měříme spektrometrem. Pomocí této veličiny můžeme také určit látkovou koncentraci c látky, a to dle Lambertova-Beerova zákona [25]

$$A = \varepsilon_\lambda b c, \quad (2)$$

kde ε_λ je molární absorpční koeficient látky při záření vlnové délky λ , b tloušťka absorpční vrstvy.

4.2 Fluorescenční spektroskopie

Princip této metody spočívá v tom, že látku vybudíme do excitovaného stavu. Z tohoto stavu, jak bylo popsáno již výše, se látka může vrátit fluorescencí – vyzářením přebytečné energie ve formě fotonu. V závislosti na vlnové délce můžeme rozhodnout, o jakou látku se jedná, či určit její koncentraci i tam, kde ji nejsme schopni určit pomocí absorbance [26], [27].

Měření probíhá tak, že PS excitujeme do vzbuzeného stavu laserem. Světlo vzniklé fluorescencí pak rozdělíme podle vlnových délek emisním monochromátorem a detektorem změříme závislost intenzity na vlnové délce – tzv. fluorescenční emisní spektrum.

4.3 Časově rozlišená detekce fosforescence

Mějme PS v excitovaném stavu $^1\text{PS}^*$. Jeho část přechází do základního stavu ^1PS fluorescencí nebo vnitřní konverzí. Zbytek přechází do tripletního stavu ^3PS . Z tripletního stavu může PS přejít do základního několika způsoby, každé z těchto cest přísluší rychlostní konstanta k_i definovaná jako [1]

$$R_i = k_i N, \quad (3)$$

kde N označuje počet molekul v původním stavu a R_i počet přechodů za jednotku času po dané cestě. Tyto cesty jsou:

- Nezářivá interakce s $^3\text{O}_2$, při níž vzniká $^1\text{O}_2$, rychlostní konstanta $k_{T_1\Delta}$
- Nezářivá interakce s $^3\text{O}_2$, při níž nevzniká $^1\text{O}_2$, rychlostní konstanta $k_{T_1\text{O}_2}$
- Nezářivá interakce se zhášecem Q, rychlostní konstanta k_{T_1Q}
- Nezářivá interakce s rozpouštědlem, rychlostní konstanta k_{T_1}
- Nezářivá interakce s PS, rychlostní konstanta $k_{T_1S_0}$
- Fosforescence, rychlostní konstanta $k_{T_1^*}$
- Interakce ^3PS a ^3PS , při níž vzniká ^1PS a $^1\text{PS}^*$ (tzv. triplet-tripletní anihilace), rychlostní konstanta k_{TT}
- Singletním kyslíkem senzitivovaná zpožděná fluorescence, rychlostní konstanta k_{SOSDF}

Pro časový vývoj populace ^3PS ve vzorku pak můžeme psát diferenciální rovnici [1]

$$\frac{d}{dt} [^3\text{PS}] = k_{\Delta T_1} [^1\text{O}_2] [^1\text{PS}] - (k_{T_1\Delta} [^3\text{O}_2] + k_{T_1S_0} [^1\text{PS}] + k_{T_1\text{O}_2} [^3\text{O}_2] + k_{T_1} + k_{T_1^*} + k_{T_1Q} [Q] + k_{TT} [^3\text{PS}] + k_{SOSDF} [^1\text{O}_2]) [^3\text{PS}]. \quad (4)$$

Hranaté závorky značí koncentraci.

V následujících částech pro naše účely postačí, budeme-li uvažovat jen fosforescenci, zhášení $^3\text{O}_2$ a ostatní relaxační mechanismy shrneme do rychlostní konstanty nezářivých relaxací. Triplet-tripletní anihilaci a singletním kyslíkem senzitivovanou DF pro zjednodušení také zanedbáme.

Podobný vztah jako (4) pro časový vývoj populace můžeme psát i pro $^1\text{O}_2$, přiřadíme-li následujícím dějům rychlostní konstanty:

- Nezářivá interakce s PS, při níž vzniká ^3PS , rychlostní konstanta $k_{\Delta T_1}$
- Nezářivá interakce s $^3\text{O}_2$, rychlostní konstanta $k_{\Delta\text{O}_2}$

- Nezářivá interakce se zhášecem Q, rychlostní konstanta $k_{\Delta Q}$
- Nezářivá interakce s rozpouštědlem, rychlostní konstanta k_{Δ}
- Nezářivá interakce s PS, rychlostní konstanta $k_{\Delta S_0}$
- Fosforescence, rychlostní konstanta k_{Δ^*}
- Singletním kyslíkem senzitivovaná zpožděná fluorescence, rychlostní konstanta k_{SOFDF}

Rovnice pro 1O_2 pak má tento tvar [1]:

$$\frac{d}{dt} [^1O_2] = k_{T_1\Delta} [^3PS] [^3O_2] - (k_{\Delta T_1} [^1PS] + k_{\Delta S_0} [^1PS] + k_{\Delta O_2} [^3O_2] + k_{\Delta} + k_{\Delta^*} + k_{\Delta Q} [Q] + k_{SOFDF} [^3PS]) [^1O_2]. \quad (5)$$

Dále pro zjednodušení i zde singletním kyslíkem senzitivovanou DF zanedbáváme.

Budeme-li uvažovat $k_{\Delta T_1} = 0$, dostáváme pro koncentraci $[^1O_2]$ vztah [1]

$$[^1O_2] = [^3PS]_0 \frac{k_{T_1\Delta}}{K_{T_1} - \widetilde{K}_{\Delta}} \left(\exp(-\widetilde{K}_{\Delta} t) - \exp(-K_{T_1} t) \right), \quad (6)$$

kde jako $[^3PS]_0$ značíme koncentraci 3PS v okamžiku po excitaci. K_{T_1} je převrácená doba života 3PS a

$$\widetilde{K}_{\Delta} = k_{\Delta S_0} [PS] + k_{\Delta O_2} [O_2] + k_{\Delta} + k_{\Delta^*} + k_{\Delta Q} [Q], \quad (7)$$

je rychlostní konstanta, tedy převrácená doba života, singletního kyslíku, kde $[PS]$, resp. $[O_2]$, je počáteční koncentrace PS, resp. kyslíku.

5 Materiály

K měření byl použit verteporfin od firmy Sigma s katalogovým číslem SML0534-25MG.

Zásobní roztok měl koncentraci $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a byl připraven smícháním $(1,7 \pm 0,1)$ mg verteporfinu s 11,8 ml dimethylformamidu (DMF).

Zásobní roztok byl pro potřeby měření dále ředěn DMF na koncentrace $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Ředění probíhalo pomocí automatických pipet.

Pro měření absorpčních i fluorescenčních spekter byly použity fluorescenční kyvety s leštěným dnem. Tloušťka kyvet při měření absorpčních spekter byla 1 mm pro koncentrace $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a 10 mm pro koncentrace $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Při měření fluorescenčních spekter jsme využili 10mm kyvetu pro všechny koncentrace.

6 Experimentální uspořádání

6.1 Absorpční spektrometr

Pro měření absorpčních spekter jsme využili dvoupraskový absorpční spektrometr Specord 250 vyrobený firmou Analytik Jena.

6.2 Fluorescenční spektrometr a excitační laser

Měření fluorescenčních spekter bylo provedeno pomocí vláknového spektrometru AvaSpec-2048 firmy Avantes. K excitaci jsme použili modrý polovodičový laser RLDE405M-20-5 od Roithner Lasertechnik GmbH s vlnovou délkou 405 nm.

