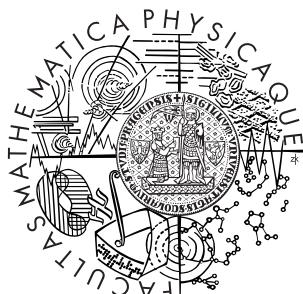


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Vojtěch Vyklický

### ***In situ* luminiscenční detekce singletního kyslíku**

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, biofyzika a chemická fyzika

2009

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl v první řadě poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Romanu Dědickovi, Ph.D. za cenné rady a čas, který mi věnoval. Dále patří můj dík prof. RNDr. Janu Hálovi, DrSc. za pomoc při řešení problémů spojených s prací na experimentální části diplomové práce. Mé poděkování rovněž patří pracovníkům Oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR za přípravu buněčných kultur a Mgr. Anně Fučíkové za pomoc při fluorescenčních měření na mikrospektroskopické aparatuře.

Tato práce byla podporována z prostředků výzkumného záměru MSM0021620835 „Fyzika molekulárních, makromolekulárních a biologických systémů“ Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 16. 4. 2009

Vojtěch Vyklický

# Obsah

<b>Seznam zkratek</b>	<b>6</b>
<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>1 Teorie</b>	<b>9</b>
1.1 Spektroskopické vlastnosti molekul . . . . .	9
1.1.1 Energetické stavy molekul a přechody mezi nimi . . . . .	9
1.1.2 Základní spektroskopické veličiny . . . . .	12
1.2 Singletní kyslík . . . . .	14
1.2.1 Tvorba singletního kyslíku . . . . .	16
1.2.2 Reakce a deaktivace singletního kyslíku . . . . .	17
1.2.3 Kinetika luminiscence singletního kyslíku . . . . .	18
1.3 Fotodynamická terapie . . . . .	19
1.3.1 Aplikace, transport a hromadění PS . . . . .	19
1.3.2 Excitace PS . . . . .	20
1.3.3 Působení PS . . . . .	21
1.3.4 Fotosenzibilizátor . . . . .	23
1.3.5 Výhody, vedlejší účinky a hranice použitelnosti PDT . . . . .	27
1.4 Detekce singletního kyslíku <i>in situ</i> . . . . .	28
1.4.1 Možnosti monitorování průběhu PDT . . . . .	28
1.4.2 Vývoj detekce singletního kyslíku v biologických studiích . . . . .	29
1.4.3 Technologie a možnosti zdokonalení detekce $^1\text{O}_2$ . . . . .	32
<b>2 Materiály a metody</b>	<b>34</b>
2.1 TMPyP v PBS . . . . .	34
2.2 TPP v prostředí fosfatidylcholinu . . . . .	34
2.3 PpIX v polymerních fóliích . . . . .	35
2.4 Tkáňové kultury . . . . .	36
<b>3 Experimentální část</b>	<b>38</b>
3.1 Úprava aparatury . . . . .	38
3.1.1 Staré uspořádání aparatury . . . . .	38
3.1.2 Světlovody . . . . .	39
3.1.3 Filtry . . . . .	41
3.1.4 Nové uspořádání aparatury . . . . .	44

3.2	TMPyP v PBS . . . . .	46
3.3	TPP v prostředí fosfatidylcholinu . . . . .	49
3.4	PpIX v polymerních fóliích . . . . .	51
3.5	Tkáňové kultury . . . . .	52
3.5.1	Fluorescenční měření . . . . .	52
3.5.2	Fosforecenční měření . . . . .	56
	<b>Závěr</b>	<b>62</b>
	<b>Literatura</b>	<b>64</b>

Název práce: *In situ* luminiscenční detekce singletního kyslíku

Autor: Bc. Vojtěch Vyklický

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

e-mail vedoucího: Roman.Dedic@mff.cuni.cz

**Abstrakt:** Tato práce shrnuje dosud publikované výsledky luminiscenční detekce singletního kyslíku v souvislosti s léčbou fotodynamickou terapií. Jsou zde prezentovány spektroskopické a fotosenzibilizační vlastnosti fotosenzibilizátoru TMPyP a jejich srovnání s dříve publikovanými vlastnostmi TPPS<sub>4</sub>. Rovněž je studován vliv fosfatidylcholinu na fotosenzibilizační vlastnosti TPP a dobu života jím generovaného singletního kyslíku. Dále se práce věnuje úpravě a optimalizaci aparatury pro sběr luminiscence singletního kyslíku z povrchu pevných vzorků s časovým i spektrálním rozlišením pomocí světlovodu s luminiscenční sondou. Její funkčnost byla testována na vyrobených polymerních matricích z PMMA a polystyrenu obsahujících protoporfyrin IX. V závěru jsou prezentovány kinetiky fosforecence singletního kyslíku měřené z povrchu tenké vrstvy 3T3 myších fibroblastů obsahujících TPPS<sub>4</sub> resp. TMPyP, čímž byla ověřena možnost luminiscenční detekce singletního kyslíku touto upravenou aparaturou *in situ*.

**Klíčová slova:** Singletní kyslík, fotosenzibilizátor, fosforecence, časové a spektrální rozlišení, fotodynamická terapie

Title: *In situ* Luminescence Detection of Singlet Oxygen

Author: Bc. Vojtěch Vyklický

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: Roman.Dedic@mff.cuni.cz

**Abstract:** The thesis summarises already published results of singlet oxygen luminescence detection in relation to photodynamic therapy treatment. The spectroscopic and photosensitising properties of the photosensitizer TMPyP and their comparison with already published properties of TPPS<sub>4</sub> are presented. Also the influence of phosphatidylcholine on photosensitising properties of TPP and singlet oxygen lifetime was investigated. The thesis is mainly focused on adaptation and optimisation of experimental setup for singlet oxygen luminescence detection from the surface of solid samples with time and spectral resolution using optical fibres with luminescence probe. The usability was tested on polymer matrix (PMMA or polystyrene) containing protoporphyrine IX. Finally, the kinetics of singlet oxygen phosphorescence measured from surface of thin layer of 3T3 murine fibroblasts containing TPPS<sub>4</sub> or TMPyP are presented. Thereby the feasibility of singlet oxygen detection *in situ* was demonstrated using this setup.

**Keywords:** Singlet oxygen, photosensitizer, phosphorescence, time and spectral resolution, photodynamic therapy

# Seznam zkratek

ALA	5-aminolevulová kyselina
AlS <sub>4</sub> Pc	tetrasulfonovaný ftalocyanin s centrálním atomem hliníku
BSA	hovězí sérový albumin
Cl-e6	chlorin e6
CT komplex	komplex s přenosem náboje
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
HpD	deriváty hematoporfyrinu
MCP	mikrokanálový detektor
mTHCP	meta-tetra(hydroxyfenyl)chlorin
NIR	blízké infračervené záření
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletní kyslík
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	tripletní kyslík
PBS	fosfátový pufr
PC	L- $\alpha$ -fosfatidylcholin
PDT	fotodynamická terapie
PMMA	polymethylmetakrylát
pO <sub>2</sub>	parciální tlak kyslíku
PpIX	protoporfyrin IX
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOL	luminiscence singletního kyslíku
THF	tetrahydrofuran
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porfyrin
TPP	meso-tetrafenylporfyrin
TPPS <sub>4</sub>	meso-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrin
UV	ultrafialové záření

# Úvod

Jedněmi z nejzávažnějších chorob, způsobujících předčasné úmrtí lidí na celém světě, jsou nejrůznější druhy nádorových onemocnění. Jinak tomu není ani v Evropě. Jednomu ze tří Evropanů je během života diagnostikována rakovina a jedno ze čtyř úmrtí v Evropě je způsobeno rakovinou [54]. Nádorová onemocnění jsou způsobena mutacemi DNA, které vedou k nekontrolovanému buněčnému dělení. Příčin jejich vzniku je celá řada. V některých případech jsou příčiny známé a dá se jim předcházet preventí nebo dokonce očkováním. Jindy je přesná příčina nejasná a vznik onemocnění je připisován obecným faktorům, jako je životní styl nebo špatné životní prostředí. V některých případech je znám vliv dědičné dispozice nebo se vzhledem k výskytu onemocnění v rodině očekává. Pokud onemocnění již propukne, je pro pacienta jedinou možností uzdravení včasná diagnóza s následnou léčbou. Přes výrazné pokroky v úspěšnosti léčby nádorových onemocnění v posledních desetiletích je stále většina dosud užívaných léčebných metod doprovázena řadou vedlejších účinků a nízkou selektivitou svého působení. Proto je cílem mnoha vědeckých pracovišť po celém světě rozšířit možnosti léčby těchto onemocnění, zvýšit jejich účinnost a minimalizovat vedlejší účinky.

Jednou z poměrně nových metod léčby onkologických onemocnění, ale i řady dalších chorob, je fotodynamická terapie. Tato metoda léčby je založena na aplikaci léčebné látky (tzv. fotosenzibilizátoru) do těla pacienta, kde je přednostně akumulována v patologické tkáni, a při expozici světu o vhodné vlnové délce dochází k její excitaci do vyšších energetických stavů, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní formy kyslíku, mezi které patří i singletní kyslík. Ten hraje klíčovou roli v destrukci postižené tkáně. Přestože i tato metoda léčby má svá omezení, její výraznou předností jsou nízké vedlejší účinky a vysoká selektivita působení.

Doposud bohužel nejsou známy přesné mechanizmy fotodynamické terapie, a proto jsou ve středu zájmu mnoha vědeckých laboratoří. Jednou z možností, jak studovat tyto mechanizmy, je studium luminiscence fotosenzibilizátoru a jím generovaného singletního kyslíku doprovázející jejich přechod do základního stavu. Skutečnost, že luminiscence singletního kyslíku je velmi slabá a nachází se v blízké infračervené oblasti, klade vysoké nároky na detekční techniku. Na Katedře chemické fyziky a optiky se nachází v tomto směru unikátní aparatura, která je schopná detektovat luminiscenci fotosenzibilizátorů a singletního kyslíku s časovým i spektrálním rozlišením. To představuje vhodný nástroj pro detailní studium nejen procesů přenosu excitační energie mezi molekulami fotosenzibilizátorů a kyslíkem, ale i interakcí těchto molekul s okolím. Doposud byla možná pouze měření ze vzorků ve standardních spektroskopických kyvetách, což do značné

míry omezovalo charakter studovaných vzorků. Studium takových modelových systémů v roztočích je důležité, přesto pro detailnější pochopení role singletního kyslíku při fotodynamické terapii je nutné studovat jeho chování v přirozených prostředích, v kterých terapie přímo probíhá, *in situ*. Takovými systémy mohou být buněčné kultury *in vitro*, pokusná zvířata nebo přímo lidé *in vivo*. Prozkoumání těchto procesů je klíčové pro dokonalé pochopení mechanizmu fotodynamické terapie.

Hlavním cílem této diplomové práce proto bylo rozšířit možnosti stávající aparatury na detekci singletního kyslíku i z pevných vzorků a ověřit její použitelnost pro měření *in situ*, přímo v místě probíhající fotodynamické terapie.

Cíle této diplomové práce byly:

1. Sepsat rešerši dosud publikovaných výsledků luminiscenční detekce singletního kyslíku v biologických systémech.
2. Seznámit se s prací na dosud vybudované aparatuře pro detekci singletního kyslíku.
3. Upravit tuto aparaturu pro luminiscenční detekci singletního kyslíku pro měření z pevných vzorků pomocí optických vláken s luminiscenční sondou.
4. Provést testovací měření a ověřit použitelnost aparatury pro měření z povrchu biologických vzorků.

# Kapitola 1

## Teorie

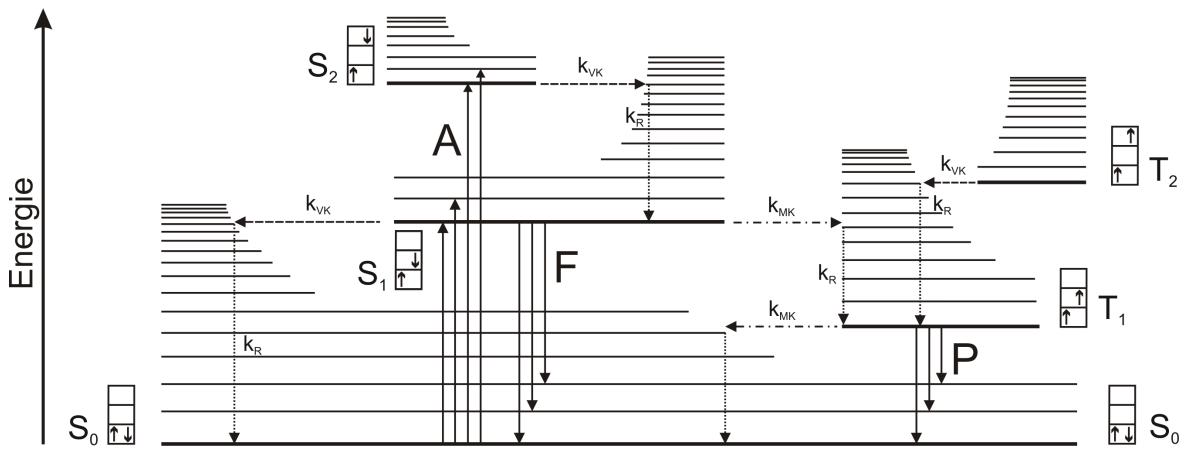
### 1.1 Spektroskopické vlastnosti molekul

#### 1.1.1 Energetické stavy molekul a přechody mezi nimi

Z kvantové teorie je známo, že každá molekula se může nacházet pouze v diskrétních energetických stavech. Schématické znázornění těchto energetických hladin a přechodů mezi nimi se nejčastěji uvádí ve formě Jablonského diagramu, pojmenovaném po polském fyzikovi Aleksanderu Jabłońském. Na obrázku 1.1 je vidět Jablonského diagram pro obecnou mnohaatomovou molekulu se sudým počtem elektronů.

Jako tučné horizontální čáry jsou na obrázku znázorněny jednotlivé čistě elektronové hladiny, které odpovídají energii elektronové a součtu energií nulových vibrací. Tenké horizontální čáry potom značí příslušné vyšší elektronově-vibrační hladiny (energie jednotlivých hladin se směrem nahoru zvyšují). Každá skupina elektronově-vibračních hladin se může nacházet ve dvou různých stavech, které se od sebe liší velikostí jejich spinu. V tzv. singletním stavu  $S$  je celkový spin roven nule. Naopak v tzv. tripletních stavech  $T$  je celková velikost spinu rovna jedné. U všech singletních a tripletních stavů je vedle nich na obrázku znázorněna i elektronová konfigurace molekulového orbitalu, která vystihuje obsazení a spiny dvou elektronů s nejvyšší energií v molekule. Právě tyto dva elektrony jsou jako jediné zodpovědné za celkový spin molekuly, jelikož ostatní elektrony zůstávají spárovány a k celkovému spinu tudíž nepřispívají. Většina látek je ve svém základním stavu singletní ( $S_0$ ). Existují však i látky, které jsou ve svém základním stavu tripletní. Asi nejznámějším zástupcem takových látek je molekula kyslíku  $O_2$  (více viz kapitola 1.2).

Pokud molekula v základním stavu  $S_0$  absorbuje foton o vhodné vlnové délce, přechází do některé z vibračních hladin excitovaného singletního stavu  $S_1, \dots, S_n$ . Tento jev nazýváme singlet-singletní absorpcí (zkráceně často jen absorpcí). Pokud se molekula nachází na své nejnižší tripletní hladině  $T_1$  a absorbuje foton, dostává se tak do vibračních hladin vyšších tripletních hladin  $T_2, \dots, T_n$ . Tomuto jevu pak říkáme triplet-tripletní absorpcí. U obou těchto přechodů nedochází ke změně spinu, tudíž jsou spinově dovolené. Na obrázku je vyznačena pouze singlet-singletní absorpcí jako plná svislá šipka A.



Obrázek 1.1: Jablonského diagram. A – absorpcie, F – fluorescence, P – fosorescence,  $k_{VK}$  – vnitřní konverze,  $k_{MK}$  – mezisystémová konverze,  $k_R$  – vibrační relaxace,  $S_0, \dots, S_2$  – singletní stav,  $T_1$  a  $T_2$  – tripletní stav

Z excitovaných stavů do základního rovnovážného stavu se může molekula dostat několika různými přechody. Ty můžeme rozdělit na přechody zářivé a nezářivé. Zářivé přechody jsou doprovázené uvolněním energie emisí fotonu a obecně je nazýváme termínem *luminiscence*. V případě nezářivých přechodů je pak přebytek energie přenášen na okolní molekuly anebo při nich nedochází ke změně energie molekuly. Jakou z možných cest (popř. jejich kombinací) se molekula vrátí do základního stavu, závisí na rychlostních konstantách jednotlivých přechodů [53].

## Zářivé přechody

**Fluorescence** je spinově dovolený zářivý přechod z energeticky vyššího do nižšího stavu o shodné multiplicitě. Nejčastěji k ní dochází z nejnižší vibrační hladiny  $S_1$  do některé z vibračních hladin  $S_0$ . Pokud látku vyexcitujeme do vyšších singletních hladin než  $S_1$ , potom nejdříve přejde nezářivým přechodem do  $S_1$  s nejnižší vibrací. Tento jev se nazývá Kashovo pravidlo. Existují i výjimky, kdy k fluorescence nedochází z nejnižší vibrační hladiny  $S_1$ , ale ty nejsou příliš časté. Na obrázku je fluorescence znázorněna jako svislá plná šipka F.

**Fosorescence** je zářivý přechod z energeticky vyššího do nižšího stavu o rozdílné multiplicitě. Nejčastěji se jedná o přechod z nejnižší tripletní hladiny  $T_1$  do základního singletního stavu  $S_0$ . Vzhledem k tomu, že je tento proces spinově zakázaný, setrvává molekula na hladině  $T_1$  mnohanásobně déle, než tomu bylo v případě hladiny  $S_1$ . Na obrázku je fosorescence znázorněna jako svislá plná šipka P.

**Zpožděná fluorescence** je stejně jako fluorescence spinově dovolený přechod z  $S_1$  do vibračních hladin  $S_0$  (tudíž jsou i jejich emisní spektra stejná), rozdíl je však v tom, že molekula se nejdříve dostane mezisystémovou konverzí do  $T_1$  a až poté se vrací zpět do  $S_1$ , odkud zářivě přejde do vibračních hladin  $S_0$ . Doba tohoto přechodu je převážně dána časem, po který molekula setrvá na hladině  $T_1$ .