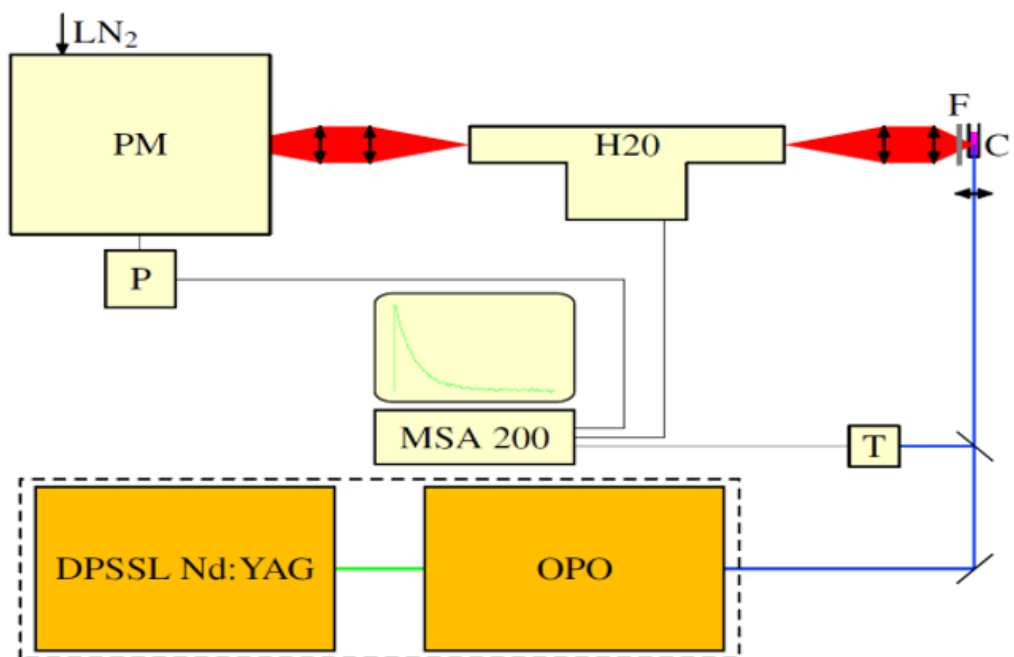
6.3 Aparatura pro detekci infračervené luminiscence

K excitaci jsme použili EKSPLA NT242, což je kombinace pevnolátkového Nd:YAG laseru (DPSSL – diode pumped solid state laser) s Q-switchingem s optickým parametrickým oscilátorem.

Luminiscenci jsme měřili dvěma způsoby.

Nejprve bylo pro měření použito uspořádání znázorněné na obr. 10, tj. přímé měření bez použití světlovodu. Paprsek laseru dopadá na spouštěcí PIN diodu (na obr. 10 označena jako (T)) a kyvetu se vzorkem (C). Fluorescence prochází dlouhovlnným filtrem Schott RG7 (F), jenž je v uspořádání využitý dvakrát, a vysoce světelným monochromátorem Jobin Yvon H20IR (H20) a je detekována PM fotonásobičem Hamamatsu R5509 citlivým až do 1400 nm (PM) a předzesilovačem (P). Signál je pak detekovaný časově rozlišeným čítačem Becker&Hickl MSA200.

Druhým použitým uspořádáním bylo měření se světlovodem. Vzorek byl excitován jedním ramenem rozvětveného světlovodu laserem NT242, sběr luminiscence pak probíhal druhým ramenem světlovodu. Místo dlouhovlnného filtru a monochromátoru byl použit pásmový filtr s maximem propustnosti 1274 nm a šířkou pásma 40 nm. Fotonásobič, předzesilovač a čítač byly stejné jako v předchozím uspořádání.

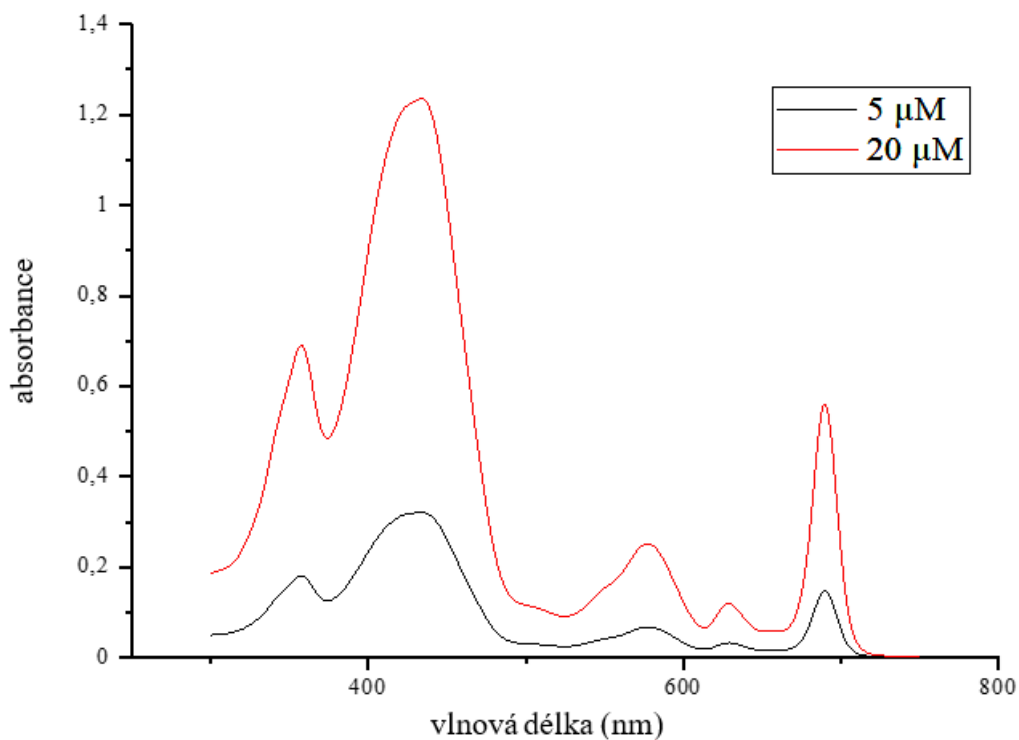


Obr. 10: Schéma uspořádání při přímém měření infračervené luminescence (převzato z [37])

7 Výsledky

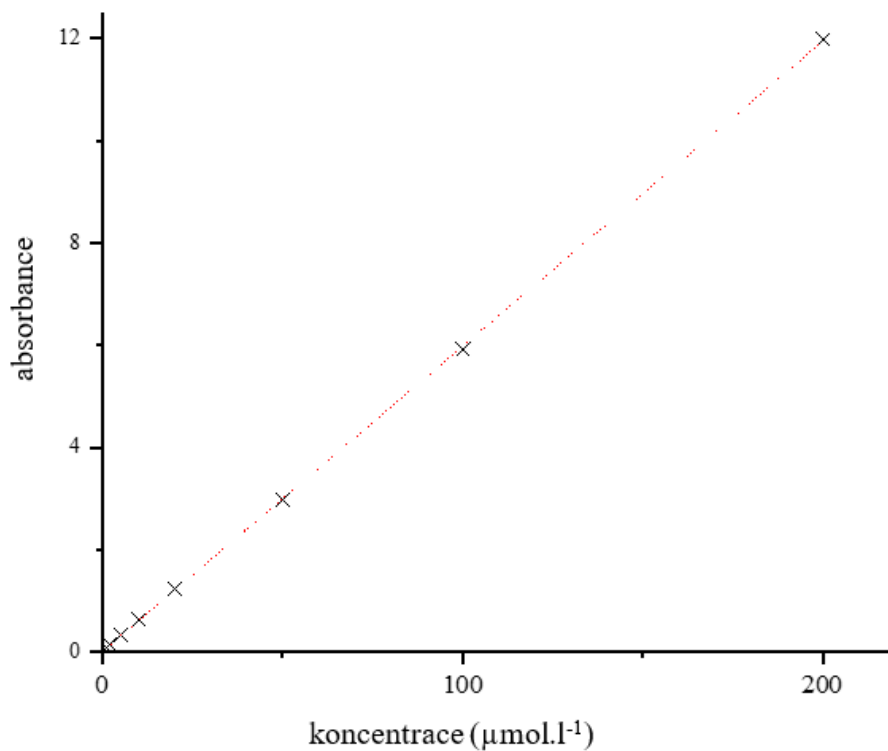
Nejprve byla proměřena absorpční spektra koncentrační řady verteporfinu v DMF. Měření bylo provedeno pro vlnové délky od 300 nm do 750 nm s krokem 1 nm.

Tvar absorpčních spekter byl pro všechny koncentrace stejný, vykazoval několik maxim v okolí vlnových délek 357 nm, 433 nm, 580 nm, 630 nm a 670 nm, měnily se pouze hodnoty naměřené absorbance. Největší absorbance nastávala pro vlnovou délku 433 nm, proto byla tato délka vybrána pro excitaci při měření infračervené luminescence. Na obr. 11 jsou vykreslena absorpční spektra pro koncentrace $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$.



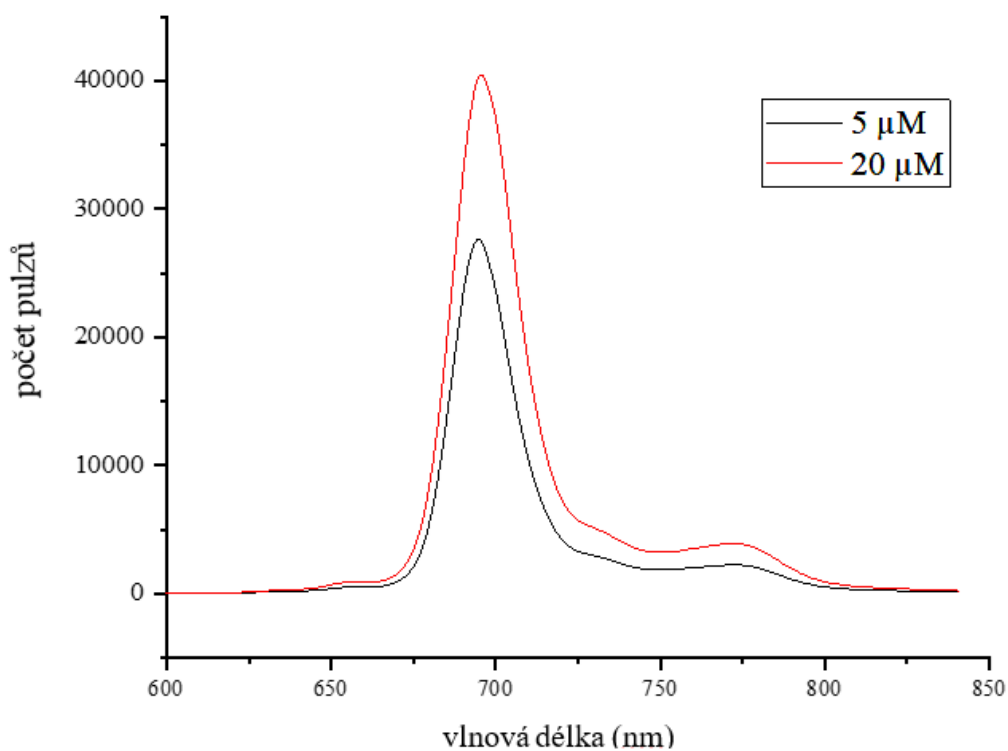
Obr. 11: Naměřené absorpční spektrum verteporfinu v roztoku o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Dle Lambertova-Beerova zákona (vztah (2)) by absorbance měla být lineárně závislá na koncentraci roztoku. Pro ověření tohoto vztahu jsme vybrali hodnoty absorbance pro vlnovou délku 433 nm, okolo které dosahuje absorbance měřených roztoků maxima. Do obr. 12 jsme pak vynesli závislost této absorbance na koncentraci roztoků.



Obr. 12: Závislost absorbance při vlnové délce 433 nm na koncentraci roztoku

Hodnoty byly přepočítány na stejnou tloušťku kyvet. Naměřené hodnoty dobře odpovídají lineární závislosti s regresním koeficientem $(0,0597 \pm 0,0002) \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$.



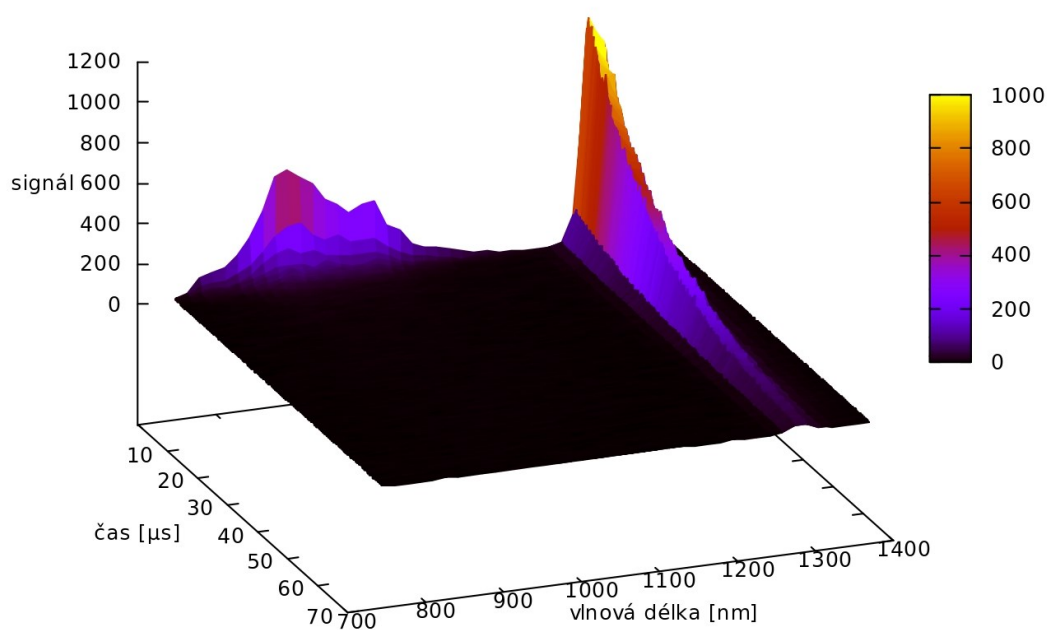
Obr. 13: Naměřené fluorescenční spektrum verteporfinu v roztoku o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Fluorescenční spektra byla měřena s integračním časem 20 ms a 100x průměrována.

Tvary fluorescenčních spekter pro jednotlivé koncentrace verteporfinu se neliší, maxima dosahují na 695 nm (na obr. 13 uvádíme pro příklad koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Při měření kinetik infračervené luminiscence jsme měřili 40 tisíc 5ns kanálů. Vlnová délka laseru použitého k excitaci byla 433 nm, energie jednoho pulzu se pohybovala kolem 10 μJ .

V přímém zapojení bez světlovodu jsme pro koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ proměřili závislost kinetiky infračervené luminiscence na vlnové délce (od 746 nm do 1370 nm). V tomto případě jsme sbírali signál 10 tis. pulzů po sobě s opakující frekvencí 1 kHz. Na obr. 14 uvádíme zjištěnou spektrálně a časově rozlišenou luminiscenci pro koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V okolí vlnové délky 900 nm můžeme pozorovat maximum emise verteporfinu, u 1274 nm kinetiku $^1\text{O}_2$.