## Nezářivé přechody

**Vnitřní konverze** je nezářivý izoenergetický přechod mezi hladinami o shodné multiplicitě, jedná se tedy o spinově dovolený přechod. Na obrázku je znázorněn jako vodorovná čárkovaná šipka.

**Mezisystémová konverze** je nezářivý izoenergetický přechod mezi hladinami o rozdílné multiplicitě. Přestože je z hlediska změny spinu zakázaným přechodem, dochází k němu poměrně často vlivem spin-orbitální interakce. Na obrázku je znázorněn jako vodorovná čerchovaná šipka.

**Vibrační relaxace** je proces, při kterém dochází k disipaci vibrační energie na okolní prostředí. Zvláště pak v případě, kdy okolní prostředí je v kondenzované fázi, tento druh nezářivého přechodu dominuje. To je i důvod, proč k izoenergetickým konverzím dochází ze základních vibračních stavů. Na obrázku je znázorněn jako svislá tečkovaná šipka.

Dosud jsme předpokládali, že k excitaci molekuly do vyšších excitovaných hladin dochází absorpcí jediného elektromagnetického kvanta záření a deaktivacích procesů se přímo žádné další molekuly neúčastní (vyjma vibrační relaxace). V případě, že se excitacích a deaktivacích procesů účastní i další molekuly, rozšiřuje se tím i spektrum jejich mechanizmů.

K excitaci nebo deaktivaci molekuly může dojít přenosem energie mezi dvěma molekulami, kdy molekula v excitovaném stavu (donor) předává svoji energii jiné molekule ve stavu základním (akceptor) bez výměny fotonu. Mezi takové mechanizmy přenosu energie můžeme zařadit Försterův rezonanční přenos energie (FRET), Dexterův mechanismus, singlet-singletní nebo triplet-tripletní anihilaci. Ty zároveň můžeme zařadit do obecnější skupiny procesů zvaných zhášení. Takové procesy mohou probíhat různými mechanizmy, ale všechny mají společné to, že při nich dochází k přechodu excitované molekuly zpět do základního stavu bez vyzáření fotonu vlivem interakce s molekulou zhášedla.

Kromě dosud uvedených způsobů excitace existuje i celá řada dalších. Jednou z nich je např. vícefotonová absorpce, kdy dochází k současné absorpci dvou (popř. i více) světelných kvant najednou, jejichž součtová energie je shodná s energetickou bariérou přechodu. V souvislosti s různými druhy excitace pak v případě excitace ultrafialovým nebo viditelným světlem přesněji hovoříme o fotoluminiscenci [24].

Luminiscenci většina mnohaatomových molekul nevykazuje. Nejčastěji ji můžeme pozorovat u molekul s konjugovaným systémem vazeb. Právě mezi takové molekuly patří i různé deriváty porfyrinů o kterých je více pojednáno v kapitole 1.3.4.

### 1.1.2 Základní spektroskopické veličiny

Mezi základní spektrální charakteristiky záření můžeme zařadit jeho vlnovou délku  $\lambda$  a frekvenci  $\nu$ , mezi kterými platí vztah

$$\lambda = \frac{|\vec{v}|}{\nu}, \quad (1.1)$$

kde  $\vec{v}$  je fázová rychlosť vlnění. Frekvence záření je úzce spjata s energií fotonu  $E$  vztahem

$$E = h\nu, \quad (1.2)$$

kde  $h$  označuje Planckovu konstantu. Pro popis množství dopadajícího záření se nejčastěji používá intenzita záření  $I$  definovaná jako

$$I = \frac{dW}{dS_N dt}, \quad (1.3)$$

kde  $W$  je energie přenášená optickým zářením a  $S_N$  je normálová plocha ke směru jeho šíření. V některých případech je výhodnější pro charakterizaci záření použít množství dopadajících fotonů místo jeho energie  $W$ . V takovém případě zavádíme veličinu fotonový tok  $J$  definovaný jako

$$J = \frac{dN_\nu}{dS_N dt}, \quad (1.4)$$

kde  $N_\nu$  je počet dopadajících fotonů o frekvenci  $\nu$ .

Pokud necháme záření procházet absorbujícím prostředím, začne docházet k postupnému snižování jeho intenzity. Velikost takového útlumu monochromatického vlnění o frekvenci  $\nu$  lze charakterizovat pomocí veličiny absorbance (optické hustoty)  $A$  jako

$$A(\nu) = \log \left( \frac{I_\nu^0}{I_\nu} \right), \quad (1.5)$$

kde  $I_\nu^0$  je počáteční intenzita a  $I_\nu$  intenzita po průchodu absorbujícím prostředím. Ve většině optických prostředí dochází při nízkých intenzitách záření k exponenciálnímu poklesu intenzity s dráhou, kterou záření v prostředí urazí a platí

$$I_\nu = I_0 \exp(-B_{12}(\nu)c\nu n\Theta(T)x) \sim I_0 10^{-\epsilon(\nu)cx}, \quad (1.6)$$

kde  $B_{12}$  je Einsteinův koeficient stimulované emise,  $c$  molární koncentrace,  $n$  index lomu,  $\Theta$  je faktor vyjadřující rozdíl pravděpodobností v obsazení stavu 1 a 2,  $T$  termodynamická teplota,  $x$  je dráha a  $\epsilon$  extinkční koeficient. Rovnice 1.6 ve stejném tvaru platí rovněž pro počet fotonů

$$N_\nu = N_0 \exp(-B_{12}(\nu)c\nu n\Theta(T)x) \sim N_0 10^{-\epsilon(\nu)cx}, \quad (1.7)$$

a vyjadřuje vlastně Lambert-Beerův zákon:

$$A(\nu) = \epsilon(\nu)xc. \quad (1.8)$$

Pokud dochází k přechodu mezi dvěma hladinami o rozdílné energii doprovázenému emisí fotonu, je vlnová délka tohoto fotonu dána rozdílem energií hladin, mezi kterými k zářivému přechodu dochází. Využitím rovnice 1.2 můžeme vyjádřit vlnovou délku vyzářeného fotonu jako

$$\lambda = \frac{c\nu}{E_2 - E_1}, \quad (1.9)$$

kde  $c$  je rychlosť světla ve vakuu,  $E_2$  je energie výchozího a  $E_1$  konečného stavu. Průměrný čas strávený molekulou v excitovaném stavu před návratem do stavu základního, je dána dobou života excitovaného stavu  $\tau$ . Počet molekul v excitovaném stavu můžeme popsat rovnicí

$$n(t) = n_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1.10)$$

kde  $n(t)$  vyjadřuje počet molekul v excitovaném stavu v čase  $t$ , kterých bylo v čase  $t = 0$   $n_0$ . Doba života je převrácenou hodnotou rychlostní konstanty  $k$  popisující rychlosť přechodu mezi excitovaným a základním stavem:

$$\tau = \frac{1}{k}. \quad (1.11)$$

Pokud molekuly přecházejí ze svého excitovaného do základního stavu pouze zářivými přechody, potom je rychlostní konstanta  $k$  rovna Einsteinovu koeficientu spontánní emise  $S$  a jí odpovídající doba života  $\tau_0$  se nazývá vnitřní dobou života

$$\tau_0 = \frac{1}{S}. \quad (1.12)$$

Pokud ale dochází k přechodu do základního stavu i jinými než zářivými přechody, doba života se příslušně zkrátí na

$$\tau = \frac{1}{S + C}, \quad (1.13)$$

kde  $C$  reprezentuje součet všech ostatních rychlostních konstant deaktivacích procesů, které se účastní přechodu molekuly z excitovaného do základního stavu.

Kvantový výtěžek  $\phi$  je jednou ze základních veličin popisujících vlastnosti luminiscence. Pro případ stacionární luminiscence je definován jako

$$\phi = \frac{N_e}{N_a}, \quad (1.14)$$

kde  $N_e$  je počet emitovaných a  $N_a$  počet absorbovaných fotonů za jednotku času. V obecném případě, kdy se systém nenachází v ustáleném stavu a luminiscence je tedy nestacionární, je nutné definici kvantového výtěžku upravit do obecnějšího tvaru

$$\phi = \frac{\int_0^\infty N_e dt}{\int_0^{t_1} N_a dt}, \quad (1.15)$$

kde k excitaci dochází v časovém intervalu 0 až  $t_1$ . Kvantový výtěžek je možné definovat i nepřímo, a to pomocí doby života excitovaného stavu

$$\phi = \frac{\tau}{\tau_0}, \quad (1.16)$$

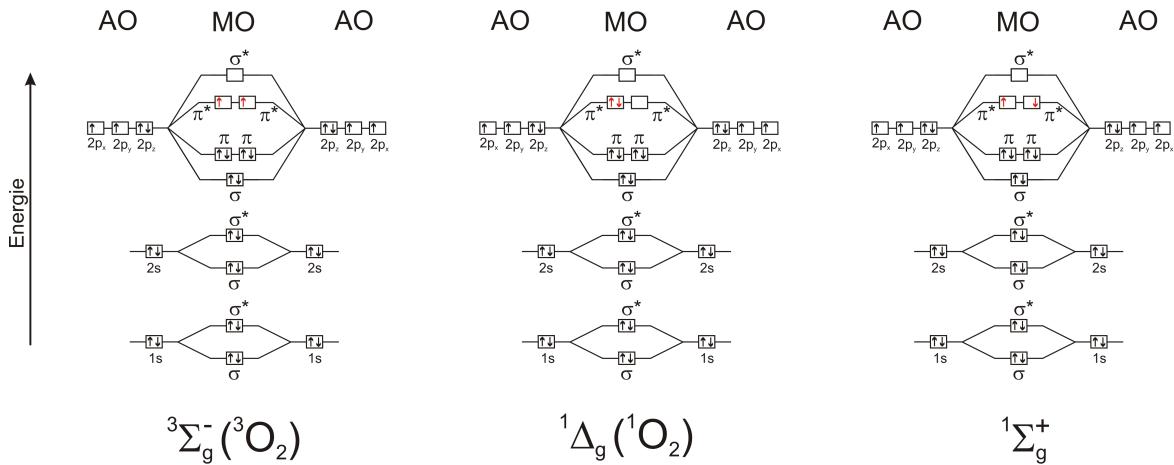
kde  $\tau_0$  je vnitřní doba života excitovaného stavu bez přítomnosti neradiačních zhášecích mechanizmů, kterou lze dopočítat.

## 1.2 Singletní kyslík

Kyslík je jedním z nejrozšířenějších prvků na Zemi. Je důležitou součástí zemské atmosféry, kde se nejčastěji vyskytuje volně ve formě dvouatomových ( $O_2$ ) a tříatomových ( $O_3$  – ozón) molekul. Molekuly ozónu hrají ve vrchních vrstvách atmosféry nezastupitelnou roli při stínění škodlivého ultrafialového záření. Kyslík je tak po dusíku druhým nejhojněji zastoupeným prvkem atmosféry a zaujímá zde 21 % jejího objemu. Dále je výrazně zastoupen v hydrosféře (kyslík tvoří 90 hmotnostních procent vody) i litosféře. V neposlední řadě je důležitým biogenním prvkem, který je nezbytný pro existenci života na naší planetě.

Kyslík nezávisle na sobě objevili švédský lékárník Carl Wilhelm Scheele roku 1771 a Joseph Priestley v roce 1774. Přestože Joseph Priestley byl až druhým objevitelem, často je prvenství přisuzováno právě jemu, jelikož jeho práce byla publikována dříve. Roku 1848 pak Michael Faraday při pokusech s bublinami plněnými plyny zjistil, že kyslík je na rozdíl od jiných plynů přitahován magnetem. Tento paramagnetismus vysvětlil až Robert Mulliken v roce 1925 přítomností dvou nespárovaných elektronů v základním stavu molekuly. Tím je dáno, že základní stav molekuly kyslíku je na rozdíl od většiny ostatních molekul tripletní. Nad tímto základním tripletním stavem se spektroskopickým označením  $^3\Sigma_g^-$  se nacházejí dva nejnižší excitované stavy označované  $^1\Delta_g$  a  $^1\Sigma_g^+$ , které jsou naopak singletní. Na obrázku 1.2 je vidět elektronová konfigurace atomových orbitalů samostatných atomů kyslíku a molekulových orbitalů dvouatomové molekuly kyslíku pro případ všech těchto tří stavů. Jednotlivé stavy se od sebe liší pouze v obsazení nejvyšších antivazebních  $\pi$ -orbitalů elektronů. Při přechodu z těchto excitovaných singletních hladin do základního tripletního stavu můžeme pozorovat fosorescenci na 761 nm ( $^1\Sigma_g^+$ ) a 1270 nm ( $^1\Delta_g$ ). Tomu náleží energie přechodu 157 a 94 kJ mol $^{-1}$ . Jelikož zářivý přechod ze stavu  $^1\Sigma_g^+$  do  $^3\Sigma_g^-$  je spinově zakázaný, dochází mnohem častěji k spinově dovolenému nezářivému přechodu z  $^1\Sigma_g^+$  do  $^1\Delta_g$  a až po nějaké době, která je závislá na teplotě a okolním prostředí, dochází k zářivému přechodu z  $^1\Delta_g$  do  $^3\Sigma_g^-$ . To je důvodem, proč je fosorescence singletního kyslíku ze stavu  $^1\Sigma_g^+$  o taklik slabší než ze stavu  $^1\Delta_g$  a pokud se mluví o singletním kyslíku, má se nejčastěji na mysli stav  $^1\Delta_g$ . Tento stav označujeme obecně  $^1O_2$  a základní tripletní stav označujeme jako  $^3O_2$ .

Doba života stavu  $^1\Delta_g$  je silně závislá na okolním prostředí. V plynném skupenství bez možnosti interakce s dalšími molekulami je asi 72 minut. V rozpouštědlech je tato doba výrazně kratší. Např. v  $CCl_4$  je to 59 ms a ve vodě dokonce jen  $\sim 3,5 \mu s$ , kde je takto krátká doba života způsobena zhášením  $^1O_2$  vibracemi O–H skupin. V případě



Obrázek 1.2: Obsazení orbitalů molekuly kyslíku elektrony v základním tripletním  $^3\Sigma_g^-$  a dvou nejnižších singletních stavech  $^1\Delta_g$  a  $^1\Sigma_g^+$ . AO značí atomové orbitaly a MO značí orbitaly molekulové. Červeně jsou vyznačeny elektrony, které jsou zodpovědné za celkový spin molekuly.

izotopické záměny vodíku za deuterium se doba života prodlouží na 68  $\mu$ s v  $D_2O$  [57]. Doba života  $^1O_2$  v biologických prostředích se dá očekávat kratší, než je ve vodě. Tento předpoklad vychází z toho, že dominantní je zde voda, ale navíc se v takovém prostředí vyskytuje množství biomolekul, které mohou způsobovat zhášení  $^1O_2$ . Přesná hodnota doby života  $^1O_2$  *in vivo* není dosud stanovena, protože je závislá na mnoha faktorech. O dobách života v biologických systémech je více pojednáno v kapitole 1.4.2.

Singletní kyslík je silně reaktivní (asi  $1000 \times$  než kyslík v základním stavu) a patří proto mezi reaktivní formy kyslíku (tzv. Reactive oxygen species, ROS). Do ROS se řadí společně s dalšími formami kyslíku, jako je kyslíkový radikál  $O^\bullet$ , který se často vyskytuje společně s vodíkem v hydroxylovém radikálu  $HO^\bullet$ , nebo superoxidový aniont  $O_2^\bullet-$ , který se od základního stavu  $^3\Sigma_g^-$  liší pouze v dalším elektronu v nevazebném molekulovém  $\pi$ -orbitalu. Mezi neradikálové ROS dále patří excitovaný karbonyl  $C=O^\ast$  a peroxid vodíku  $H_2O_2$ . Všechny tyto látky jsou schopné oxidovat biomolekuly a vést k buněčné smrti.

Singletní kyslík má však v buňce své významné místo hlavně jakožto signální molekula v různorodých buněčných procesech [27]. Mimo živé organizmy je singletní kyslík často odpovědný za fotodegradaci materiálů, jako jsou různé druhy polymerů [74], způsobuje blednutí barev nebo má v potravinářském průmyslu nežádoucí vliv na trvanlivost potravin.

### 1.2.1 Tvorba singletního kyslíku

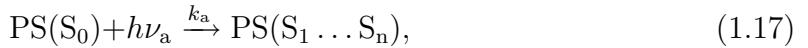
Je známo několik možných způsobů generace singletního kyslíku. Ty můžeme rozdělit na metody chemické a fyzikální.

Mezi chemické metody patří produkce  $^1\text{O}_2$  termální dekompozicí endoperoxidů. Rovněž některé enzymy jsou schopné produkovat ROS včetně singletního kyslíku. Mezi takové enzymy patří např. NADPH-oxidáza, myeloperoxidáza nebo NO-syntáza.

Mezi fyzikální metody patří přímá absorpcie, která je ale možná pouze za určitých specifických podmínek, jinak je tento přechod spinově zakázaný. Dále vznik  $^1\text{O}_2$  pomocí pulzní radiolýzy, mikrovln nebo absorpcí komplexu s přenosem náboje, který vytvořil kyslík s organickou molekulou [64].

V současnosti je asi nejvyužívanější metoda generace  $^1\text{O}_2$  pomocí fotosenzibilizace, při které se využívá tzv. fotosenzibilizátoru (PS). PS je molekula která, pokud absorbuje světlo, může svoji energii přenést na molekulu kyslíku v základním stavu a tím generovat singletní kyslík.

Při absorpci záření se PS dostává ze svého základního singletního stavu  $\text{S}_0$  do vyšších excitovaných singletních hladin  $\text{S}_1 \dots \text{S}_n$



kde  $\nu_a$  je vlnová délka absorbovaného záření a  $k_a$  rychlostní konstanta tohoto přechodu.

Z vyšších excitovaných singletních hladin  $\text{S}_2 \dots \text{S}_n$  relaxuje PS obvykle na nejnižší položenou excitovanou singletní hladinu  $\text{S}_1$ . Z té se může vrátit zpět do svého základního singletního stavu  $\text{S}_0$ , a to buď zářivě (fluorescencí)



kde  $k_f$  je rychlostní konstanta fluorescence a  $\nu_f$  je vlnová délka fotonu vyzářeného fluorescencí, nebo nezářivě (vnitřní konverzí a vibrační relaxací)



kde  $k_{VK}$  je rychlostní konstanta vnitřní konverze a  $k_V$  je rychlostní konstanta vibrační relaxace. Poslední možností, jak může PS opustit hladinu  $\text{S}_1$  bez interakce s dalšími molekulami, je přejít mezisystémovou konverzí do tripletních hladin a dále na hladinu  $\text{T}_1$



kde  $k_{MK}$  je rychlostní konstanta mezisystémové konverze.