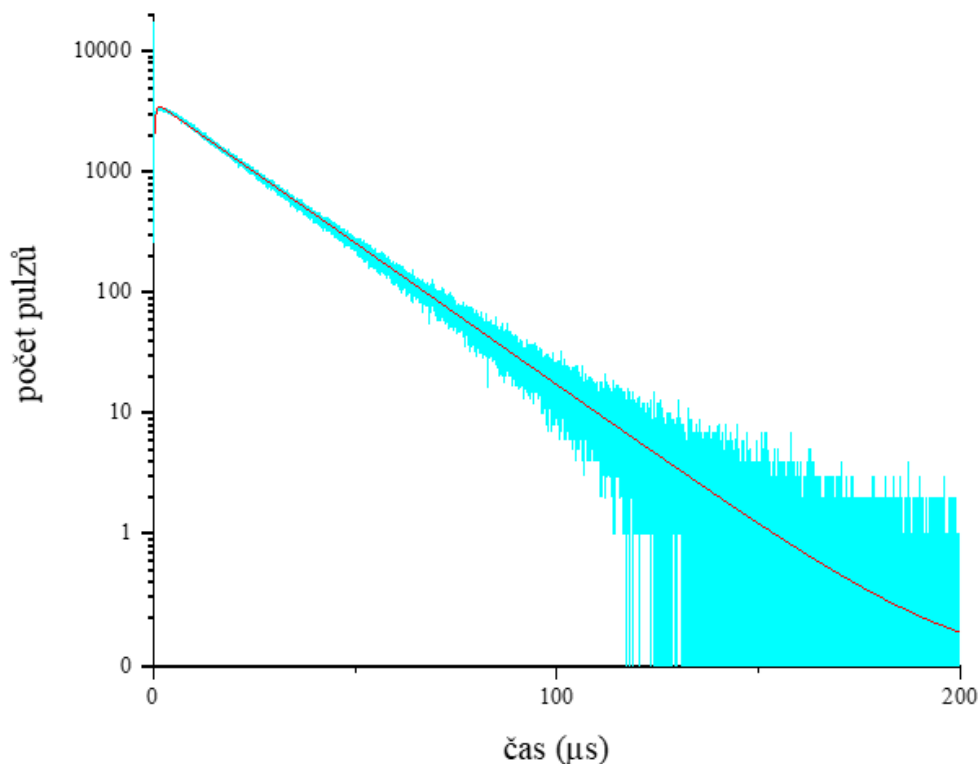
Obr. 14: Spektrálně a časově rozlišená luminiscence pro koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Kinetiku $^1\text{O}_2$ jsme tedy měřili při vlnové délce 1247 nm. Měření proběhlo desetkrát pro všech osm koncentrací roztoků v obou zapojeních popsanych v kapitole 6.3. Při přímém měření jsme sbíraly signál 50 tis. pulzů, při měření se světlovodem jsme z důvodu silnějšího signálu snížili počet pulzů na 20 tis.

Změřené kinetiky jsme fitovali funkcí ve tvaru

$$I(t) = b \cdot \left(\exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) - \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) \right) + a, \quad (8)$$

což je pouze přehledněji zapsaný vztah (6). V tomto vztahu nás zajímají zejména doby života singletního kyslíku t_1 a verteporfinu t_2 . Fitováno bylo od času 0,3 μs , aby se vyloučil vliv rozptýleného excitačního záření a přímé fluorescence verteporfinu.

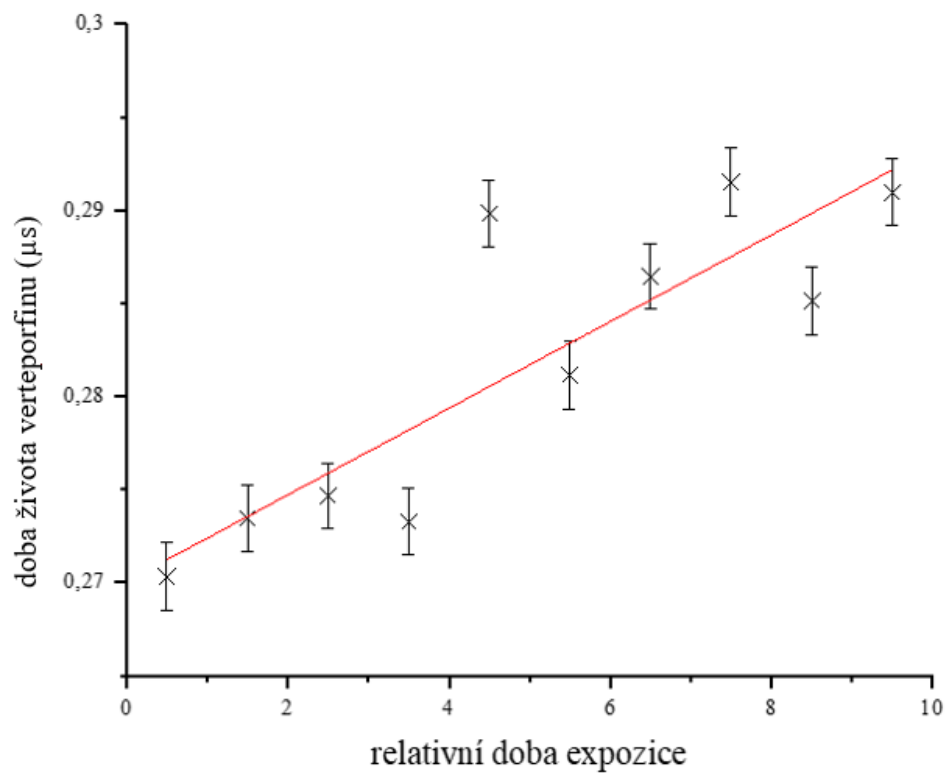


Obr. 15: Kinetika $^1\text{O}_2$ na 1274 nm pro koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$

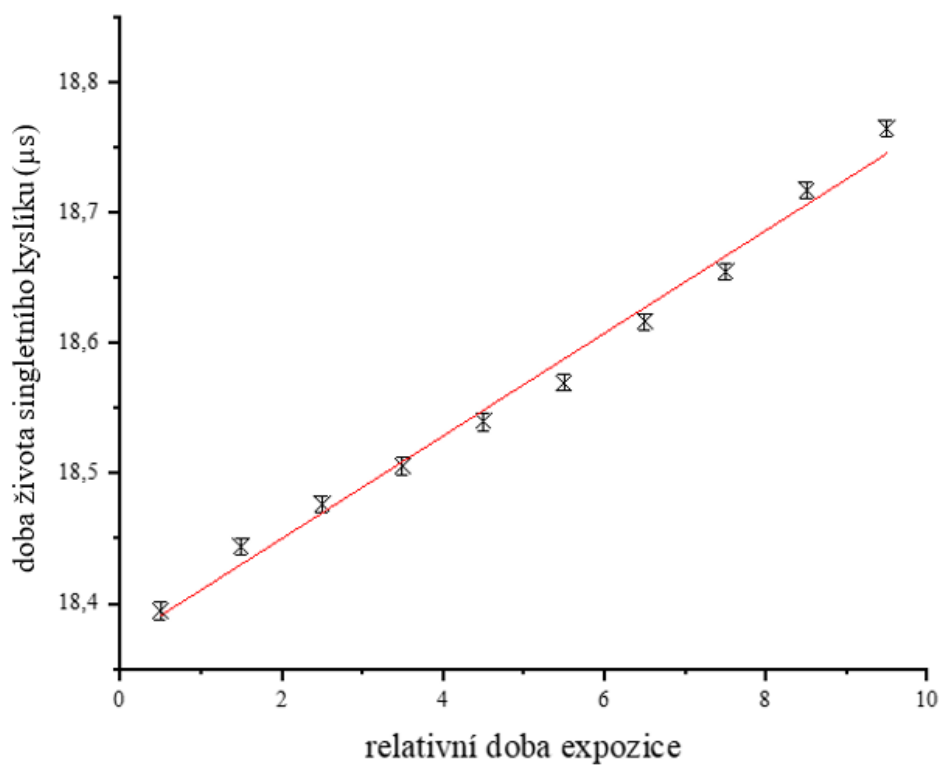
Na obr. 15 uvádíme pro příklad jednu z kinetik naměřenou pro koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v zapojení se světlovodem.