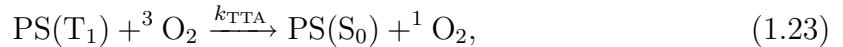
Molekula PS ve stavu  $\text{T}_1$  má opět několik možností, jak přejít do svého základního stavu  $\text{S}_0$ . Podobně jako tomu bylo v případě  $\text{S}_1$ , může dojít k zářivému přechodu (fosforescenci)



kde  $k_p$  je rychlostní konstanta fosforescence a  $\nu_p$  vlnová délka fotonu vyzářeného tímto procesem, nebo k nezářivému přechodu (mezisystémovou konverzí a vibrační relaxací)



Pokud se PS ve stavu  $T_1$  dostane do blízkosti molekuly kyslíku v tripletním stavu  $^3O_2$ , může dojít k triplet-tripletní anihilaci [22]



kde  $k_{TTA}$  je rychlostní konstanta této interakce. Při ní tripletní molekula kyslíku  $^3O_2$  přechází do svého excitovaného singleního stavu, čímž vzniká singletní kyslík  $^1O_2$ . Naopak molekula PS, která byla původně v excitovaném tripléním stavu  $T_1$ , přechází nezářivě zpět do svého základního singleního stavu  $S_1$

V případě, že se PS ve stavu  $T_1$  setká s molekulou Z podle rovnice 1.24, může dojít k tzv. nefotochemickému zhášení, čímž dojde k převedení molekuly PS zpět do základního stavu, přičemž sama molekula Z zůstává nezměněna



Jiný případ je vyjádřen rovnicí 1.25, kdy molekula M reaguje s PS ve stavu  $T_1$ , čímž vzniká nějaký produkt této reakce



Takové reakci se pak říká fotochemické zhášení. K podobné reakci může dojít i s  $^3O_2$ , kdy nedojede k výše zmíněné triplet-tripletní anihilaci, ale výsledkem interakce je produkt nebo se jen obě molekuly vrátí zpět do základních stavů.

Čím delší bude doba života tripletního stavu PS, tím větší bude pravděpodobnost interakce PS a  $^3O_2$ , tedy i pravděpodobnost vzniku  $^1O_2$ . Konečný kvantový výtěžek  $^1O_2$ , stejně jako poměr jednotlivých deaktivacích procesů excitovaných stavů je dán rychlostními konstantami jednotlivých procesů. Molekula běžného PS dokáže vyprodukovat  $10^2 - 10^5$  molekul  $^1O_2$ , než dojde k její trvalé degradaci [13].

Hlavními přednostmi této metody je hlavně její jednoduchost a vysoký kvantový výtěžek  $^1O_2$ , cehož se hojně využívá při praktických aplikacích.

### 1.2.2 Reakce a deaktivace singletního kyslíku

Molekula singleního kyslíku má podobné spektrum možností, jak se vrátit zpět do svého základního stavu, jako molekula PS v tripletním stavu. Jednou z možností je, že se sama vrátí do základního stavu vibrační relaxací



nebo zářivou fosforescencí



Další možností je pak zhášení  $^1O_2$  nějakou další molekulou. V takovém případě nevzniká žádný produkt, není vyzářen foton a kyslík ani molekula zhášedla se nijak chemicky nezmění 1.28.



Tento druh fyzikálního zhášení lze dále dělit na zhášení pomocí přenosu energie nebo pomocí přenosu náboje. V případě přenosu energie přechází energie ze  ${}^1\text{O}_2$  na molekulu zhášedla Z a ta ji dále může vyzářit nebo přejít zpět do základního stavu jinými nezářivými procesy. Při přenosu náboje dochází k přenosu elektronu z molekuly zhášedla Z na elektronově deficentní  ${}^1\text{O}_2$ . Tím se vytvoří komplex s přenosem náboje (CT komplex), v kterém již neplatí tak přísný zákaz přechodu mezi hladinami o rozdílné multiplicitě, jako v případě samotného  ${}^1\text{O}_2$ . Nakonec se komplex rozpadne na původní molekulu zhášedla a molekulu kyslíku v základním stavu.

Při chemickém zhášení dochází k chemické reakci  ${}^1\text{O}_2$  s molekulou zhášedla M za vzniku produktu



Mezi nejčastější reakce  ${}^1\text{O}_2$  patří reakce s některými dvojitými uhlík-uhlíkovými vazbami C=C. K nejdůležitější reakcím tohoto typu patří tzv. enová reakce: 1,4-cykloadice a 1,2-cykloadice. Do této kategorie tudíž spadá i reakce  ${}^1\text{O}_2$  s mnohými důležitými biomolekulami, o kterých je více pojednáno v kapitole 1.3.3.

### 1.2.3 Kinetika luminiscence singletního kyslíku

Intenzita luminiscence singletního kyslíku je přímo úměrná množství molekul kyslíku ve stavu  ${}^1\Delta_g$ . Množství molekul kyslíku v tomto stavu je dáno populací této hladiny přenosem energie z fotosenzibilizátoru v tripletním stavu a depopulací hladiny zářivými a nezářivými procesy. Jestliže budeme předpokládat, že tripletní hladina PS se vyprazdňuje zářivou fosforencí, nezářivou vibrační relaxací a přenosem energie na kyslík, můžeme časový vývoj koncentrace tripletů PS popsat jednoexponenciálním poklesem s dobou života  $\tau_T$  danou rychlostními konstantami těchto procesů. Pokud budeme dále předpokládat, že hladina  ${}^1\Delta_g$  se vyprazdňuje pouze fosforencí a vibrační relaxací, bude časový vývoj koncentrace singletního kyslíku dán opět jednoexponenciálním poklesem s dobou života  $\tau_\Delta$ . Vzhledem k tomu, že singletní kyslík je populován pouze přenosem energie z tripletu PS, musí být celková kinetika fosforence  ${}^1\text{O}_2$  popsána konvolucí těchto dvou kinetik. Jestliže předpokládáme, že excitační pulz v čase 0 je nekonečně krátký, potom je okamžitá hodnota intenzity fosforence  ${}^1\text{O}_2$  v čase  $t$  po excitačním pulzu dána vztahem

$$I(t) = I_0 \int_0^t \exp\left(-\frac{t'}{\tau_T}\right) \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_\Delta}\right) dt'. \quad (1.30)$$

Po provedení integrace za předpokladu  $\tau_T \neq \tau_\Delta$  dostáváme

$$I(t) = \frac{I_0}{\frac{1}{\tau_\Delta} - \frac{1}{\tau_T}} \left( \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_\Delta}\right) \right). \quad (1.31)$$

Jestliže naměřenými kinetikami fosforence  ${}^1\text{O}_2$  proložíme funkci 1.31, dostáváme tak informaci o dobách života tripletních stavů PS a  ${}^1\Delta_g$ .

## 1.3 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je moderní a rychle se rozvíjející metoda léčby onkologických onemocnění, kde vedle chirurgického zákroku, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie představuje další možnost léčby nádorových onemocnění [66]. Úspěšně se ale uplatňuje i v dermatologii při léčbě lupénky a sklerodermie [1], při léčbě stářím podmíněné degenarace makuly [70] nebo artritidy [65]. V neposlední řadě lze PDT využít při léčbě lokálních virových [67] a bakteriálních infekcí s mnohočetnou lékovou rezistencí, jako je např. akné vulgaris [19]. PDT lze využít nejen pro samotnou léčbu, ale je možné ji současně použít pro diagnostiku a sledování vývoje onemocnění [6]. Přes již takto široké možnosti využití se stále objevují její nové aplikace.

Léčba fotodynamickou terapií je založena na aplikaci léčebné látky, která je fotosenzibilizátor, do těla pacienta. Tato látka je po určité době přednostně akumulována v postižené tkáni a po ozáření vhodnou vlnovou délkou světla je schopna generovat  $^1\text{O}_2$ . Ten následně způsobí nekrózu nebo apoptózu buněk nemocné tkáně [14].

Léčebné účinky rostlinných extraktů ve spojení se světlem znali již staří Egypťané, Číňané a Indové před tisíci lety. V novodobé historii se fotodynamické reakce začaly studovat až začátkem 20. století. Jako první pozoroval cytotoxický efekt akridinu v kombinaci se světlem Oscar Raab na kulturách paramecií. Herman von Tappeine poté prokázal závislost těchto procesů na kyslíku a už v roce 1903 spolu s Albertem Jesionkem publikovali první klinické zkušenosti s léčbou kožních nádorů a lupus vulgaris pomocí eosinu. Ve stejném roce získal Niels Finsen Nobelovu cenu za svou práci na fototerapii. Termín fotodynamická terapie se začal používat až o několik let později [63].

### 1.3.1 Aplikace, transport a hromadění PS

Fotosenzibilizátor se aplikuje do těla pacienta zpravidla jedním ze tří způsobů podle povahy onemocnění. První možností je podání PS lokálně ve formě masti. Druhou možností je injekční aplikace, která může být buď intravenózní (nitrožilně) nebo intralezionální (lokálně do postiženého místa). Po vpravení PS do těla pacienta jedním z výše uvedených způsobů dochází k postupnému hromadění PS v buňkách cílové tkáně, zatímco buňky zdravé tkáně se PS dokáží účinně zbavovat. Optimální koncentrace PS v postižené tkáni je dosažena v řádu hodin až dnů od jeho podání pacientovi, kdy koncentrace v postižené tkáni je několikanásobně vyšší než ve tkáni zdravé. Tato doba je dána hlavně typem onemocnění, druhem použitého PS a způsobem jeho aplikace.

K distribuci PS v organizmu může docházet buď pasivním nebo aktivním transportem. Transport pasivní je jednodušší, ale méně efektivní. Hydrofilní PS se v tomto případě podávají rozpuštěné ve fyziologickém roztoku. Hydrofobní PS tímto způsobem aplikovat nelze, proto je nejdříve nutné zabudovat jejich molekuly do koloidních nosičů, jakými jsou např. lipozomy nebo polymerní částice, které jsou již ve vodných roztocích rozpustné. V případě aktivního transportu se k distribuci PS do cílových buněk využívá monoklonálních protilátek nebo sérových proteinů [5, 29]. Tím je docíleno větší selektivity transportu a postačuje tak nižší množství PS podaného pacientovi. To zároveň představuje i nižší zátěž pro pacientův organismus.

Důvody selektivního zachytávání PS v nádorové tkáni nejsou doposud zcela pochopeny, přesto je známo několik možných vysvětlení [4]:

- **Zvýšená cévní propustnost** způsobená nekompletní endotelovou bariérou.
- **Nedostatečné lymfatické čištění** nádorových buněk způsobené nedostatečně vyvinutým nebo nefunkčním lymfatickým systémem.
- **Nižší pH nádorové tkáně** způsobené zvýšenou koncentrací kyseliny mléčné zvyšuje koncentraci některých PS (např. PpIX).
- **Zvýšené množství membránových receptorů pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL)**, které si nádorové buňky tvoří z důvodu potřeby cholesterolu při tvorbě nových membrán. Hydrofobní PS se k této sérovým proteinům v krevním řečišti často váží, čímž se zvyšuje jejich afinita k nádorovým buňkám.
- **Nedostatek enzymu ferrochelatázy** zajišťující v buňkách přeměnu PpIX na hem, příp. **nízká koncentrace železa** v buňce, která tuto přeměnu inhibuje (v případě použití kyseliny 5-aminolevulové).
- **Větší množství kolagenu**, ke kterému mají profyrinové PS zvýšenou afinitu.

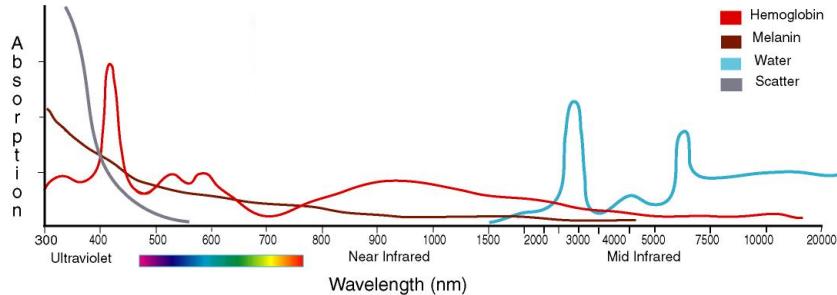
### 1.3.2 Excitace PS

V této fázi léčby je již PS lokalizován převážně v místě svého působení, přesto je zatím neaktivní a nevykazuje léčebný efekt. Zbývá ho převést do jeho excitované formy, ve které je schopný generovat singletní kyslík a způsobovat destrukci postižené tkáně. Excitace PS se provádí světlem o vlnových délkách absorbovaných PS. Situace je však komplikována tím, že samotný PS je lokalizován v tkáni, která sama obsahuje velké množství látek absorbujících a rozptylujících elektromagnetické záření od ultrafialového (UV) přes viditelné až po infračervené záření. Proto je vhodné aby PS absorboval v rozsahu vlnových délek, které s okolní tkání interagují co nejméně.

V této souvislosti zavádíme pojem penetrační hloubka. Ta je definována jako vzdálenost, na které poklesne intenzita dopadajícího záření na  $1/e$  své původní intenzity. Dále je možné zavést tzv. aktivní hloubku, což je vzdálenost, na které je záření už tak slabé, že přestává mít biologický efekt.

Infračervené záření je absorbováno převážně vodou, viditelné záření potom hlavně hemoglobinem a melaninem. Směrem do UV oblasti má na penetrační hloubku největší vliv rozptyl a absorpcie kovalentních vazeb proteinů. Jak je vidět z obrázku 1.3, z hlediska penetrační hloubky se jako nevhodnější jeví vlnové délky v rozsahu 650 – 850 nm [44]. Vzhledem k tomu, že různé tkáně obsahují absorbující látky v různém množství, penetrační hloubka se pro různé tkáně liší [71]. Např. tuková tkáň má větší penetrační hloubku oproti svalové tkáni, jelikož je méně prokrvená, a tudíž obsahuje i méně hemoglobinu. Penetrační hloubka se většinou pohybuje maximálně v řádu jednotek centimetrů.

Spolu s výběrem vhodného PS je nutné vybrat i vhodný zdroj světla, kterým ho bude možné účinně excitovat.



Obrázek 1.3: Absorpční spektra nejvíce absorbujících složek tkání [50].

První možností je využití různých druhů lamp, jako jsou wolframové lampy nebo argonové výbojky. Ty se ale vzhledem ke svému širokému spektrálnímu rozsahu musí dále doplňovat různými filtry a kolimovat na požadované místo. Další možností je využití LED diod, které vyzařují v úzkém oboru vlnových délek, nejsou tedy nutné další filtry a jsou poměrně levné.

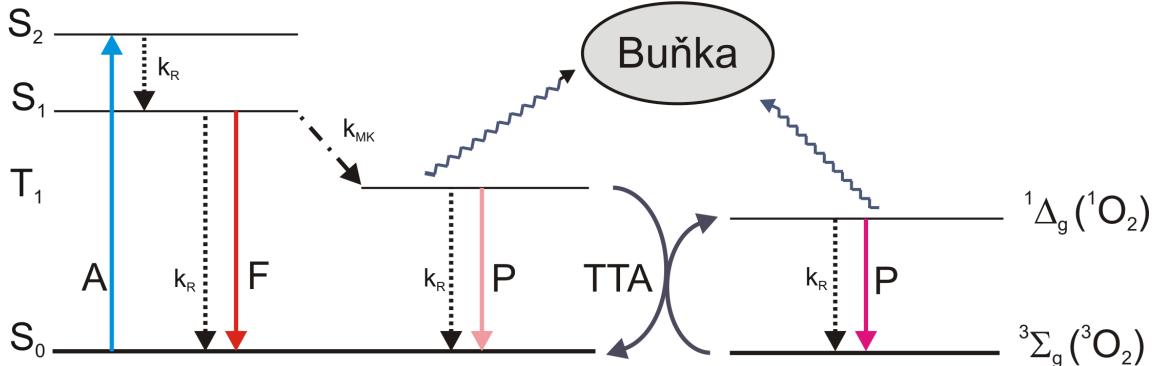
Nejčastěji se ale v dnešní době využívá laserů, které mají úzký vyzařovací úhel (není nutná kolimace) a vysoký výkon. Původně se pro tento účel využívalo barvivových laserů čerpaných nejčastěji lasery argonovými. Ty měly tu výhodu, že při vysokém výkonu byly přeladitelné v širokém spektru vlnový délek. Jejich nevýhodou byla vysoká cena spolu s obtížnou manipulací i ovládáním. Dnes se ve vysoké míře využívá laserů diodových, které jsou výrazně levnější, mobilnější a jednodušší na ovládání i údržbu. Jejich nevýhodou je pevně daná vlnová délka vyzařovaného světla. Neopomenutelnou výhodou laserů obecně je možnost jednoduše navázat jejich záření do optických vláken, která se využívají k ozařování těžko přístupných míst. Nejčastěji se světlo pomocí optických vláken přivádí k postiženým místům v dutých orgánech nebo se provádějí vpichy, do kterých se optická vlákna zavádějí pro kvalitnější osvícení tkání. Někdy jsou optická vlákna na svém konci doplněna difuzéry různých tvarů, které zlepšují distribuci excitaci v různých částech těla [69].

K excitaci se využívají výkony řádově  $100 \text{ mW/cm}^2$ , ale i vyšší. Pulzními lasery lze dosáhnout větší penetrační hloubky než lasery kontinuálními o stejném středním výkonu.

### 1.3.3 Působení PS

Pokud se podaří dostat světlo o vhodné vlnové délce až k PS a ten ho absorbuje, dostane se tak PS do singletního excitovaného stavu. Z něho se může vrátit zpět do základního stavu buď nezářivou vnitřní konverzí nebo získanou energii vyzáří a my můžeme pozorovat fluorescenci. Vzhledem k tomu, že je poměrně silná, není problém ji využít k diagnostice. Tím že vidíme oblast, kde je PS ve zvýšené míře lokalizován, máme vymezenu i patologickou tkáň.