Jak můžeme vidět na obr. 16 a 17, doby života singletního kyslíku t_1 a verteporfinu t_2 se s expozicí vzorku mění. Výsledné hodnoty t_1 a t_2 jsme pro každou koncentraci (zvláště pro každé zapojení) určili lineární extrapolací k nulové expozici.

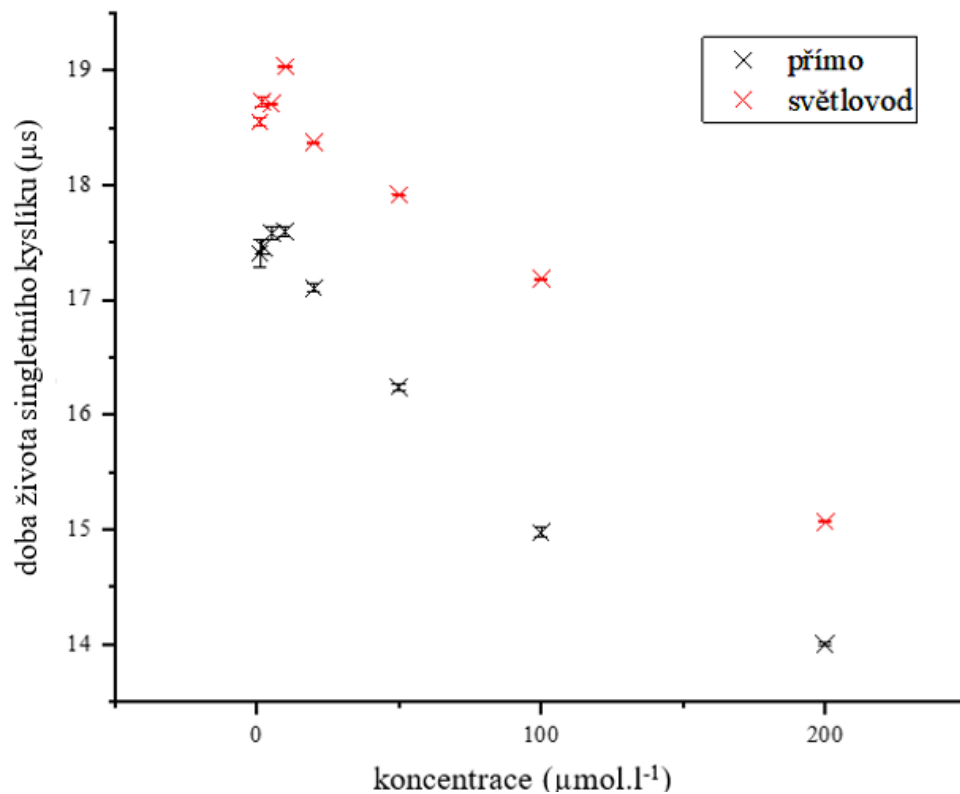
Na obr. 18 byla vykreslena závislost doby života singletního kyslíku t_1 na koncentraci roztoku pro obě uspořádání. Z obr. 18 lze vypožorovat, že doba života singletního kyslíku do koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ mírně roste, poté klesá. Výsledky získané z jednotlivých uspořádání jsou navzájem posunuté.



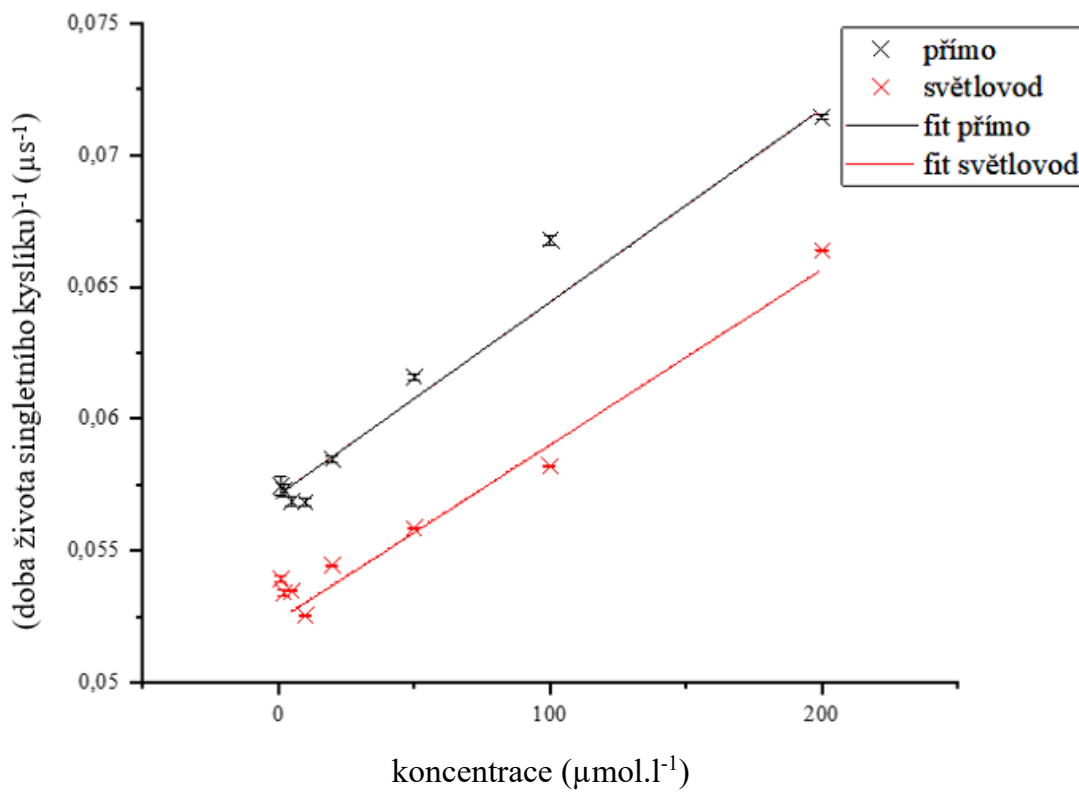
Obr. 16: Závislost doby života verteporfinu na době měření (zde pro příklad při koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a přímém zapojení)



Obr. 17: Závislost doby života singletního kyslíku na době měření (zde pro příklad při koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zapojení se světlovodem)

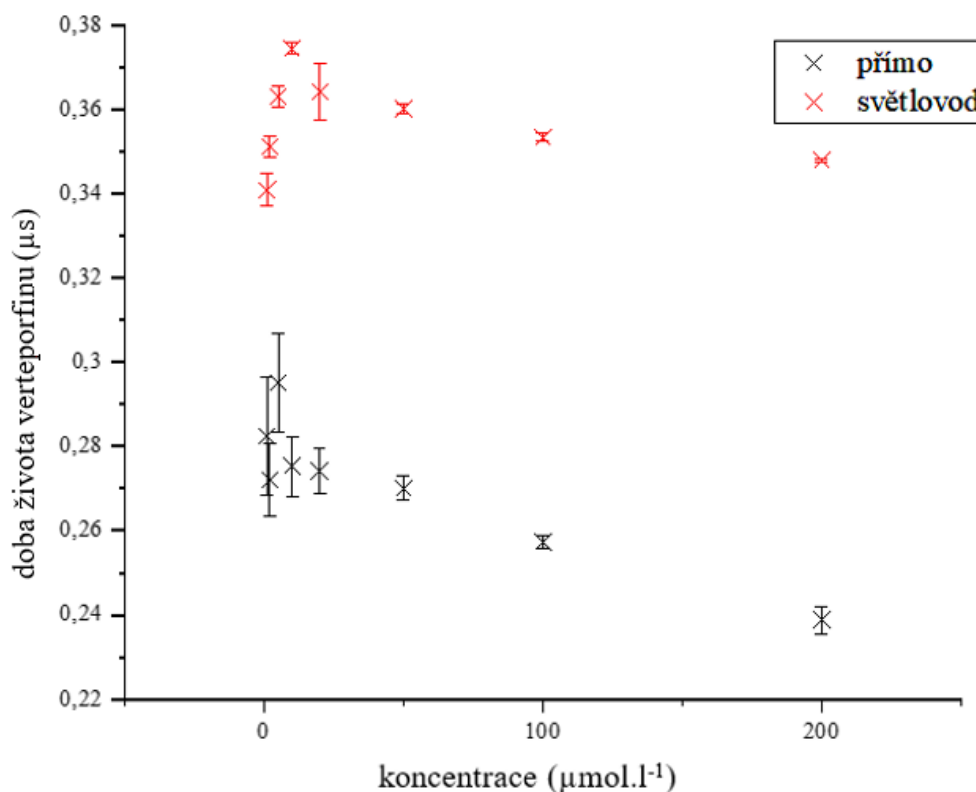


Obr. 18: Zjištěná závislost doby života singletního kyslíku na koncentraci roztoku pro obě detekční metody



Obr. 19: Převrácená závislost doby života $^1\text{O}_2$ na koncentraci pro obě detekční metody s lineárním fitem

Závislost $1/t_1$, vynesena na obr. 19, byla fitována Sternovým-Volmerovým modelem pro hodnoty s monotónním poklesem s koncentrací verteporfinu. Odtud byla určena extrapolovaná hodnota doby života singletního kyslíku ($17,5 \pm 0,2$) μs a zhášecí konstanta $(7,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pro přímé zapojení a pro zapojení se světlovodem extrapolovaná hodnota doby života singletního kyslíku ($19,1 \pm 0,1$) μs a zhášecí konstanta $(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-5} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 20: Zjištěná závislost doby života verteporfinu na koncentraci roztoku pro obě detekční metody

Do obr. 20 byla vykreslena závislost t_2 na koncentraci roztoku pro obě uspořádání. Dle obr. 20 t_2 do koncentrace $5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, resp. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mírně roste, poté klesá. Výsledky získané z jednotlivých uspořádání jsou navzájem posunuté.

Vzorek o koncentraci $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jsme následně nasýtili kyslíkem a v přímém zapojení bez světlovodu jsme desetkrát proměřili kinetiku infračervené luminiscence singletního kyslíku v tomto případě. Na obr. 21 je vynesena spolu s kinetikou vzorku nasyceného vzduchem o stejné koncentraci, která byla měřena při stejném zapojení. Na obr 21. zobrazujeme pouze čas do $20 \mu\text{s}$, kdy je rozdíl nejlépe patrný.

Z obr. 21 vidíme, že kinetika vzorku nasyceného kyslíkem je o něco silnější.

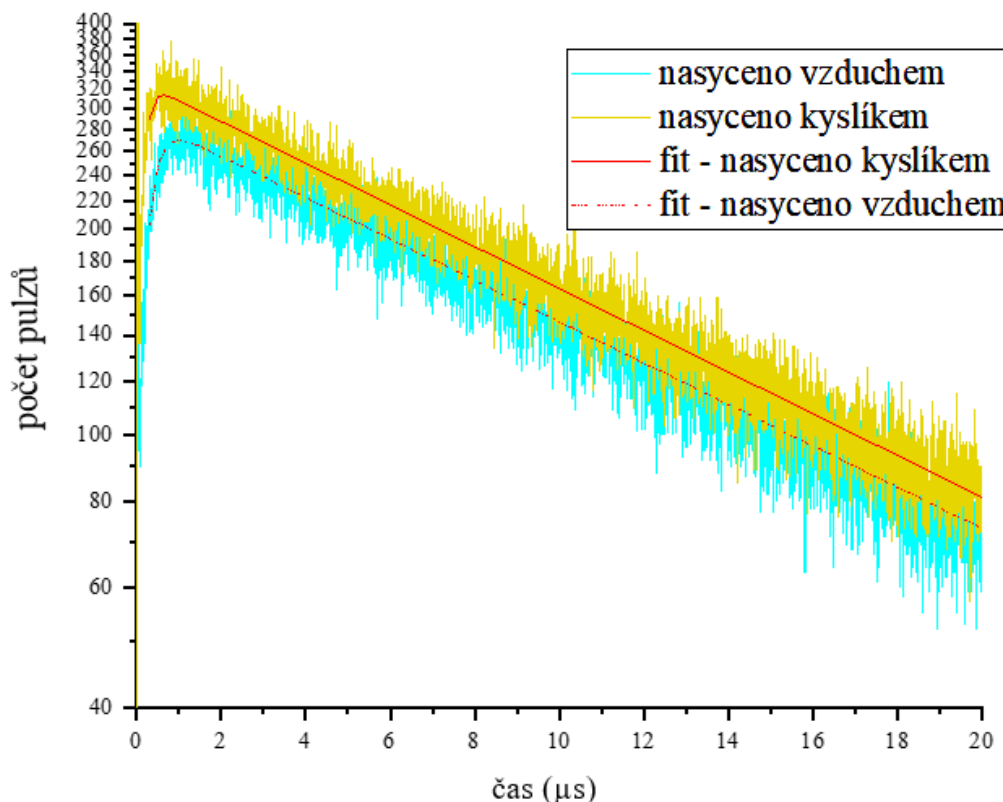
Doba života $^1\text{O}_2$ t_1 je v obou případech podobná (pro vzorek nasycený vzduchem ($14,00 \pm 0,02$) μs a pro vzorek vyublaný kyslíkem ($14,30 \pm 0,02$) μs). Doba života

tripletů verteporfinu t_2 se po vyublání kyslíkem podstatně liší (pro vzorek nasycený vzduchem je $(0,239 \pm 0,003) \mu\text{s}$ a pro vzorek vyublaný kyslíkem $(0,111 \pm 0,004) \mu\text{s}$). Z toho můžeme odhadnout konstantu zhášení tripletů verteporfinu kyslíkem, jelikož víme, že koncentrace rozpuštěného kyslíku v DMF je cca 2,4x vyšší než ve vodě [28], kde činí $0,28 \text{ mmol.l}^{-1}$ v rovnováze se vzduchem a $1,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ v rovnováze s čistým kyslíkem [29], a že závislost t_2 na koncentraci kyslíku má tvar [1]

$$\frac{1}{t_2} = \frac{1}{t_{20}} + k_q[\text{O}_2], \quad (9)$$

kde $\frac{1}{t_{20}}$ je konstanta.

Náš výsledný odhad konstanty zhášení tripletů verteporfinu kyslíkem tedy je $(1,79 \pm 0,30) \cdot 10^9 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Chyba byla určena z chyb dob života verteporfinu v jednotlivých případech a zákona o přenosu chyb nepřímých měření.



Obr. 21: Srovnání kinetiky infračervené luminiscence vzorku nasyceného kyslíkem a vzorku nasyceného vzduchem, přiblížené na čas do $20 \mu\text{s}$

8 Diskuze

Naměřená absorpční spektra se shodují s předpokladem, jak můžeme vidět z porovnání obr. 9 a 11.

Ze shodného tvaru absorpčních spekter pro všechny měřené koncentrace a platnosti Lambertova-Beerova zákona lze usuzovat, že v žádném ze vzorků nedochází ke vzniku agregátů.