Pro terapeutický efekt je ale nutné, aby molekula PS přešla ze svého excitovaného singletního stavu mezisystémovou konverzí do stavu tripletního s podstatně delší dobou života. Dlouhá doba života umožňuje excitované tripletní formě PS reagovat s mole-

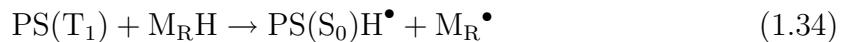


Obrázek 1.4: Přenos energie z PS na kyslík.

kulami v jeho okolí. Pokud se setká s molekulou kyslíku v základním stavu, který je tripletní, může dojít k triplet-tripletní anihilaci. Při ní vzniká z tripletního kyslíku jeho vysoce reaktivná forma – singletní kyslík, a samotný PS se vrací zpět do svého základního singletního stavu. Tyto procesy jsou znázorněny na obrázku 1.4.

Podle způsobu působení fotosenzibilizátoru v tripletním stavu rozlišujeme fotoefekt I. a II. typu.

V případě fotoefektu I. typu dochází k přenosu elektronu nebo protonu mezi PS v tripletním stavu a molekulou v jeho okolí za vzniku volných radikálů. Podle toho, zda je daná molekula oxidační (rce. 1.32 a 1.33) nebo redukční činidlo (rce. 1.34 a 1.35), mohou nastat reakce typu



kde  $\text{M}_\text{O}$  označuje oxidační činidlo a  $\text{M}_\text{R}$  redukční činidlo. Vzniklé volné radikály mohou dále reagovat s dalšími molekulami. Pokud je touto molekulou  ${}^3\text{O}_2$ , výsledkem této reakce je vznik superoxidového radikálového aniontu  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Ten může ale vznikat i přímou reakcí PS v tripletním stavu s  ${}^3\text{O}_2$ . Fotoefekt I. typu má tedy za následek řetězový vznik různých cytotoxických látek.

Při fotoefektu II. typu dochází k přenosu energie z PS v tripletním stavu na  ${}^3\text{O}_2$  za vzniku  ${}^1\text{O}_2$ . V biologickém prostředí převládá fotoefekt II. typu, nicméně podíl obou fotoefektů závisí na mnoha různých podmínkách [4].

V prostředí živých tkání má  ${}^1\text{O}_2$  možnost reagovat s celou řadou různých látek. Na to, s kterými molekulami to nakonec bude, má vliv to, s jakou rychlostní konstantou daná reakce probíhá a jaká je koncentrace dané látky v okolí  ${}^1\text{O}_2$ . To úzce souvisí s lokalizací PS v buňce. Nejčastěji se těchto reakcí účastní nukleové kyseliny (hlavně jejich

purinové baze), lipidy, steroly a hlavně proteiny, které tvoří přibližně 70 % suché váhy buněčných tkání. Mezi nejčastěji oxidované aminokyseliny patří tyrosin, tryptofan, histidin, methionin a cystein. Na reakce  $^1\text{O}_2$  s aminokyselinami má výrazný vliv, zda se daná aminokyselina nachází v buňce volně nebo je součástí peptidického řetězce. Rychlostní konstanty těchto reakcí jsou mimo jiné závislé na pH. Jejich přibližné hodnoty spolu s podrobným popisem reakčních mechanismů jsou uvedeny v [8].

Již během několika hodin po PDT dochází k poškození buněčných membrán, buňky se přestávají dělit a dochází k cytolýze. Je zasažena plazmatická membrána i membrány jádra, mitochondrií, lyzozomů, Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula. Poškození mitochondrií vede k inhibici elektron-transportních enzymů, inhibici oxidativní fosforylace a snížení hladiny ATP. Po PDT se také zvyšuje transkripce a translace některých genů, které souvisejí s produkcí látek při tzv. oxidativním stresu. PDT také významně zasahuje do systému kontroly buněčného cyklu a dochází k apoptóze (programované buněčné smrti). Poměrné zastoupení apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci PS a dávce ozáření. Nízké koncentrace PS a nízké dávky ozáření vyvolávají po PDT u 90 % buněk tumoru apoptózu, vyšší dávky ozáření a vyšší koncentrace fotosenzibilizátoru vyvolávají poškození buněčných membrán, což má za následek nekrózu [28]. Prakticky tedy dochází jak k apoptóze, tak k nekróze nádorových buněk. Apoptóza je častější v hlubších vrstvách nádorové tkáně, kde je dávka ozáření nižší než na povrchu. Pro ideální terapeutický efekt je výhodné maximální zastoupení apoptotické smrti. Nekrotická smrt buněk způsobuje nekontrolovatelné vylití jejich obsahu do extracelulárního prostoru, a tím může poškozovat okolní zdravé buňky, podněcovat vznik zánětů a způsobovat další komplikace a vedlejší účinky terapie.

Kromě přímé buněčné smrti ovlivňují destrukci nádorové tkáně také nepřímé vlivy vyvolané PDT. Mezi ně patří snížení přísunu živin a kyslíku k nádorovým buňkám z důvodu poškození cévního zásobení a neméně důležitá je i role imunologické odpovědi organizmu.

### 1.3.4 Fotosenzibilizátor

Na úspěšnost léčby PDT má největší vliv použitý fotosenzibilizátor. Proto jedním z hlavních směrů ve výzkumu PDT je vývoj nových PS s lepšími vlastnostmi (vyšší účinností a menšími vedlejšími účinky).

Vlastnosti ideálního fotosenzibilizátoru:

- chemicky čistá a stabilní látka se známou chemickou strukturou
- vysoký kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$
- silná absorpcí v dlouhovlnné oblasti spektra mezi 600 – 800 nm
- vysoká schopnost přednostní akumulace v patologické tkáni a rychlé odbourání z tkáně zdravé, zvláště pak z kůže a očí

- rozpustnost v požadovaném rozpouštědle
- netoxičnost

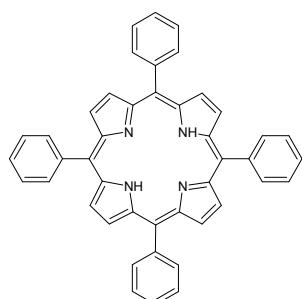
Nejčastěji se PS dělí na PS první a druhé generace podle toho, jak byly postupně vyvíjeny. Mezi PS první generace patří deriváty hematoporfyrinu (HpD) v různém stupni purifikace. Nevýhodou HpD je, že její složky nejsou přesně definovány a po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu. Přesto byly HpD jako první fotosenzibilizátor schváleny v roce 1993 Food and Drug Administration (FDA) pro klinické použití v Kanadě pod firemním názvem Photofrin [34]. Dnes jsou pod různými názvy schváleny např. v USA, Číně, Německu, Bulharsku, Japonsku nebo Rusku [28]. Jedním z derivátu hematoporfyrinu se známou strukturou je meso-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrin (TPPS<sub>4</sub>) (obr. 1.6). Jeho původní varianta vykazovala ve vyšších množstvích neurotoxicitu, ale později byla v České republice připravena speciálně purifikovaná varianta TPPS<sub>4</sub>, u které se již toto negativum neprokázalo. V současnosti je v České republice TPPS<sub>4</sub> schváleno pro lokální použití [28].

Fotosenzibilizátory druhé generace se začaly vyvíjet po roce 1991 a jejich hlavní výhodou oproti PS první generace je jejich nízká fototoxicita a známá chemická struktura. Nižší fototoxicita je dána tím, že PS absorbuje hlavně na delších vlnových délkách [43]. Patří sem např. modifikované porfyriny, ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny, purpuriny, benzoporfyrinové deriváty a další [44].

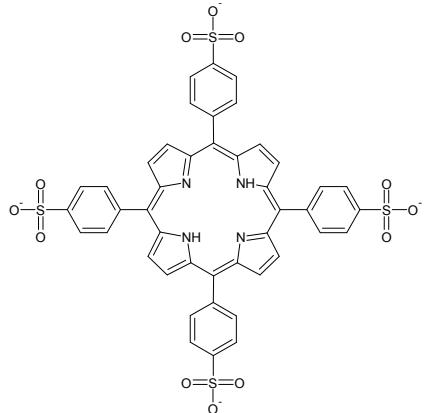
## Porfyriny

Porfyriny s různě upravenými postranními řetězci, které patří do druhé generace PS, se od těch patřících do první generace odlišují hlavně v tom, že jsou to čisté látky se známou chemickou strukturou. Je pro ně typická silná absorpce v tzv. Soretově pásu okolo 400 nm. Další slabší maxima absorpce se nacházejí v oblasti 400 – 650 nm (Q pásy). Vzhledem ke dlouhé době života jejich tripletních stavů vykazují poměrně vysoký kvantový výtěžek singletního kyslíku.

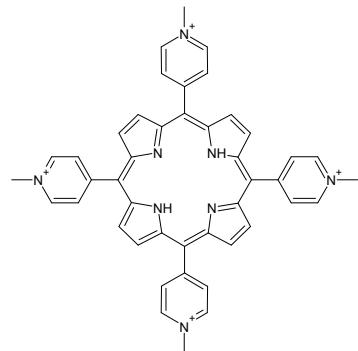
Modifikace porfyrinů se provádí navázáním různých chemických skupin na porfyrinové jádro nebo volbou různých kovových iontů koordinovaných v jeho středu. Mezi takto upravené porfyriny můžeme zařadit i meso-tetraphenylporfyrin (TPP), jehož strukturní vzorec je na obrázku 1.5. TPP je silně hydrofobní, proto se nehodí k podávání



Obrázek 1.5: Strukturní vzorec TPP.



Obrázek 1.6: Strukturní vzorec TPPS<sub>4</sub>.



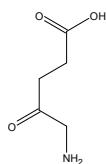
Obrázek 1.7: Strukturní vzorec TMPyP.

ve fyziologickém roztoku. Jednoduchými chemickými reakcemi můžeme však z TPP vytvořit látky snadno rozpustné ve vodě. Např. sulfonací lze vyrobit výše uvedený záporně nabité hydrofilní TPPS<sub>4</sub>, který má tendenci se akumulovat v lyzozomech. Obdobnou modifikací TPP byl rovněž připraven 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porfyrin (TMPyP), který se jeví jako nový slibný PS (obr. 1.7). Vzhledem k tomu, že je na rozdíl od TPPS<sub>4</sub> nabité kladně, má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám, s kterými interaguje elektrostatickou interakcí a interkalací [38,48]. Z toho vyplývá, že se primárně lokalizuje v buněčném jádře.

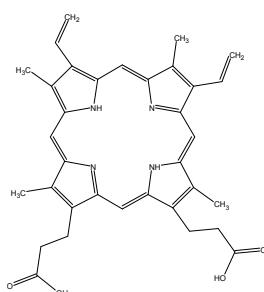
Vzhledem k poloze Soretova pásu a velkého účinného průřezu některých porfirinů pro dvoufotonovou absorpci, lze k jejich dvoufotonové excitaci využít dobře penetrujících vlnových délek z tzv. terapeutického okna [25]. Kromě vyšší penetrační hloubky při použití dlouhovlnného záření na dvojnásobku vlnové délky Soretova pásu, dochází i k nižšímu tepelnému poškození okolní tkáně vlivem absorbovaného záření.

## ALA

Kyselinu 5-aminolevulovou (ALA) můžeme zařadit mezi endogenní fotosenzibilizátory druhé generace, přestože sama o sobě nemá žádné fotosenzitivní účinky. ALA (obr. 1.8) je jednoduchá pětiuhlíkatá molekula, která se přirozeně vyskytuje v lidském těle, kde se účastní syntézy hemu. Vzniká ze succinyl-CoA a glycincu pomocí ALA



Obrázek 1.8: Strukturní vzorec ALA.



Obrázek 1.9: Strukturní vzorec PpIX.

syntetázy v mitochondriích. Z osmi molekul ALA vzniká v několika po sobě jdoucích enzymatických reakcích protoporfyrin IX (PpIX), který se ukázal jako poměrně dobrý PS. PpIX je dále přeměňován na hem. Za normálních okolností je přeměna ALA na PpIX regulována množstvím vyprodukovaného PpIX v buňce, jehož přirozená koncentrace ovšem k fotodynamickému efektu nestačí. Jestliže ale podáme pacientovi ALA, zvýší se její koncentrace v buňce, čímž i přes regulaci negativní zpětnou vazbou docílíme zvýšené produkce PpIX. Podrobné schéma metabolických drah účastnících se syntézy hemu je vidět na obrázku 1.10. V současnosti se ALA používá v klinické praxi i v České republice a vyrábí ho firma DUSA Pharmaceuticals, Inc., pod názvem Levulan.

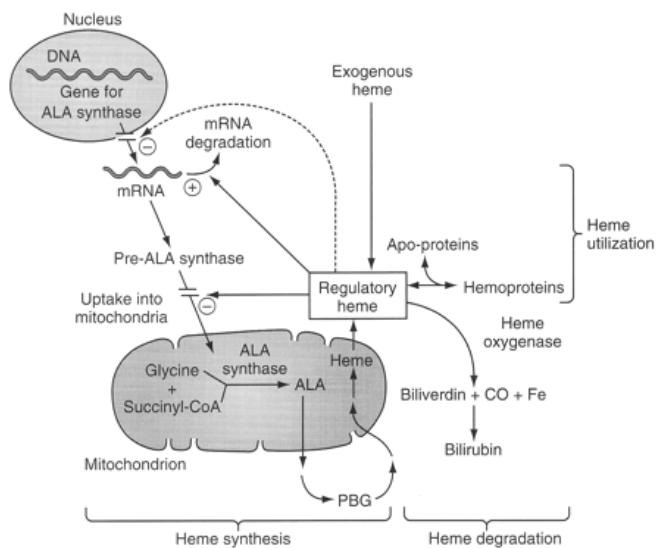
### Ftalocyaniny

Navázání benzenových jader na pyrolová jádra se projevuje posunem absorpce do červena. Ftalocyaniny mají absorpční maxima mezi 630 – 700 nm a nevyvolávají kožní fotosenzitivitu. Často jsou dále chelatovány různými kovy, což zvyšuje jejich fototoxicitu. Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány hlavně v lyzozomech, ale akumulují se i v mikrozomech či mitochondriích.

### Chloriny

Chloriny jsou degradační produkty chlorofylu odvozené od porfyrinové struktury. Posunutí absorpce k delším vlnovým délkám oproti porfyrinům je dáno redukcí dvojné vazby v jednom z pyrolových kruhů. V případě bakteriochlorinu jde o dvě hydrogenovaná pyrolová jádra. Absorbuje na podobných vlnových délkách a vykazují nízkou fotosenzitivitu po léčbě podobně jako ftalocyaniny.

Další generace fotosenzibilizátorů bude zřejmě zaměřena na větší selektivitu destrukce patologické tkáně. Toho by mělo být docíleno pomocí PS druhé generace navázaných k přenašečům upřednostňujícím transport a hromadění právě v patologické tkáni [44].



Obrázek 1.10: Metabolismus hemu [20].

### 1.3.5 Výhody, vedlejší účinky a hranice použitelnosti PDT

Mezi hlavní výhody PDT můžeme zařadit její minimální toxicitu. Na rozdíl od chemoterapie a radioterapie, které dnes patří mezi nejhojněji využívané léčebné techniky v onkologii, nebyly karcinogenní ani mutagenní účinky doposud zaznamenány [28]. I díky tomu je v případě potřeby možné léčbu PDT v krátkém čase opakovat. Dalšími výhodami je pak to, že se jedná o neinvazivní metodu s velmi vysokou selektivitou účinku. Poškození zdravé tkáně je proto minimální a v porovnání s chirurgickým řešením vykazuje tato léčba dobré výsledky i z estetického hlediska. Vysoké selektivity se úspěšně využívají u neoperovatelných nádorů (mozku atp.), kde je o to více přínosná. Neopomenutelnými výhodami PDT je také krátká doba hospitalizace i následné rekovařescence.

Přestože PDT nemá obecně mnoho vedlejších účinků, i zde nějaké existují. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří kožní fotosenzitivita pacienta po zákroku, a to zvláště v případě intravenózní aplikace PS. Pacient se proto musí vyvarovat přímého slunečního záření a silných zdrojů světla do doby, než se zbývající PS z těla vyloučí. V současnosti probíhají výzkumy, jak vylučování PS z těla po terapii urychlit a jak určit dobu, kdy je možné pacienta opět pustit na světlo. Přestože PS působí velmi selektivně, vedlejšími účinky se projevuje i v okolní zdravé tkáni a to nejčastěji pálením, otokem a bolestí. Dále se může objevit kašel, obtížné a bolestivé dýchání nebo bolesti břicha. Tyto příznaky většinou po krátké době ustupují [51].

Největší omezení použitelnosti PDT je dáno penetrační hloubkou tkání, která se pohybuje maximálně v rádech několika centimetrů. Vzhledem k tomu, že metoda vpichu optických vláken přímo do postiženého místa není zatím příliš rozšířena, je možné provádět léčbu jen na povrchu těla, v dutých orgánech nebo dutinách dostupných endoskopu, které světlo k postiženému místu dopraví. Ze stejného důvodu je obtížná i léčba velkých nádorů.

## 1.4 Detekce singletního kyslíku *in situ*

### 1.4.1 Možnosti monitorování průběhu PDT

Na průběh PDT má zásadní vliv trojice komponent: fotosenzibilizátor, světlo a kyslík. Koncentrace fotosenzibilizátoru a kyslíku v základním stavu stejně jako intenzita záření se může během léčby v buňce výrazně měnit, přičemž vzájemná závislost těchto základních komponent PDT je komplikovaná. Jak se ukazuje v klinické praxi, i při pevně daných dávkách fotosenzibilizátoru a světelného záření je výsledný efekt u některých pacientů nepředvídatelný. To jasně ukazuje na potřebu monitorování základních komponent PDT před i během léčby a jejich případnou okamžitou regulaci. Takovým přizpůsobením léčby, zohledňujícím rozdíly mezi jednotlivými pacienty, by mohlo být dosaženo ideálního terapeutického efektu.

Nicméně přesné monitorování ani jedné z těchto tří komponent není úplně jednoduché. Jednou z poměrně dobře rozvinutých metod je monitorování vybělování fotosenzibilizátoru pomocí jeho fluorescence, případně i fluorescenčního měření jeho fotoproduktu [56]. Takové měření do jisté míry spojuje množství PS a jím absorbovaného záření v jedený parametr, ze kterého lze pak usuzovat na výsledný biologický efekt. Při experimentech s MLL buňkami kultivovanými s fotosenzibilizátorem metatetra(hydroxyfenyl)chlorinem (mTHPC) bylo dokonce ukázáno, že takového měření lze využít pro předpověď množství vyprodukovaného  $^1\text{O}_2$ , přičemž je zapotřebí přibližně  $9 \times 10^{-8}$  molekul singletního kyslíku na buňku, aby frakce přeživších buněk klesla na  $1/e$  [15]. Přestože je tato metoda relativně jednoduchá a je využívána v mnoha studiích, není univerzálně použitelná a může vyžadovat další měření pro jednoznačnou interpretaci výsledků.

Pro predikci výsledného terapeutického efektu byly rovněž testovány metody, které využívají sledování léčbou indukovaného snížení cévního zásobení nebo nekrózy a apoptózy buněk. Z těchto metod můžeme zmínit např. metodu monitorování krevního průtoku založené na Dopplerově jevu [21], impedanční spektroskopii [39] nebo pozitronovou emisní tomografii [32]. Zatím však není jasné, zda některá z těchto metod je schopná detektovat změny v postižené tkáni v tak krátkém čase, aby bylo ještě možné měnit podmínky terapie.

Asi nejlepší možnou cestou se jeví detekce množství ROS produkovaných při PDT, v první řadě pak  $^1\text{O}_2$ , který z nich má největší vliv na buněčnou smrt. Měřením produkce  $^1\text{O}_2$  během PDT by bylo možné přímo sledovat množství klíčové komponenty PDT, jakožto výsledek interakce tří základních komponent. V závislosti na množství vyprodukovaného  $^1\text{O}_2$  by pak bylo možné měnit parametry PDT přímo v jejím průběhu, a tím regulovalt tvorbu  $^1\text{O}_2$  i predikovat výsledný terapeutický efekt.

Detekce  $^1\text{O}_2$  je možná pomocí různých nepřímých metod, využívajících např. luminiscenčních sond [55] nebo elektronové paramagnetické rezonance (EPR) [73]. Tyto metody však vykazují mnohá omezení, zvláště pak při použití *in vivo*. Hlavními problémy se jeví možná toxicita luminiscenčních sond nebo malá specificita sond používaných při EPR, ale i další technické obtíže při EPR měřeních *in vivo* nebo v reálném čase.

Přestože luminiscence singletního kyslíku doprovázející přechod  ${}^1\Delta_g \rightarrow {}^3\Sigma_g^-$  je velmi slabý jev, právě jeho přímá časově rozlišená detekce se v současnosti jeví jako nejlepší možná neinvazivní metoda, která umožňuje kromě monitorování průběhu terapie i významnou pomoc při odhalování jejích mechanizmů [57].

#### 1.4.2 Vývoj detekce singletního kyslíku v biologických studiích

Nedlouho poté, co byl v polovině 70. let singletnímu kyslíku přiřazen cytotoxický efekt [68], byl naměřen i jeho první časově rozlišený luminiscenční signál. Nejprve generovaný fotosenzibilizátory v  $\text{CCl}_4$  [30], ve kterém má  ${}^1\text{O}_2$  poměrně dlouhou dobu života, a později pak i ve vodném prostředí [26]. Koncem 80. let přicházejí na řadu první více či méně úspěšné pokusy o luminiscenční detekci  ${}^1\text{O}_2$  v biologických systémech.

Do této chvíle se k detekci luminiscence singletního kyslíku (SOL) využívaly převážně germaniové detektory, které vykazovaly nízkou citlivost a další nepříznivé vlastnosti. To se změnilo poté, co byl firmou Hamamatsu vyvinut nový fotonásobič R5509, citlivý v blízké infračervené oblasti (NIR), umožňující pracovat v časově rozlišeném módu čítání jednotlivých fotonů s odezvou  $\sim 3$  ns. Jeho kvantová účinnost na 1270 nm činní 0,9 %, což je asi o řad více, než tomu bylo u germaniových detektorů.

V roce 2002 publikovali první úspěšné pokusy s tímto fotonásobičem Hirano *et al.* [18] a Niedre *et al.* [45]. Hirano umístil před fotonásobič monochromátor a tak naměřil luminiscenční spektrum  ${}^1\text{O}_2$  z myšího tumoru použitím dvou PS: Photofrinu a ATX-S10NA. Niedre naopak použil pouze několik pásmových filtrů, aby zvýšil intenzitu signálu, ale přitom jej byl schopný bezpečně oddílit od pozadí. Předmětem experimentů zde byla časově rozlišená luminiscence  ${}^1\text{O}_2$  generovaného tetrasulfonovaným ftalocyaninem s centrálním atomem hliníku ( $\text{AlS}_4\text{Pc}$ ) a Photofrinem.  ${}^1\text{O}_2$  byl generován nejprve ve vodném prostředí s přidanými zhášedly ( $\text{NaN}_3$ ) nebo proteiny (BSA), následně pak ze suspenze leukemických buněk AML a nakonec z kůže a jater pokusné myši. Pro nafitování dat získaných z buněčné suspenze, myší kůže a myších jater, ve kterých dochází ke zvýšené akumulaci fotosenzibilizátoru, bylo potřeba šesti parametrů (dvou různých kinetik). Zatímco jedna sada parametrů odpovídala dobám života  ${}^1\text{O}_2$  a triplétových stavů fotosenzibilizátoru ve vodném prostředí  $\sim 3$   $\mu\text{s}$ , u druhé sady se znatelně prodloužily doby života tripletových stavů PS na  $(19 \pm 3)$   $\mu\text{s}$  u buněčné suspenze a na  $(15,7 \pm 1,8)$   $\mu\text{s}$  u myši. Doby života  ${}^1\text{O}_2$  pak vycházely na  $(0,6 \pm 0,4)$   $\mu\text{s}$  u buněčné suspenze a v případě myši byl vzhledem k nemožnosti nafitování tohoto parametru proveden odhad na  $0,03 - 0,18$   $\mu\text{s}$ .

Dosud bylo všeobecně předpokládáno, že množství  ${}^1\text{O}_2$  generovaného v buňce při PDT určitým způsobem koreluje s množstvím následně odumřelých buněk, ale nebylo to zatím experimentálně prokázáno. První takový důkaz provedl Niedre *et al.* s leukemickými buňkami AML5 kultivovaných s ALA *in vitro* [46]. Při těchto pokusech byly měněny parametry PDT (koncentrace PS, dávka záření a hladina kyslíku) a bylo ukázáno, že dávka  ${}^1\text{O}_2$  velmi dobře koreluje s množstvím odumřelých buněk. Naopak závislost buněčné smrti na jediném proměnném parametru (např. dávce záření) není tak přesvědčivá vzhledem k dalším nekontrolovatelným parametry měnícím se během

PDT a majícím na výslednou produkci  $^1\text{O}_2$  vliv. Následně byl tento výsledek potvrzen *in vivo* na myších za použití ALA [47].

Při dostatečně vysokých dávkách PS a světelného záření dochází během PDT k postupnému snižování hladiny kyslíku v základním stavu vlivem jeho fotochemického navázáním k různým substrátům v buňce i vlivem snížení prokrvení [7]. Pomocí časově rozlišené detekce luminiscence  $^1\text{O}_2$  a z ní určených dob života  $\tau_T$  (tripletní stavu PS) a  $\tau_\Delta$  ( $^1\text{O}_2$ ) lze usuzovat na koncentraci kyslíku v buňkách, popř. na vybělování PS.

Doba života tripletních stavů  $\tau_T$  je silně závislá na koncentraci  $^3\text{O}_2$  dle Stern-Volmerovy rovnice

$$k_T = \tau_T^{-1} = k_R + k_{NR} + k_{OT}[^3\text{O}_2], \quad (1.36)$$

kde  $k_T$  je rychlostní konstanta relaxací tripletních stavů PS (převrácená hodnota doby života  $\tau_T^{-1}$ ).  $k_R$  a  $k_{NR}$  jsou pak rychlostní konstanty zářivých a nezářivých přechodů tripletních stavů PS. Rychlostní konstanta  $k_{OT}$  zde reprezentuje rychlosť zhášení tripletních stavů PS tripletním kyslíkem. Jak je vidět z rovnice 1.36, ze změny doby života  $\tau_T$  lze jednoduše určit změnu  $[^3\text{O}_2]$ . Použitelnost této metody byla ověřena *in vitro* na suspenzi leukemických buněk kultivovaných s ALA [23]. Parciální tlak kyslíku ( $p\text{O}_2$ ) zde byl nezávisle kontrolován Clarkovou elektrodou a byla ukázána silná korelace mezi  $k_T$  a  $p\text{O}_2$ , stejně tak postupný pokles  $[^3\text{O}_2]$  během PDT v suspenzi buněk. Urcitým problémem této metody se jeví obtížné určení dob života z dat odpovídajících nízkému  $p\text{O}_2$ , tedy i redukovanému signálu  $^1\text{O}_2$ . Dalším sporným bodem je pak fakt, že současně provedená měření *in vivo* se nepodařilo uspokojivě interpretovat a další nezávislé experimenty provedeny nebyly.

Dalším krokem v monitorování PDT byla úprava aparatury provedená Niederem *et al.* pro účely prostorově rozlišeného snímání luminiscence  $^1\text{O}_2$ . Pomocí excitačního laserového svazku skenujícího vzorek bylo možné pořizovat prostorově rozlišené snímky produkce  $^1\text{O}_2$  s rozlišením  $1 \times 1 \text{ mm}$  na pixel. Toho bylo využito pro prostorově rozlišená měření  $^1\text{O}_2$  z tumoru myši, které byla aplikována ALA [47].

Směrem studia PDT na úrovni jednotlivých buněk se vydala skupina prof. Ogilbyho. Pro tyto účely vyvinula mikroskop umožňující detekci  $^1\text{O}_2$  z jednotlivých buněk pomocí lineárního InGaAs detektoru skenujícího vzorek, který zajišťuje prostorové rozlišení experimentu, a klasického NIR fotonásobiče pro časově rozlišená měření [59, 61]. To dává unikátní možnosti zkoumání časového vývoje a vlivu lokalizace  $^1\text{O}_2$  na biologickou odpověď, jako je buněčná smrt nebo signalizace. Vzhledem k velmi slabému signálu, byla většina experimentů prováděna po izotopické výměně vodného prostředí buněk za  $\text{D}_2\text{O}$ , v kterém má  $^1\text{O}_2$  asi  $20 \times$  delší dobu života než v  $\text{H}_2\text{O}$ . Pro zvýšení signálu bylo rovněž využíváno zvýšené koncentrace kyslíku v buňkách, čehož bylo docíleno zvýšením tlaku kyslíku ve vzorkovém prostoru.

Extrapolací dob života  $^1\text{O}_2$  získaných postupným zvyšováním poměru  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  v buňce obdržel Skovsen *et al.* dobu života  $^1\text{O}_2$  pro buňku bez izotopické záměny  $\sim 3 \mu\text{s}$  [58]. Ta se příliš neliší od doby života  $^1\text{O}_2$  ve vodě ( $\sim 3,5 \mu\text{s}$  [57]) a je znatelně delší, než uvádí Niedre *et al.* pro buněčné suspenze a tkáně [45]. Při použití stejného PS jako Skovsen *et al.* (TMPyP), získala Jiménez-Banzo *et al.* dobu života  $^1\text{O}_2$  z buněčných suspenzí lidských fibroblastů  $(1,7 \pm 1,0) \mu\text{s}$  [3].

Bylo ukázáno, že doba života  $^1\text{O}_2$  závisí na místě jeho produkce, které je dáno místem buněčné lokalizace PS [2, 3, 31, 60]. S tím úzce souvisí i difuzní vzdálenost  $^1\text{O}_2$  v buňce, která byla delší dobu velkou otázkou. Přestože je doba života  $^1\text{O}_2$  v buňce poměrně dlouhá [58], vzdálenost, kterou může  $^1\text{O}_2$  urazit, je vzhledem k vysoké viskozitě buněčného prostředí poměrně krátká a je odhadována na  $\sim 100$  nm [17]. To zároveň odpovídá na otázkou, zde je možné, aby  $^1\text{O}_2$  opustil buňku, v které byl vyprodukovaný. Podle všeho to možné je v případě, že PS, který ho produkuje, se nachází poblíž cytoplazmatické membrány popř. v jádře nalézajícím se v její těsné blízkosti.

Nejpoužívanějším PS používaným při těchto experimentech se stal vzhledem ke svým příznivým vlastnostem TMPyP. Právě na tomto PS bylo ukázáno, že jeho vazba k DNA může být ovlivněna mírou ozáření. To má za následek i změnu jeho lokalizace v buňce, kdy se z jádra přesunuje do cytoplazmy a dalších buněčných organel [62].

Dalším zajímavým pokrokem v detekci  $^1\text{O}_2$  pomocí mikroskopu, bylo použití dvoufotonové excitace [16, 61]. Dvoufotonová mikroskopie má oproti konfokální mikroskopii velkou výhodu v tom, že při ní nedochází k zbytečnému vybělování PS z části vzorku, ze které není signál sbírána. Naopak je zde excitován pouze malý objem vzorku, z kterého je signál sbírána bez použití apertury zajišťující při konfokální mikroskopii snímání pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Vzhledem k tomu, že dvoufotonová excitace je málo pravděpodobný nelineární jev, je k němu potřeba vysoký fotonový tok a PS s velkým účinným průřezem pro dvoufotonovou absorpci. Nicméně výsledky z dvoufotonové mikroskopie z relevantních biologických systémů zatím publikovány nebyly.

Yamamoto *et al.* zkoumal produkci  $^1\text{O}_2$  v buněčných suspenzích *in vitro* a myším tumoru *in vivo* za použití ALA [72]. Jako zdroj záření byl použit laser YAG-dye (Hamamatsu) generující světelné pulzy na 635 nm s energií 4 mJ, a délhou 5 ns s 30 Hz opakovací frekvencí. Laserové záření bylo do nádoru dopravováno difuzérem voperovaným do nádoru a signál byl detekován pomocí světlovodu připojenému k NIR fotonásobiči H9170-45 (Hamamatsu) přes pásmové filtry. Bylo ukázáno, že celková produkce  $^1\text{O}_2$  a typ buněčné smrti je závislý na způsobu excitace. V případě excitace nižšími výkony po delší dobu bylo vyprodukovaný více  $^1\text{O}_2$  než při excitaci vyššími výkony po kratší dobu. Kromě vyššího fotodynamického efektu byl při nižších výkonech vyšší i poměr apoptotické vůči nekrotické smrti v porovnání s vyššími výkony. Celková dávka záření při různých typech excitace (80, 160, 240 mW/cm<sup>2</sup>) byla vždy stejná.

V nedávné době se podařil skupině Davise *et al.* pokrok v budování aparatury, která ke snímání  $^1\text{O}_2$  využívá dvouramenného světlovodu s luminiscenční sondou. Takovéto světlovody jsou tvořeny dvěma skupinami vláken. Jedna skupina vláken tvoří excitační rameno světlovodu, druhá pak tvoří rameno detekční. Obě skupiny vláken potom společně vyúsťují v tzv. luminiscenční sondu, která se přikládá k povrchu měřeného vzorku. Excitačním vláknem je tak k povrchu vzorku dopravováno excitační záření a zbývajícími detekčními vlákny dochází k sběru luminiscenčního signálu emitovaného vzorkem. Takový světlovod je v této aparatuře přímo připojen k diodovému laseru s opakovací frekvencí 10 kHz a NIR fotonásobiči Hamamatsu H9170-45 využívajícímu termoelektrického chlazení Peltierovými články. Použité pulzy jsou dlouhé nejčastěji 5  $\mu\text{s}$  s energií  $< 1$  mJ. Takové uspořádání umožňuje vytvoření velmi kompaktního zařízení s jednoduchým ovládáním vhodného pro klinické použití. Vzhledem k me-

todě excitace a sběru signálu je tak možné do budoucnosti uvažovat i o jeho využití při katetrizaci. Jednoduchost takového uspořádání bohužel neumožňuje vyšší spektrální rozlišení experimentů, než je možné dosáhnout použitím pásmových filtrů. Dospod byly provedeny studie, v kterých bylo toto zařízení použito pro detekci  $^1\text{O}_2$  od jednoduchých roztoků s PS, přes buněčné suspenze [35] až k jeho detekci z krysy s tumorom léčeným pomocí chlorinu e6 (Cl-e6) a ALA [36]. Nakonec byly publikovány i první výsledky detekce  $^1\text{O}_2$  ze zdravých lidských dobrovolníků s aplikovanou ALA [33]. V případě krysy byla prokázána závislost dávky  $^1\text{O}_2$  na regresi velikosti tumoru, u lidí pak byla hodnocena fotobiologická odpověď (velikost otoku). Přestože jsou v publikacích [35, 36] prezentovány kinetiky luminiscence  $^1\text{O}_2$  z buněčných suspenzí i přímo z myšího tumoru, nejsou zde uvedeny získané doby života. Z prezentovaných kinetik je patrné, že nebylo možné naftovat jejich nárůsty. To je nejspíše způsobeno použitím dlouhých excitačních pulzů měnících charakter nárůstu kinetik. Vzhledem k tomu, že u biologických vzorků může nárůst kinetiky odpovídat době života  $^1\text{O}_2$ , je nemožnost jejich naftování výrazným nedostatkem, který prozatím omezuje možnosti této aparatury pro měření dob života  $^1\text{O}_2$  v biologický systémech.

Nyní skupina vyvíjí aparaturu, pomocí které je možná současná prostorová detekce fosforecence  $^1\text{O}_2$  i fluorescence PS pomocí dvou kamer. Schúdnost takového uspořádání byla prezentována na myších s tumory léčenými Cl-e6 [37].

### 1.4.3 Technologie a možnosti zdokonalení detekce $^1\text{O}_2$

Největší prostor pro zdokonalení detekce SOL představují nejspíše NIR detektory. Současné NIR fotonásobiče, původně vyvinuté pro telekomunikační aplikace, mají i přes své výrazné zdokonalení oproti předchozím germaniovým detektorům stále poměrně nízkou kvantovou účinnost ( $\sim 1\%$ ). Rychlý vývoj křemíkových detektorů zde není bohužel přínosný, jelikož nejsou v oblasti SOL okolo 1270 nm citlivé a vývoj NIR citlivých materiálů (germanium, InGaAs nebo InGaAsP) je o poznání pomalejší.