Ani tvary fluorescenčních spekter se pro jednotlivé koncentrace neliší, což potvrzuje náš předpoklad, že ve vzorcích nedochází k agregaci. Z konkrétních naměřených hodnot fluorescenčního spektra nemůžeme v tomto případě nic usuzovat, neboť pro vyšší koncentrace je snižuje tzv. efekt vnitřního filtru, tj. u koncentrovanějších roztoků jsou vzdálenější vrstvy kapaliny excitovány mnohem menší intenzitou světla. Naměřená spektra odpovídají tvarem i polohou maxima spektrům publikovaným v [30].

Kinetiky infračervené luminiscence $^1\text{O}_2$ dobře odpovídají modelové funkci (8).

Pokles dob života $^1\text{O}_2$ s rostoucí koncentrací verteporfinu, pozorovatelný na obr. 18, naznačuje, že verteporfin zhasí $^1\text{O}_2$. Může též hrát roli zhasení singletního kyslíku mechanismem singletním kyslíkem senzitivované DF, kdy při srážce fotosenzibilizátoru v tripletním stavu s $^1\text{O}_2$ dojde ke zhasení $^1\text{O}_2$ a k vzniku singletního stavu fotosenzibilizátoru. Tím se snižují doby života fotosenzibilizátoru i singletního kyslíku s jejich rostoucí koncentrací.

Je-li zkracování doby života $^1\text{O}_2$ způsobeno zhasením verteporfinem, pak je přirozená doba života $^1\text{O}_2$ v DMF ($17,5 \pm 0,2$) μs . [31] pro jiné senzibilizátory uvádí rozmezí 14 μs a 25 μs .

Doby života verteporfinu zpočátku s koncentrací rostou, dále pak klesají. Nárůst dob života fotosenzibilizátoru s jeho koncentrací byl již dříve pozorován pro protoporfyrin IX [32] nebo meso-tetra(1-methyl-4-pyridinio)porfin (TMPyP) [33], ale v těchto případech doba života monotónně rostla k semisaturované hodnotě a nikdy s rostoucí koncentrací fotosenzibilizátoru neklesala. Tento pokles může být způsobený triplet-tripletní anihilací, při níž spolu dva tripletní stavy verteporfinu při srážce vytvoří jeden základní a jeden singletní excitovaný stav, nebo také vlivem singletním kyslíkem senzitivované DF.

Výsledky získané měřením přímo a měřením se světlovodem se systematicky liší. Tento rozdíl lze vysvětlit jinou hustotou excitace v obou uspořádáních. Při přímém měření je laser zaostřen do úzké stopy, v níž je vysoká hustota ozáření. Ve stopě

laseru tak vzniká vysoká koncentrace tripletů verteporfinu a singletního kyslíku. V divergentní stopě na výstupu optického vlákna je hustota ozáření výrazně nižší, a tak je i nižší koncentrace excitovaných stavů obou látek a tím je nižší vliv triplet-tripletní anihilace i singletním kyslíkem senzitivované DF. Proto jsou doby života při měření světlovodem systematicky delší.

K lepšímu porozumění důvodům rozdílu při přímém měření a měření se světlovodem by mohlo pomoci změřit absorpční a fluorescenční spektra i po měření infračervené luminiscence $^1\text{O}_2$ či k měření vždy použít čerstvě namíchaný vzorek. Podíl mechanismů DF by pak bylo třeba měřit separátně na vlnové délce fluorescence verteporfinu. Toto nebylo možné realizovat z důvodu pandemické situace.

9 Závěr

Změřili jsme absorpční spektra řady koncentrací verteporfinu v DMF. Z těchto spekter usuzujeme, že ve zkoumaném rozsahu koncentrací verteporfin neagreguje. Tento závěr potvrdilo měření fluorescenčních spekter.

Pro řadu koncentrací od $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byly změřeny kinetiky luminescence $^1\text{O}_2$ na 1274 nm. Z nich byly fitací získány doby života tripletů verteporfinu a $^1\text{O}_2$. Bylo zjištěno, že závislosti dob života na koncentraci jsou netriviální, pro nízké koncentrace obě doby života rostou, pro vyšší koncentrace se snižují. Toto chování závislosti dob života je způsobeno zhášením $^1\text{O}_2$ samotným verteporfinem i bimolekulárními procesy DF jako je triplet-tripletní anihilace a singletním kyslíkem senzitivovaná DF. Tyto jevy se projevily i rozdílem obdržených dob života při srovnání měření s excitací zaostřeným laserovým svazkem a rozptýleným svazkem ze světlovodu, kdy se liší hustota excitace a tedy i hustota tripletů verteporfinu a singletního kyslíku.

Ze závislosti dob života $^1\text{O}_2$ na koncentraci verteporfinu byla určena zhášecí konstanta $(7,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pro přímé zapojení a $(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-5} \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pro zapojení se světlovodem. Ze srovnání měření ve vzorku v rovnováze se vzduchem a s čistým kyslíkem jsme určili konstantu zhášení tripletů verteporfinu kyslíkem jako $(1,79 \pm 0,30) \cdot 10^9 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Všechny úkoly bakalářské práce byly splněny.

Seznam použité literatury

- [1] SCHOLZ, Marek. *Role antioxidantů v biologických systémech*. Praha, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce RNDr. Roman Dědic, Ph.D.
- [2] SKÁLA, Lubomír. *Kvantová teorie molekul*. Vydání první. Praha: Karolinum, 1995. ISBN 80-7184-007-6.
- [3] CASTANO, Ana P., Tatiana N. DEMIDOVA a Michael R. HAMBLIN,. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(4), 279-293. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4
- [4] SCHMIDT-ERFURTH, Ursula a Tayyaba HASAN. Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology*. 2000, **45**(3), 195-214. Dostupné z: doi:10.1016/s0039-6257(00)00158-2
- [5] SCHOLZ, Marek a Roman DĚDIC. Singlet Oxygen-Sensitized Delayed Fluorescence. In: NONELL, Santi a Cristina FLORS (ed.). *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Vydání první. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016, s. 63-82. ISBN 978-1-78262-220-9.
- [6] PAVELKOVÁ, Alena. *Využití chemiluminiscence při studiu fotodynamické produkce reaktivních forem kyslíku*. Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Mgr. Martina Bancířová, Dr..
- [7] FREISLEBEN, Jaroslav. *Elektroluminiscenční dioda jako iniciátor reaktivních forem kyslíku*. Plzeň, 2015. Disertační práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnická. Vedoucí práce Doc. Ing. Aleš Hamáček, Ph.D.
- [8] ŠULCOVÁ, Kristýna. *Fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii nádorů*. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček.
- [9] ŽONDECKÁ, Terezie. *Fotodynamická léčba v oftalmologii*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Monika Synková.
- [10] ZIMČÍK, Petr a Miroslav MILETÍN. Photodynamic Therapy. In: LANG, Arnold R. (ed.). *Dyes and Pigments: New Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009, s. 1-62. ISBN 978-1-60692-027-5.
- [11] ŠTUKAVEC, Jan. *Preklinické stanovení účinnosti ftalocyaninu pro fotodynamickou terapii tumorů rekta*. Praha, 2009. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta. Vedoucí práce Doc. MUDr. Ladislav Horák, DrSc.
- [12] ZVOLÁNKOVÁ, Kateřina. *Nové ftalocyaninové fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček.
- [13] SVOBODA, Jan, Kamila SYSLOVÁ a Petr KAČER. Cílený transport platino-vých cytostatik. *Chemické listy*. 2016, **110**(12), 909-916.