V posledních letech přicházejí do popředí zájmu NIR citlivé lavinové diody umožňující čítání jednotlivých fotonů. Přestože vykazují jisté nedokonalosti, jako afterpulzy a vyšší množství temných pulzů, jejich velká výhoda tkví ve vysoké kvantové účinnosti, která může dosahovat 10 – 20 %. Rovněž je zde i možnost jejich pozdějšího uskupení do diodových polí pro pořizování prostorově rozlišené detekce.

Novinkou mezi komerčně nabízenými NIR detektory je v současnosti zesilovaná kamera MOSIR 950 (Intevac Photonics). Ta umožňuje prostorově rozlišenou detekci SOL a v případě doplnění o disperzní člen ji lze rovněž využít ke spektrálně rozlišeným experimentům. Kamera není dostatečně rychlá pro časově rozlišenou SOL detekci, nicméně disponuje elektronickou uzávěrkou umožňující volbu expozice již od 10  $\mu\text{s}$ . To umožňuje efektivní zvýšení poměru signál/šum, jelikož je možné akumulovat signál pouze po nezbytně nutné době danou kinetikou SOL a neakumuluje se tak šum po jejím skončení. Kamera je citlivá od 950 nm do 1650 nm s poměrně vyrovnanou spektrální citlivostí pohybující se okolo 30 %. Takto vysoká citlivost je možná díky kombinaci NIR citlivé fotokatody emitující fotoelektrony, které jsou následně urychlovány elektrickým polem a bombardují zpětně osvětlovaný CCD detektor. Spínání tohoto elektrického

pole současně slouží jako elektronická uzávěrka. Vzhledem k tomu, že se jedná o novou technologii, vykazují detektory těchto kamer velké množství kazů a nerovnoměrnou citlivost. Některé z těchto nedokonalostí lze ale softwarově korigovat.

V neposlední řadě přicházejí v úvahu dnes komerčně dostupné mikrokanálové detektory (MCP). Ty jsou tvořeny velkým počtem speciálních skleněných kapilár zastupujících zde funkci dynod z klasických fotonásobičů. MCP disponují kromě prostorového rozlišení i velmi vysokým časovým rozlišením ( $< 1\text{ ns}$ ). Prozatím je však hlavním faktorem limitujícím jejich použití příliš vysoká cena.

Další potenciální zdokonalení detekce by mohlo být umožněno pomocí supravodičových detektorů jednotlivých fotonů, které jsou citlivé v NIR oblasti, vykazují velmi vysoký kvantový účinek přesahující 80 % a je u nich možná energetická diskriminace fotonů. To by umožnilo spektrální rozlišení experimentu bez nutnosti monochromátoru nebo pásmových filtrů, čímž by se zvýšila propustnost detekčního systému pro SOL, tedy i intenzita signálu. Stejně jako u lavinových diod je zde možné jejich pozdější uspořádání do polí pro prostorově rozlišená měření. Prozatím je jejich velkou nevýhodou dlouhá mrtvá doba ( $\sim \mu\text{s}$ ) a pomalá odezva, což neumožňuje jejich použití pro časově rozlišené čítání fotonů SOL. Prozatím není jasné, zda je možné tyto překážky překonat, přesto je zde stále možnost využití těchto detektorů s energetickou diskriminací a velmi vysokou kvantovou účinností pro kontinuální SOL detekci.

Prostor ke zdokonalení existuje i v případě zdrojů světla. Jako nejperspektivnější se jeví různé druhy pulzních laserů. Hlavními požadavky, které jsou na ně kladeny, jsou vysoká opakovací frekvence (desítky kHz) pro rychlou akumulaci dat a vysoký výkon ( $> 100\text{ mW/cm}^2$ ) na vlnový délkah ( $\sim 630 - 765\text{ nm}$ ). Těchto zdrojů světla by bylo využíváno současně jako zdroje pro SOL detekci, tak i léčbu PDT.

Alternativní metodou detekce SOL by mohlo být využití levných zdrojů světla pro měření SOL ve frekvenční doméně. V takovém případě se dá k modulaci světla využít buď přímo frekvenční generátor nebo lze modulaci provést nepřímo pomocí akusto-optických modulátorů. Zatím bylo ukázáno, že pomocí této metody lze získat signál SOL z roztoků PS ne však z biologických vzorků, jako jsou buněčné suspenze nebo tkáně [49]. Tyto pokusy byly ale prováděny ještě se starými germaniovými detektory. S novými typy detektorů se o taková měření pokouší Niedre *et al.* [23].

# Kapitola 2

## Materiály a metody

### 2.1 TMPyP v PBS

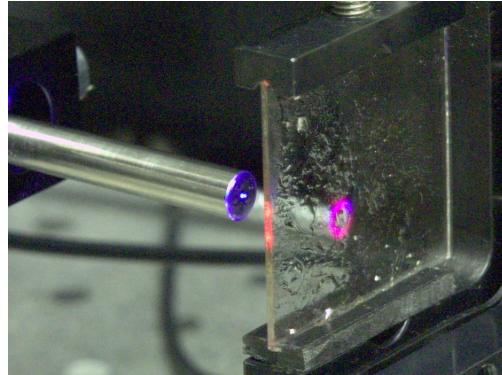
Rozpuštěním TMPyP (Aldrich) v 1 mM fosfátovém pufru (PBS) o pH = 7,4 (pH lidské krve), byla vytvořena jeho koncentrační řada od 5 µM do 400 µM. Vzorky s danými koncentracemi TMPyP byly měřeny vždy pro tři různé koncentrace v nich rozpuštěného kyslíku: 0 µM, 280 µM a 1,4 mM. To postupně odpovídá koncentraci kyslíku ve vzorcích probublávaných jednu hodinu plynným dusíkem, v rovnováze s okolním vzduchem a probublávaných 30 minut plynným kyslíkem. Vzhledem ke známé vlastnosti TMPyP upřímat na stěnách křemenných kyvet (Hellma), byly kyvety mezi jednotlivými měřeními čištěny v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut při 70 °C v 2 % roztoku Hellmanex II (Hellma). Čistota a fotostabilita měřených vzorků byla kontrolována absorpcním spektrometrem Specord 250 (Analytik Jena) a fluorescenčním spektrometrem AvaSpec-2048 (Avantes). Fosforecence TMPyP a jím generovaného singletního kyslíku byla měřena s původním uspořádáním aparatury, jak je popsáno v kapitole 3.1.1, s opakovací frekvencí excitačních pulzů 100 Hz.

### 2.2 TPP v prostředí fosfatidylcholinu

Suché lipidové vzorky s TPP byly připraveny dvouhodinovým odpařováním rozpouštědla plynným dusíkem ze směsi 0,25 ml 350 µM TPP (Frontier Scientific) a 1 ml 200 mM L- $\alpha$ -fosfatidylcholinu (PC, sojový, 95 %, Avanti Polar Lipids) v chloroformu p.a. (Lachema). Tato směs se nacházela v křemenné spektroskopické kyvetě 1×1 cm s opticky leštěným dnem (Hellma), ze které bylo později prováděno měření v uspořádání aparatury popsané v kapitole 3.1.1.

Pro lepší odpaření chloroformu z lipidových vzorků byla použita metoda spin-coating založená na dávkování vzorku na rychle se otáčející podložku. Tím dojde k jeho rovnoměrnému rozprostření po podložce a rychlému odpaření rozpouštědla.

Stejná směs TPP a PC v chloroformu, jako v případě předchozího vzorku v kyvetě, byla postupně dávkována pipetou po 10 µl na DIA sklíčko připevněné na otáčejícím se ventilátoru o průměru 8 cm a napájeném 12 V. Tím bylo docíleno dobrého odpaření



Obrázek 2.1: Měření lipidového vzorku připraveného metodou spin-coating.

chloroformu z lipidového vzorku obsahujícího TPP, který nakonec v tenké vrstvě pokrýval povrch sklíčka.

Takto připravený vzorek byl umístěn těsně před vstup detekčního systému takovým způsobem, že hrana sklíčka splývala s jeho vstupní štěrbinou. Laserové excitační záření bylo přiváděno kolmo k povrchu vzorku pomocí světlovodu. Tímto způsobem byl ze vzorku efektivně sbírána luminiscenční signál, který se z velké části šířil totálními odrazy uvnitř sklíčka a boční stranou vystupoval ven (viz obr. 2.1).

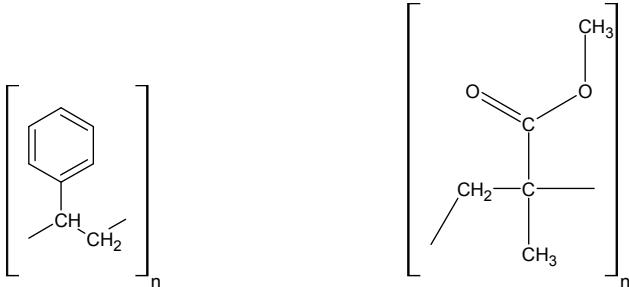
### 2.3 PpIX v polymerních fóliích

Jako polymerní matrice byly zvoleny polystyren o molekulové váze  $M_W \sim 192.000$  a polymetylmetakrylát (PMMA) o molekulové váze  $M_W \sim 120.000$  (Aldrich). Strukturní vzorce monomerních jednotek obou polymerů jsou na obrázku 2.2. Jako fotosenzibilizátor byl vzhledem k později plánovaným pokusům *in vivo* zvolen protoporfyrin IX ( $\geq 95\%$ , Sigma). Aby bylo možné zabudovat PpIX do granulovaných polymerů a vytvořit z nich vzorky požadovaných rozměrů, bylo nutné nalézt takové rozpouštědlo, v kterém by se v dostatečné koncentraci rozpouštěly jak oba polymery tak i PpIX. Testovaná rozpouštědla a jejich schopnosti rozpouštět polymery i PpIX jsou uvedeny v tabulce 2.1. Nejvhodnějším se ukázal být tetrahydrofuran (THF, pro UV-spektroskopii,  $\geq 99.8\%$ , Fluka).

V 25 ml THF bylo rozpouštěno 3,3 g polystyrenu resp. 3,7 g PMMA. V případě polystyrenu trvalo rozpouštění v ultrazvukové lázni při 50 °C necelé dvě hodiny. PMMA

	PMMA	Polystyren	PpIX	***	vynikající rozpustnost
Aceton	**	*	*	**	dobrá rozpustnost
Chloroform	***	**	×	*	špatná rozpustnost
Diethylether	—	—	×	×	nerozpouští
Tertahydrofuran	**	***	***	—	netestováno

Tabulka 2.1: Rozpustnost PMMA, polystyrenu a PpIX v různých rozpouštědlech.



Obrázek 2.2: Strukturní vzorce monomerních jednotek polystyrenu (vlevo) a PMMA (vpravo).

[PpIX]	Popis
0 $\mu\text{M}$	reference
0,5 $\mu\text{M}$	přirozená koncentrace PpIX v buňce
5 $\mu\text{M}$	koncentrace PpIX v buňkách kultivovaných s ALA v exponenciální fázi
20 $\mu\text{M}$	doplňení koncentrační řady
100 $\mu\text{M}$	koncentrace PpIX v buňkách kultivovaných s ALA ve stacionární fázi

Tabulka 2.2: Koncentrace PpIX ve vyrobených polymerních fóliích, které odpovídají jeho fyziologickým koncentracím v buňkách kultivovaných za různých podmínek.

se v THF rozpouští pomaleji, proto se směs nechala při laboratorní teplotě rozpouštět v uzavřené nádobě 24 hodin. Po rozpouštění polymerů byl přidán 1 ml roztoku PpIX v THF. Směs byla dobře promíchána a nalita na Petriho misky o průměru 9 cm. Po třídenním odpaření rozpouštědla v digestoři za laboratorní teploty vznikly pevné polymerní fólie o průměru Petriho misky a tloušťce  $(0,45 \pm 0,05)$  mm. Pro oba polymery byly vytvořeny vzorky s PpIX o fyziologických koncentracích uvedených v tabulce 2.2. Hodnoty těchto koncentrací jsou přepočítané z hodnot uvedených v článku [52] za předpokladu, že střední objem lidského fibroblastu FEK4 je stejný jako objem krychle o hraně 10  $\mu\text{m}$ .

## 2.4 Tkáňové kultury

Myší fibroblasty linie 3T3 byly kultivovány v médiu DMEM s 10 % fetálního telecího séra při 37 °C ve vlhčené sterilní atmosféře s 95 % vzduchu a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu tří dnů do 80 – 90 % konfluence. Po této době bylo médium nahrazeno médiem s pouze 0,5 % fetálního telecího séra a takto byly kultivovány dalších pět dní. Po této době byly přepraveny z Oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR, kde byla dosavadní část kultivace prováděna, do naší laboratoře, kde jim byl do média přidán roztok penicilin-streptomycin a fotosenzibilizátor (ALA (Sigma), TPPS<sub>4</sub> (Frontier Scientific) nebo TMPyP (Aldrich)) rozpouštěný v PBS, aby jeho celková koncentrace v médiu byla 100  $\mu\text{M}$ . Takto se nechaly dále kultivovat ve tmě po dobu 20 hodin. Další manipulace mimo kultivační box byla prováděna za tlumeného červeného světla, aby

se eliminovala fotoexcitace PS v buňkách. Po odsátí média a pětinásobném opláchnutí buněk PBS (pH = 7, 2) zchlazeným na 5 °C bylo přidáno malé množství tripsinu, který se nechal několik minut působit, než se buňky uvolnily od dna kultivační lahvičky. Dále byly buňky rozvolněny v malém množství kultivačního média, přeneseny do centrifugační zkumavky a doplněny PBS na objem 15 ml. Po 10 min. centrifugaci při 100 g byl odsát supernatant a přidány 2 ml PBS, do něhož byly buňky na vortexu rozptýleny, a celé množství suspenze bylo následně přemístěno do 1 cm spektroskopické kyvety s leštěným dnem, v které se opakovala centrifugace za předchozích podmínek. Tímto postupem bylo docíleno rovnoměrného pokrytí dna spektroskopické kyvety buňkami v tenké vrstvě pod PBS. Toto množství buněk bylo získáno z jedné kultivační lahvičky o velikosti 75 cm<sup>2</sup>.

Pro mikroskopické a fluorescenční snímky byl použit invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX71 s olejovým imerzním objektivem se 100× zvětšením. Mikroskop byl dále doplněn o zpětně osvětlovaný CCD detektor ACTON Spec-10 (Princeton Instruments) chlazený tekutým dusíkem na -120 °C, spektrografem Spectra-Pro 2150i (Princeton Instruments) a diodovým laserem Omicron LDM405-120.CWA.L vyzařujícím na vlnové délce 405 nm. V tomto uspořádání dovoluje tato mikrospektroskopická aparatura kromě pořizování klasických snímků vzorku v procházejícím světle a fluorescenčních snímků i snímání fluorescenčních spekter z různých míst vzorku.

# Kapitola 3

## Experimentální část

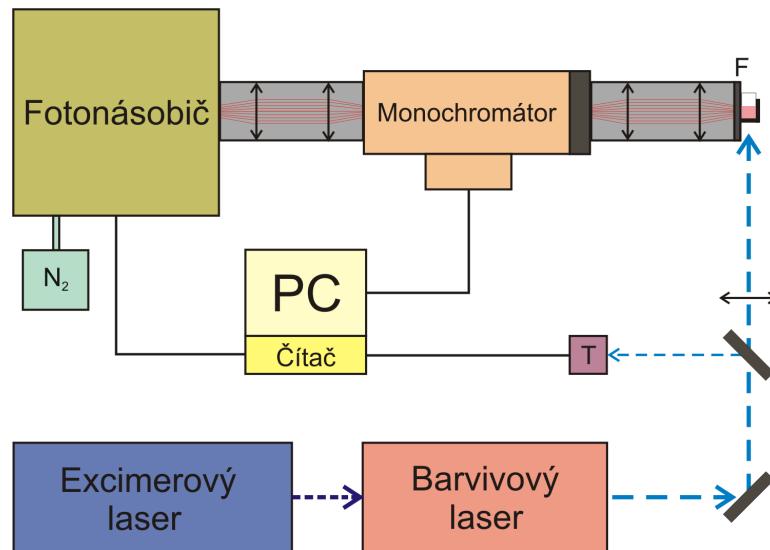
### 3.1 Úprava aparatury

#### 3.1.1 Staré uspořádání aparatury

Dosavadní aparatura vybudovaná na Katedře chemické fyziky a optiky MFF UK umožňovala měření fosforecence fotosenzibilizátorů a  $^1\text{O}_2$  s časovým i spektrálním rozlišením z roztoků ve spektroskopických kyvetách [11]. Bylo tak možné podrobně studovat přenos energie z PS na kyslík a jejich interakci s okolním prostředím. Přestože v tomto uspořádání byla aparatura, vzhledem ke svému spektrálnímu rozlišení 16 nm, poměrně unikátní i ve světovém měřítku, neumožňovala měření z povrchu pevných vzorků. Pro rozšíření detekčních možností této aparatury i na měření z pevných vzorků bylo proto nutné aparaturu k tomuto účelu přizpůsobit.

Jako nejvhodnější se jevilo k tomuto účelu využít optických vláken s luminiscenční sondou. Takové uspořádání by umožňovalo měření z povrchu pevných vzorků, a tudíž by bylo možné se pomocí takto upravené aparatury posunout ve výzkumu PDT dále k *in vivo* systémům, přičemž by byla zachována možnost měření z roztoků. Dosud zkoumané roztoky PS s různými přidanými biomolekulami jsou sice vhodným modelovým systémem, ale jsou zároveň podstatně vzdáleny skutečným podmínkám PDT. Možnost monitorování fosforecence  $^1\text{O}_2$  i fosforecence fotosenzibilizátorů s časovým i spektrálním rozlišením z tkáňových kultur a následně i přímo z tumoru laboratorních zvířat by umožnila detailní studium procesů probíhajících při PDT *in situ*.

Původní uspořádání aparatury je na obrázku 3.1. Jako zdroj excitačních pulzů je zde použit barvivový laser FL1000 (Lambda Physik) čerpaný excimerovým laserem ATLEX-500i (ATL Lasertechnik). Společně poskytují světelné pulzy o délce  $\sim 6$  ns s energií  $\sim 15 \mu\text{J}$  a opakovací frekvencí až 500 Hz. Vlnová délka excitačních pulzů je pro měření s porfyriny volena na 420 nm (Soretův pás), které se dosahuje použitím laserového barviva Stilben 3. Tyto pulzy jsou fokusovány do křemenné luminiscenční kyvety o rozměru  $1 \times 1$  cm přes její opticky leštěné dno. Luminiscenční stopa, vznikající v kyvete průchodem záření, je pomocí světlosběrného systému tvořeného dvěma čočkami zobrazována s dvojnásobným zvětšením na vstupní štěrbinu vysoce světelného monochromátoru Jobin-Yvon H20IR. Mezi kyvetou a světlosběrným systémem je umístěna

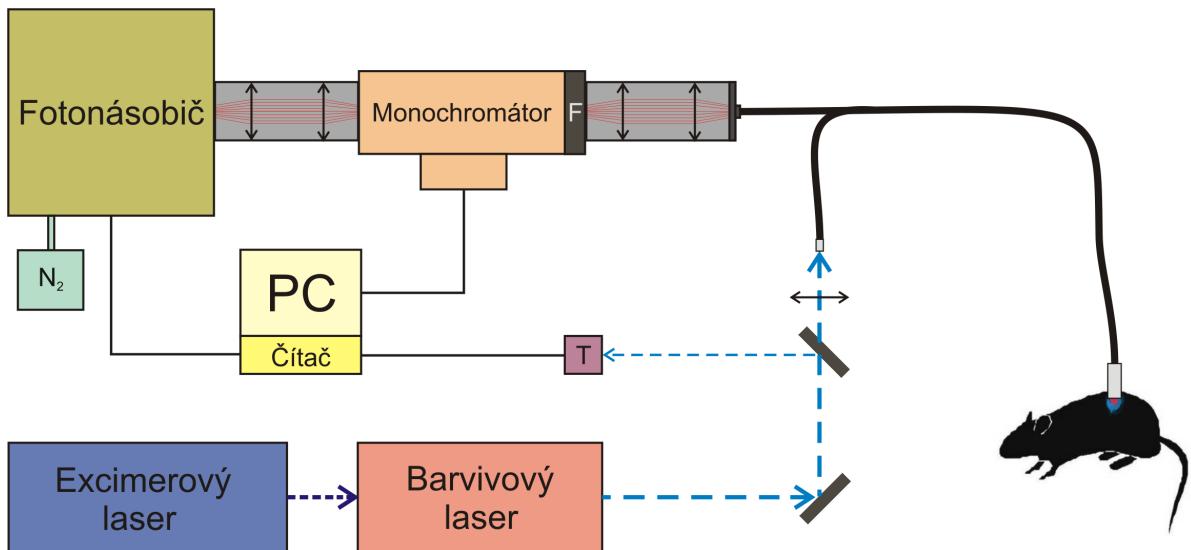


Obrázek 3.1: Schéma dosavadní aparatury pro detekci singletního kyslíku z roztoků ve spektroskopických kyvetách.

dvojice filtrů Schott RG7 propouštějící záření o vlnových délkách větších než 750 nm. Ty slouží hlavně k odfiltrování rozptyleného excitačního záření a rychlé fluorescence vzorku. Z monochromátoru je záření zobrazováno další dvojicí čoček na fotokatodu fotonásobiče Hamamatsu R5509. Ten je citlivý až do blízké infračervené oblasti, a je proto nutné ho chladit na nízké teploty a zabránit tak generaci temných pulzů vlivem teplotních excitací. Chlazení je prováděno tekutým dusíkem, jehož průtok fotonásobičem zajišťuje řídící jednotka, a tím udržuje jeho fotokatodu na konstantních  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pulzy generované fotonásobičem jsou nejprve zesíleny širokopásmovým předzesilovačem Becker–Hickl HFAC –26 dB a dále jsou přivedeny na vstup multikanálového čítače Becker–Hickl MSA 200. Ten má časové rozlišení 5 ns na kanál a jeho časová základna je spouštěna pulzem z rychlé PIN fotodiody, na kterou je přiváděna malá část excitačního záření. Signál z PIN diody je zároveň možné sledovat na osciloskopu, pro kontrolu tvaru a intenzity excitačních pulzů.

### 3.1.2 Světlovody

Původním záměrem při přestavbě aparatury bylo odstranit celý světlosběrný systém zobrazující luminiscenční stopu z kyvety na vstup monochromátoru a nahradit ho dvouramenným světlovodem s luminiscenční sondou. Pro tento účel byl zakoupen světlovod dodávaný firmou Jobin-Yvon. Tento světlovod tvoří 15 excitačních vláken a 18 detekčních vláken o průměru 200  $\mu\text{m}$ , která jsou v náhodném rozmištění uspořádána do kruhu o průměru 1,6 mm a tvoří tak luminiscenční sondu (viz obr. 3.3). Na druhém konci jsou excitační vlákna uspořádána do kruhu o průměru 1 mm a detekční vlákna jsou uspořádána do obdélníkového tvaru o rozměrech  $4,4 \times 0,2 \text{ mm}$ . Takovéto uspořádání detekčních vláken je přímo určeno pro připojení do místa vstupní štěrbiny monochromátoru a současně je jejich numerická apertura přispůsobena numerické apertuře použitého



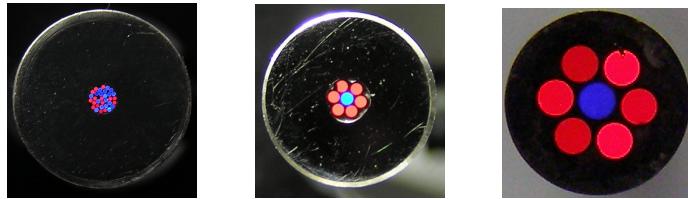
Obrázek 3.2: Schéma nového uspořádání apratury pro detekci singletního kyslíku i z pevných vzorků.

monochromátoru Jobin-Yvon H20IR. Původní filtry RG7 čtvercového tvaru umístěné na vstupu světlosběrného systému byly nahrazeny kulatými filtry (Edmund Optics RG780), které byly umístěny do držáku kulatých palcových filtrů za vstupní štěrbinu monochromátoru.

Během prvních pokusů s takto upravenou aparaturou se ukázalo, že není možné účinně navázat laserový svazek do vstupu excitačních vláken. Přestože byl konec excitačních vláken připevněn k 3D mikroposuvu a bylo zároveň možné libovolně měnit náklon excitačních vláken vůči laserovému svazku, nepodařilo se nalézt takovou polohu, ve které by laserové záření vstupovalo do všech excitačních vláken s dostatečnou intenzitou. Měření výkonu svazku před vstupem a na výstupu světlovodu potvrdilo, že navázání je velmi neefektivní (účinnost  $\sim 20\%$ ) a výkon na konci světlovodu je pro potřeby měření příliš nízký.

Po neúspěšných pokusech se světlovodem Jobin-Yvon jsme se rozhodli vyzkoušet dvouramenný světlovod FCR-7IR400-2-ME od firmy Avantes. Ten využívá vlákna, která mají  $400\text{ }\mu\text{m}$  v průměru a jejich zakončení v luminiscenční sondě jsou uspořádána tak, že jedno excitační vlákno je obklopeno šesti vlákny detekčními (viz obr. 3.3). Excitační i detekční rameno světlovodu je v tomto případě zakončeno konektorem SMA, který je rozšířeným typem konektoru ve vláknové optice. Ke konci excitačního vlákna světlovodu je možné přes konektor SMA připevnit čočku sloužící ke kolimaci excitačního záření do jediného excitačního vlákna. Pomocí této komerčně dostupné čočky je možné zefektivnit navázání excitačního záření do světlovodu a dosáhnout tak  $\sim 80\%$  účinnosti navázání. Takové navázání již plně dostačuje našim požadavkům na energii laserového záření na konci excitačního vlákna.

Problém tohoto světlovodu byl ale v tom, že nebylo kam připojit detekční rameno světlovodu. To je rovněž zakončené konektorem SMA, ve kterém je šest detekčních vláken uspořádaných podobně, jako na konci s luminiscenční sondou, jen s tím rozdílem,



Obrázek 3.3: Světlovody Jobin-Yvon (vlevo), Avantes (uprostřed) a Ocean Optics (vpravo).

že jedno z vláken je přemístěno do středu mezi ostatní vlákna. Tím je dáno, že detekční signál vycházející z vláken tvoří mírně asymetrický kužel. Aby bylo možné připojit detekční rameno světlovodu k detekční části aparatury, byl na své původní místo vrácen světlosběrný systém a jeho původní čelo s držákem kyvet a čtvercových filtrů bylo nahrazeno novým čelem s držákem kulatých palcových filtrů a vstupem s konektorem SMA. Ukázalo se, že takové řešení je přijatelné, přestože dvojnásobné zvětšení světlosběrného systému je při použití světlovodu s tak velkou výstupní plochou příliš velké, a tudíž se část luminiscenčního signálu ztrácí na vstupní štěrbině monochromátoru.

Posledním zakoupeným světlovodem byl dvouramenný světlovod R600-7-VIS-125F od firmy Ocean Optics, který je velmi podobné konstrukce jako předchozí světlovod od firmy Avantes, jen s tím rozdílem, že využívá vlákna o průměru 600  $\mu\text{m}$ . Pomocí tohoto světlovodu by se zvýšila detekční plocha vláken a tím i intenzita detekovaného signálu. Prozatím toho bohužel není možné využít, protože s větším průměrem vláken se zvětšuje i jejich obraz na vstupní štěrbině monochromátoru a tím se zvyšuje i množství signálu, který se na ní ztrácí. Bude proto nutná konstrukce zobrazovacího systému 1:1 s odpovídající numerickou aperturou.

Při optimalizaci sběru signálu se ukázalo, že intenzita sbíraného signálu je silně závislá na vzdálenosti sondy od vzorku. Při použití vzorku v křemenné kyvetě s leštěným dnem (Hellma), byla optimální vzdálenost sondy ode dna kyvety stanovena na 2 mm. Tato hodnota je zřejmě dána numerickou aperturou křemenných vláken, a proto se pro světlovody Avantes a Ocean Optics neliší.

### 3.1.3 Filtry

Již během prvních měření s využitím světlovodů se ukázalo, že měření luminiscence z povrchu pevných vzorků s sebou nese komplikace v podobě vzorkem odraženého a rozptýleného excitačního záření. Toto záření se vlivem konfigurace excitace a sběru luminiscenčního signálu dostává snadno do detekční části aparatury, kde dopadá na filtry a budí v nich luminiscenci, která se časově i spektrálně překrývá s měřeným signálem, a tudíž výrazně narušuje až znemožňuje měření luminiscenčních kinetik.

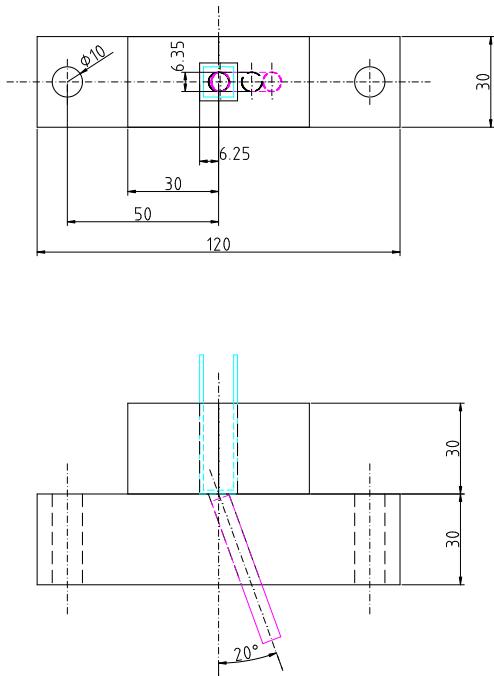
Tento problém lze v principu řešit třemi způsoby:

1. snížením intenzity excitačního záření dopadajícího na filtry
2. neluminiskujícími filtry
3. optickým oddělením luminiscence filtrů od signálu

Problém s luminiskujícími filtry by bylo nejspíše možné řešit pomocí holografického notch filtru blokujícího záření na vlnové délce excitačního záření. Holografický notch filtr funguje na principu interference, a proto by se dalo očekávat, že jeho luminiscence by mohla být zanedbatelná. Kdyby se takový filtr umístil před dosud užívané filtry, výrazně by se tak snížila intenzita excitačního záření, která na ně dopadá a budí v nich nežádoucí luminiscenci. Toto řešení bohužel v našem případě není možné, jelikož klasický holografický notch filtr nepropouští kromě zvolené vlnové délky rovněž i všechny celočíselné násobky frekvence a celočíselné násobky vlnové délky zeslabuje. To by v našem případě znamenalo, že kromě odfiltrování excitačního záření na 420 nm, by filtr současně zeslaboval i podstatnou část luminiscenčního signálu  ${}^1\text{O}_2$  se středem na 1278 nm, případně i fosforescenci PS emitovanou často na dvojnásobku excitační vlnové délky. Určitou možností by se mohlo jevit využití tzv. Rugate notch filtru, což je speciální typ holografického filtru, který blokuje pouze požadovanou vlnovou délku a na násobcích této vlnové délky záření bez problémů propouští. Toho je docíleno speciálním postupem nanášení dielektrických vrstev, v kterých se index lomu mění spojitě. Takové filtry jsou komerčně dostupné pouze na často využívaných laserových čarách, což ale není náš případ. Firmy zabývající se výrobou těchto filtrů jsou principiálně schopny vyrobit filtr dle požadavků zákazníka, ale cena takového filtru vyrobeného v jednom exempláři by byla neúměrně vysoká.

Určitou možností, jak snížit intenzitu excitačního záření dopadajícího na filtry, by mohlo být umístění filtrů až za monochromátor, který by excitační záření účinně od-filtroval. To však z obdobných důvodů, jako v předchozím případě, také není možné. V námi používaném monochromátoru je totiž jako disperzní prvek použita mřížka, která je při měření luminiscence  ${}^1\text{O}_2$  nastavena na 1278 nm, což je příliš blízko trojnásobku excitační vlnové délky 420 nm a excitační záření by tak mohlo procházet skrze monochromátor svým třetím rádem. Navíc by stejný problém byl i s relativně silnou fluorescencí PS, která má v případě námi používaných porfyrinů maximum v pásmu okolo 650 nm, tedy na polovičních vlnových délkách fosforecence  ${}^1\text{O}_2$ . Navíc zbytková luminiscence filtrů by již nebyla dále nijak spektrálně oddělena a většina z ní by dopadala přímo na fotokatodu fotonásobiče. Jedinou šancí, jak využít takového usporádání, by bylo použít monochromátor obsahující místo mřížky hranol. To by však znamenalo zásadní zásah do aparatury s nejistým úspěchem.

Jako přijatelnější řešení se ukázalo naklonění světlovodu vůči vzorku tak, aby se veškeré přímo odražené excitační záření již nedostalo zpět k sondě a neproniklo tak do detekčních vláken. V případě světlovodu Avantes při pracovní vzdálenosti středu sondy od vzorku 2 mm vychází minimální úhel naklonění světlovodu vůči vzorku pro splnění této podmínky na  $20^\circ$ . Vyrobený držák světlovodu, jehož nákres je na obrázku 3.4, má



Obrázek 3.4: Nákres držáku světlovodu Avantes, který zajišťuje jeho optimální vzdálenost a náklon vůči vzorku.

ve skutečnosti náklon  $21^\circ$ . Výrazně větší náklon by už nevykazoval o tolik nižší sběr excitačního záření, aby se to vyplatilo vzhledem k výraznému snížení účinnosti sběru signálu. Kontrolní měření ukázalo, že naklonění světlovodu o  $21^\circ$  má jen malý vliv na sběr užitečného signálu, ale má výrazný vliv na snížení luminiscence filtrů. Držák po odstranění horního dílu, fungujícího jako držák kyvet, může sloužit i pro položení fólií, kultivačních nádob nebo laboratorních zvířat.

V původním uspořádání aparatury byly použity dva filtry RG7 čtvercového tvaru, které v novém uspořádání nešlo použít. Proto bylo postupně zakoupeno šest typů filtrů od různých výrobců i různých technologií výroby, včetně nových filtrů RG7 v požadovaném rozměru:

- Edmund Optics RG780 a RG715
- Thorlabs 750 nm (interferenční)
- Edmund Optics TECHSPEC® 450 nm a 500 nm
- Schott RG7 — Vývojové dílny AV ČR Turnov

Z těchto filtrů bylo vytvořeno osm různých kombinací a byla změřena jejich luminiscence s časovým i spektrálním rozlišením (viz obr. 3.1). Toto měření bylo provedeno se světlovodem Avantes a místo vzorku byla použita kyveta s THF, která sloužila k odrazu excitačního záření do detekční části aparatury. Jako nejlepší byla vybrána

kombinace dvou filtrů RG7 z Vývojových dílen AV ČR Turnov s předřazeným filtrem TECHSPEC® s hranou na 450 nm od Edmund Optics.