- [14] STEKLÁ, Monika. *Fotosenzitizéry používané v klinické praxi*. Hradec Králové, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D.
- [15] VAN STRATEN, Demian, Vida MASHAYEKHI, Henriette S. DE BRUIJN, Sabrina OLIVEIRA a Dominic J. ROBINSON. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*. 2017, **9**(2). Dostupné z: doi:10.3390/cancers9020019
- [16] AGOSTINIS, Patrizia, Kristian BERG, Keith A. CENGEL, Thomas H. FOSTER, Albert W. GIROTTI, Sandra O. GOLLNICK, Stephen M. HAHN, Michael R. HAMBLIN, Asta JUZENIENE, David KESSEL, Mladen KORBELIK, Johan MOAN, Pawel MROZ, Dominika NOWIS, Jacques PIETTE, Brian C. WILSON a Jakub GOLAB. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2011, **61**(4), 250-281. Dostupné z: doi:10.3322/caac.20114
- [17] ŠLAMPA, Pavel, Ludmila HYNKOVÁ, Denis PRINC, Petr BURKOŇ a Hana DOLEŽALOVÁ. Radioterapie. *Masarykův onkologický ústav* [online]. [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/radioterapie-text-pro-studenty-lf/f1958>
- [18] ALLEN, Cynthia M., Wesley M. SHARMAN a Johan E. VAN LIER. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001, **5**(2), 161-169. Dostupné z: doi:10.1002/jpp.324
- [19] KACEROVSKÁ, Denisa. *Fotodynamická terapie a diagnostika v dermatologii*. Plzeň, 2007. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni. Vedoucí práce Prof. MUDr. Karel Pizinger, CSc., Prof. MUDr. Vladimír Resl, CSc.
- [20] JOSEFSEN, Leanne B. a Ross W. BOYLE. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs*. 2008, (4). Dostupné z: doi:10.1155/2008/276109
- [21] ALLISON, Ron R. a Claudio H. SIBATA. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010, **7**(2), 61-75. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001
- [22] ACKROYD, Roger, Clive KELTY, Nicola BROWN a Malcolm REED. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001, **74**(5), 656-669. Dostupné z: doi:10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2
- [23] ZUBER, Agnieszka A., Elizaveta KLANTSATAYA a Akash BACHHUKA. Biosensing. In: ANDREWS, David L., Robert H. LIPSON and Thomas NANN (ed.). *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*. Druhé vydání. Elsevier, 2019, s. 105-126. ISBN 978-0-12-812296-9.
- [24] KAŇA, Antonín a Oto MESTEK. Atomová absorpční spektrometrie. *VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [25] VOLKA, Karel, Marcela KADLECOVÁ a Kamil ZÁRUBA. *Příklady z analytické chemie pro bakaláře*. Praha: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-610-9.

- [26] GREMLICA, Miroslav. *Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace v materiálově orientovaných vědách*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Druhé doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [28] VINKLÁREK, Ivo S., Marek SCHOLZ, Roman DĚDIC a Jan HÁLA. Singlet oxygen feedback delayed fluorescence of protoporphyrin IX in organic solutions. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2017, **16**(4), 507-518. Dostupné z: doi:10.1039/c6pp00298f
- [29] LINKE, William F. *Solubilities, inorganic and metal-organic compounds*. Čtvrté vydání. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1965.
- [30] ZENG, Haishan, Mladen KORBELIK, David I. MCLEAN, Calum MACAULAY a Harvey LUI. Monitoring Photoproduct Formation and Photobleaching by Fluorescence Spectroscopy Has the Potential to Improve PDT Dosimetry with a Verteporfin-like Photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*. 2002, **75**(4), 398-405. Dostupné z: doi:10.1562/0031-8655(2002)075<0398:mpfapb>2.0.co;2
- [31] WILKINSON, Francis, W. Phillip HELMAN a Alberta B. ROSS. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1995, **24**(2), 663-1021. Dostupné z: doi:10.1063/1.555965
- [32] MOLNÁR, Alexander, Roman DĚDIC, Miloslav KOŘÍNEK, Antonín SVOBODA a Jan HÁLA. Protoporphyrin IX and hematoporphyrin derivatives interactions with oxygen studied by time and spectral resolved phosphorescence. *Journal of Molecular Structure*. 2005, (744-747), 723-726. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2004.10.087
- [33] DĚDIC, Roman, Vojtěch VYKLICKÝ, Antonín SVOBODA a Jan HÁLA. Phosphorescence of singlet oxygen and 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl4-pyridinio)porphine: Time and spectral-resolved study. *Journal of Molecular Structure*. 2009, (924-926), 153-156. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2008.10.010
- [34] FREI, Angelo. Molecular orbital scheme for triplet oxygen and the two forms of singlet oxygen. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. Wikimedia Foundation, 15. prosince 2013 [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/58/Molecular_orbital_scheme_for_the_three_forms_of_oxygen.png/1200px-Molecular_orbital_scheme_for_the_three_forms_of_oxygen.png
- [35] KIM, Y. C., E-S. LEE, P. S. CHUNG a C. K. RHEE. Recalcitrant palmoplantar pustular psoriasis successfully treated with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2005, **30**(6), 723-724. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01905.x
- [36] Autor neuveden. *Allegheny County Medical Society* [online]. [cit. 2020-11-23]. Dostupné z: <https://i2.wp.com/www.acms.org/wp-content/uploads/2019/07/AMD.png?resize=400%2C300&ssl=1>

[37] DĚDIC, Roman, Antonín SVOBODA a Jan HÁLA. *Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky II - náhradní úloha číslo 7: Měření emise fotogenerovaného singletního kyslíku*. KCHFO MFF UK.

Seznam obrázků

Obr. 1: Znázornění molekulových orbitalů kyslíku (upraveno z [34])	4
Obr. 2: Schematické znázornění mechanismu vzniku singletního kyslíku (upraveno z [4]).....	5
Obr. 3: Optické okno ve tkáních. Absorpční spektra důležitých chromoforů, v logaritmické škále (převzato z [3])	8
Obr. 4: Nádor před PDT a dva týdny po ní viděn pomocí oftalmoskopie (převzato z [4]).....	10
Obr. 5: Léčba lupénky pomocí PDT. Vlevo stav před zahájením léčby, vpravo stav po léčbě (převzato z [35])	11
Obr. 6: Suchá AMD (vlevo) a vlhká AMD (vpravo) (převzato z [36]).....	12
Obr. 7: Struktura porfyrinu (I), chlorinu (II) a bakteriochlorinu (III) (převzato z [8])	13
Obr. 8: Struktura ftalocyaninů, Me je centrálně vázaný kovový ion (převzato z [8])	14
Obr. 9: Absorpční spektrum a struktura verteporfinu (převzato z [4])	15
Obr. 10: Schéma uspořádání při přímém měření infračervené luminiscence (převzato z [37]).....	21
Obr. 11: Naměřené absorpční spektrum verteporfinu v roztoku o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$	22
Obr. 12: Závislost absorpce při vlnové délce 433 nm na koncentraci roztoku	23
Obr. 13: Naměřené fluorescenční spektrum verteporfinu v roztoku o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$	23
Obr. 14: Spektrálně a časově rozlišená luminiscence pro koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$...	24
Obr. 15: Kinetika $^1\text{O}_2$ na 1274 nm pro koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$	25
Obr. 16: Závislost doby života verteporfinu na době měření (zde pro příklad při koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a přímém zapojení)	26
Obr. 17: Závislost doby života singletního kyslíku na době měření (zde pro příklad při koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zapojení se světlovodem)	26
Obr. 18: Zjištěná závislost doby života singletního kyslíku na koncentraci roztoku pro obě detekční metody	27
Obr. 19: Převrácená závislost doby života $^1\text{O}_2$ na koncentraci pro obě detekční metody s lineárním fitem	27
Obr. 20: Zjištěná závislost doby života verteporfinu na koncentraci roztoku pro obě detekční metody	28
Obr. 21: Srovnání kinetiky infračervené luminiscence vzorku nasyceného kyslíkem a vzorku nasyceného vzduchem, přiblížené na čas do $20\mu\text{s}$	29