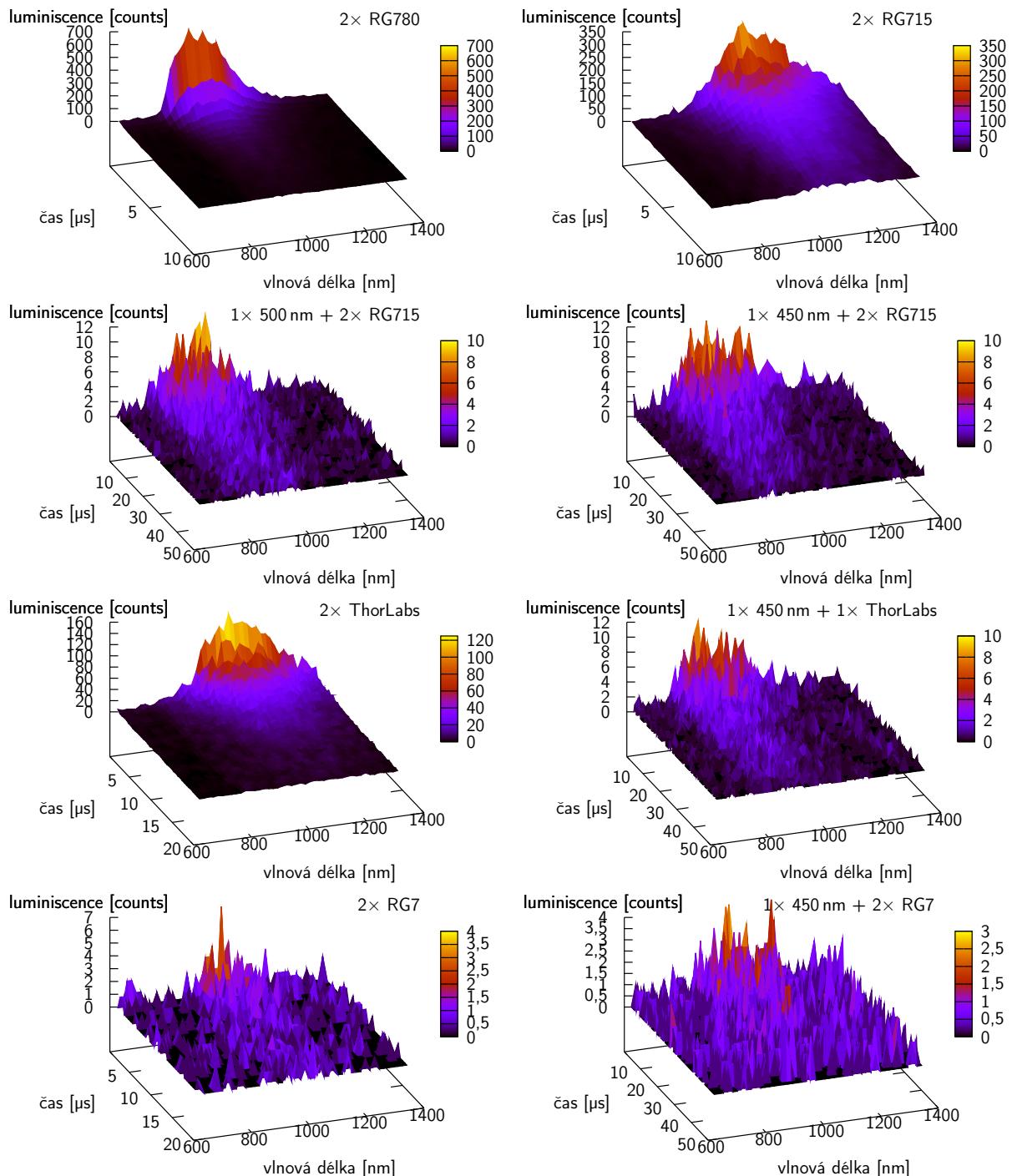
Poslední možností, jak je možné v principu řešit nežádoucí luminiscenci filtrů, je optické oddělení signálu od luminiscence filtrů. V našem případě by bylo možné využít toho, že signál vycházející ze světlovodu a dopadající na filtry, má poměrně malou divergenci a naopak luminiscence vycházející z filtru je emitována do všech směrů. Umístěním apertury do vhodné vzdálenosti od filtrů, by bylo možné z velké části odstínit luminiscenci filtrů, která by se ztrácela na cloně, zatímco odfiltrovaný signál ze světlovodu by procházel dál do detekční části skrze aperturu. Účinnost takového uspořádání nebyla ověřena, jelikož předchozí metody eliminace luminiscence filtrů se zdály být dostatečné.

### 3.1.4 Nové uspořádání aparatury

Schéma aparatury po úpravě je na obrázku 3.2. Hlavním změnou oproti předchozímu uspořádání je výměna předního čela tubusu světlosběrného systému. Na tom byl doposud z vnitřní strany umístěn držák čtvercových filtrů a z vnější strany pak držák kyvet. Nyní je nahrazen čelem s držákem kulatých palcových filtrů a konektorem SMA, na který je zvenku připojeno detekční rameno světlovodu Avantes. Původní filtry byly nahrazeny kruhovými filtry RG7 o průměru 1 palec z vývojových dílen AV ČR v Turnově a umístěny za vstupní štěrbiny monochromátoru. Navíc byl do čela světlosběrného systému přidán filtr TECHSPEC® 450 nm filtrující excitační záření a snižující tak celkovou luminiscenci filtrů. Luminiscenční sonda je navíc umístěna do speciálního držáku zajišťujícího optimální vzdálenost a naklonění světlovodu vůči vzorku.

Vzhledem k tomu, že světlosběrný systém před monochromátorem byl navržen pro dvojnásobné zvětšení zobrazované luminiscenční stopy, ale stopa ze světlovodu Avantes je větší, tak se zobrazená stopa do štěrbiny před monochromátorem nevešla celá a tím se ztrácel signál. Protože použité štěrbiny byly nejšírsí, jaké se k tomuto monochromátoru dodávají, byly tyto štěrbiny při měření biologických vzorků s velmi redukovaným luminiscenčním signálem z vstupu i výstupu monochromátoru odstraněny. Tím se získal signál ztrácející se na vstupní štěrbině a navíc se snížením spektrálního rozlišení získal i signál  $^1\text{O}_2$  z vlnových délek na okrajích pásu jeho fosforecence.

Pro doladění celé aparatury by bylo vhodné přizpůsobit světlosběrný systém před monochromátorem velikosti stopy a numerické apertuře světlovodu Avantes resp. Ocean Optics, který by měl navíc vlákna o větším průměru. Tím by bylo docíleno minimálních ztrát na signálu a stejného spektrálního rozlišení, jako u původního uspořádání aparatury.



Tabulka 3.1: Luminiscence různých kombinací filtrů.

## 3.2 TMPyP v PBS

TMPyP je kladně nabitý hydrofilní PS, který vzhledem ke své afinitě k záporně nabitém nukleovým kyselinám představuje potenciálně velmi zajímavý PS. Vzhledem ke svým příznivým vlastnostem byl TMPyP v poslední době použit k detekci singletního kyslíku z jednotlivých buněk [62], ze suspenzí lidských fibroblastů [3] a dokonce byla prezentována i možnost jeho dvoufotonové excitace [16].

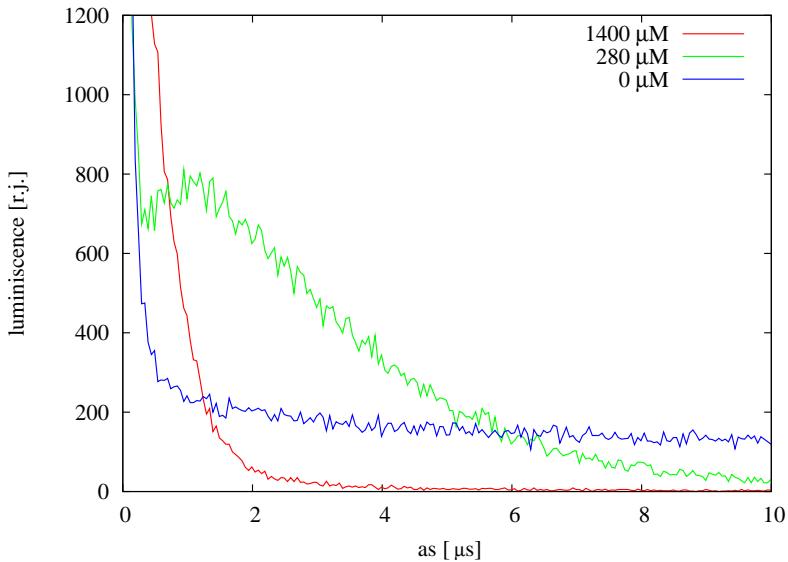
Byla naměřena fosorescence TMPyP a jím generovaného singletního kyslíku s časovým i spektrálním rozlišením v širokém rozsahu koncentrací TMPyP i kyslíku rozpuštěného ve vzorcích. To umožnilo srovnání s dalším hydrofilním PS TPPS<sub>4</sub>, který je na rozdíl od TMPyP nabitý záporně a jehož podrobná spektroskopická studie byla publikována již dříve [11].

Kvůli prozkoumání aggregačních vlastností TMPyP byla naměřena jeho absorpcní spektra. Zatímco v případě TPPS<sub>4</sub> se absorbance na 420 nm začala odchylovat od Lambert-Beerova zákona již při koncentraci 30 µM, v případě TMPyP vykazovala absorbance perfektní lineární závislost v celém rozsahu koncentrací (5 – 400 µM) s molárním extinkčním koeficientem  $(2,2 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Ani následná fluorescenční měření žádnou agregaci nenaznačovala.

Poloha hlavního fosorescenčního pásu TMPyP s maximem okolo 810 nm se s koncentrací TMPyP nemění. Nárůst koncentrace kyslíku nemá vliv na tvar spektra, jen celková intenzita fosorescence je menší. Při odstranění kyslíku se objeví vedlejší pás s maximem na 1022 nm a celková intenzita fosorescence se také sníží. Toto chování kopíruje chování TPPS<sub>4</sub>, kde jsou obě maxima posunuta na 820 nm resp. 1060 nm.

Zatímco kinetika fosorescence tripletních stavů TMPyP vykazovala při nižších koncentracích standardní jednoexponenciální pokles, při vyšších koncentracích u vzduchem saturovaných vzorků vykazovala kinetika komplikovanější průběh, v němž byl jasně patrný nárůst fosorescence a až posléze očekávaný jednoexponenciální pokles (viz obr. 3.5). Tento průběh byl pozorován již dříve Frederiksenem *et al.* [16], kde je vysvětlen vznikem komplexu s přenosem náboje (CT-komplexu) při vyšších energiích laserového záření interagujícího s tripletními stavům fotosenzibilizátoru a molekulami kyslíku. To, že nebylo takové chování pozorováno v případě dusíkem saturovaných vzorků, poukazuje na oprávněnost této interpretace. V případě kyslíkem saturovaných vzorků výše zmíněný jev pozorovatelný není, jelikož zřejmě dojde ke zhášení tripletních stavů kyslíkem dříve, než může dojít k vytvoření komplexu.

Pro kinetiku fosorescence TMPyP ze vzorků v rovnováze se vzduchem se bohužel nepodařilo najít vhodný matematický popis, proto byly nafitovány jen jejich jednoexponenciální poklesy. Přestože žádná z našich měření nenaznačuje agregaci TMPyP, jeho dobu života fosorescence se se zvyšující koncentrací prodlužuje (viz obr. 3.6). Zvyšování dob života tripletních stavů z  $(1,6 \pm 0,2) \mu\text{s}$  na semi-saturovanou úroveň  $2,5 \mu\text{s}$  u TMPyP v rozsahu koncentrací 5 – 100 µM bylo pozorováno i v případě TPPS<sub>4</sub> (z  $1,8 \mu\text{s}$  na  $3 \mu\text{s}$ ). Podobnost chování aggregujícího i neaggregujícího PS vede k otázce, zda prodlužování dob života jejich tripletních stavů se zvyšující se koncentrací není v obou případech způsobeno výše zmíněným CT komplexem. Důvod, proč při dřívějších měřeních TPPS<sub>4</sub> nebyly nárůsty fosorescence patrné, je zřejmě ten, že při měřeních



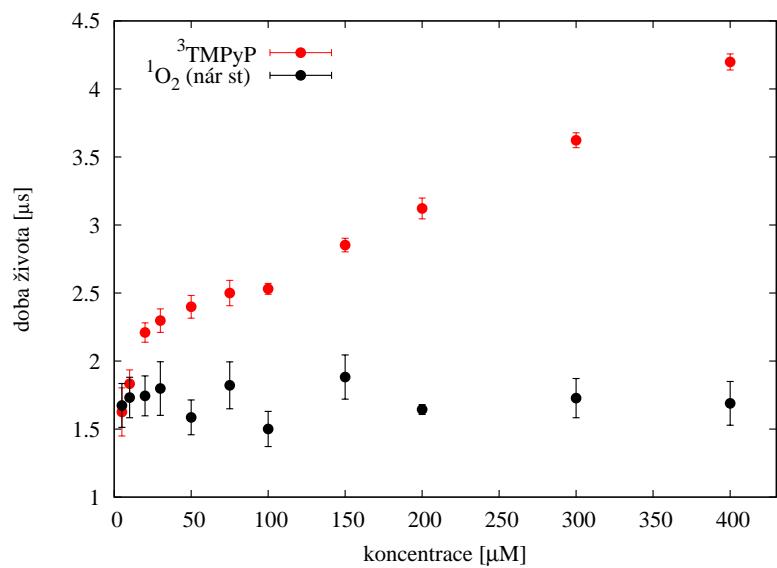
Obrázek 3.5: Kinetiky fosforecence  $^3\text{TmPyP}$  měřené z  $200 \mu\text{M}$  roztoku  $\text{TmPyP}$  v PBS pro různé koncentrace v něm rozpuštěného kyslíku na vlnové délce  $1022 \text{ nm}$ .

$\text{TPPS}_4$  byl použit laser s nižším špičkovým výkonem, a tudíž jev nebyl natolik silný, aby byly nárušty fosforecence patrné. Další zvyšování dob života s koncentrací od  $100 \mu\text{M}$  do  $400 \mu\text{M}$  bez známky saturace jako u  $\text{TmPyP}$  ale v případě  $\text{TPPS}_4$  pozorováno nebylo.

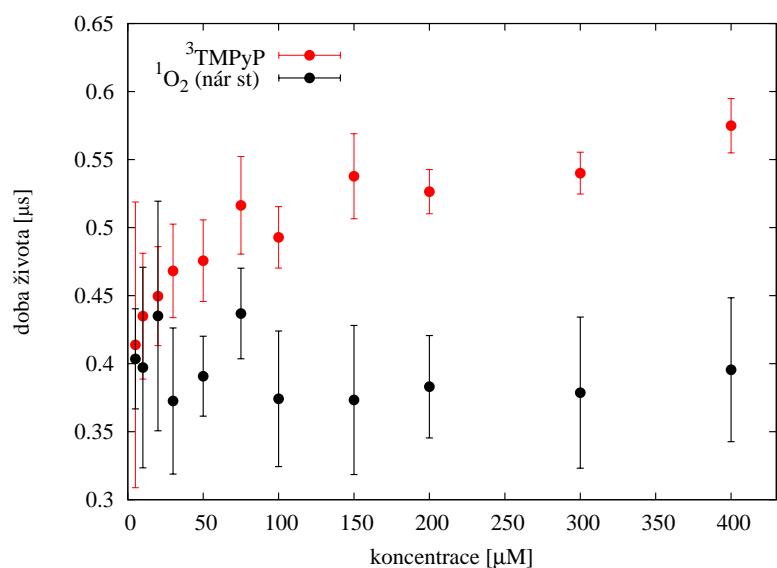
V případě vzorků nasycených kyslíkem stačil pro popis kinetik fosforecence tripletních stavů  $\text{TmPyP}$  jednoexponenciální pokles. Závislost dob života na koncentraci v tomto případě koresponduje s pozorovaným prodlužováním dob života u  $\text{TPPS}_4$ , přičemž od koncentrace  $150 \mu\text{M}$  se dále doby života neprodlužují (viz obr. 3.7). U dusíkem nasycených vzorků bylo pro popis fosforecence tripletních stavů  $\text{TmPyP}$  potřeba dvouexponenciálního popisu a opět bylo toto chování podobné jako v případě  $\text{TPPS}_4$ .

Koncentrace  $\text{TmPyP}$  ani koncentrace rozpuštěného kyslíku neměla vliv na tvar ani polohu maxima fosforecenčního spektra  $^1\text{O}_2$ , které se nachází na  $1278 \text{ nm}$ . Kinetiky fosforecence  $^1\text{O}_2$  bylo možné popsat konvolucí jednoexponenciálního náruštu a jednoexponenciálního poklesu. Doby náruštu byly nezávislé na koncentraci  $\text{TmPyP}$  pro vzorky v rovnováze se vzduchem i pro vzorky nasycené kyslíkem (viz obr. 3.6 a 3.7). Hodnota náruštu  $^1\text{O}_2$   $(1,7 \pm 0,1) \mu\text{s}$  dobře odpovídá době života tripletních stavů  $\text{TmPyP}$  pro nejnižší měřené koncentraci vzorků v rovnováze se vzduchem. Obdobná shoda panuje i pro nejnižší koncentraci vzorků saturovaných kyslíkem, kde je doba náruštu  $(0,39 \pm 0,02) \mu\text{s}$ . Obdobné chování náruštu fosforecence  $^1\text{O}_2$  bylo dříve pozorováno i u  $\text{TPPS}_4$ .

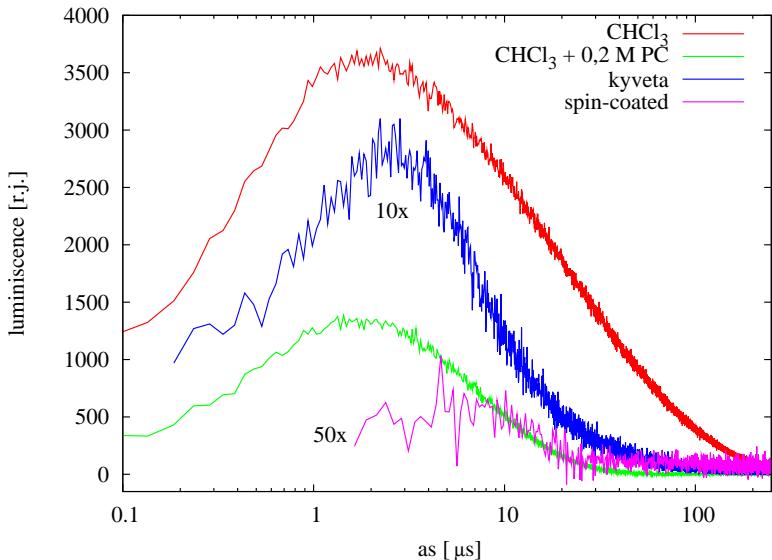
Doba života  $^1\text{O}_2$  u kyslíkem saturovaných vzorků je nezávislá na koncentraci  $\text{TmPyP}$  a její průměrná hodnota je  $(3,56 \pm 0,05) \mu\text{s}$ , což je ve velmi dobré shodě s  $(3,5 \pm 0,1) \mu\text{s}$  u  $\text{TPPS}_4$ . V případě vzorků v rovnováze se vzduchem je situace komplikovanější. Zde doba života  $^1\text{O}_2$  s hodnotou  $(3,9 \pm 0,1) \mu\text{s}$  je na koncentraci  $\text{TmPyP}$  nezávislá pouze



Obrázek 3.6: Koncentrační závislost dob života tripletních stavů TMPyP ( $^3\text{TMPyP}$ ) a nárůstů fosforescence  $^1\text{O}_2$  pro vzorky v rovnováze se vzduchem.



Obrázek 3.7: Koncentrační závislost dob života tripletních stavů TMPyP ( $^3\text{TMPyP}$ ) a nárůstů fosforescence  $^1\text{O}_2$  pro vzorky nasycené kyslíkem.



Obrázek 3.8: Kinetiky luminiscence singletního kyslíku generovaným TPP v chloroformu a prostředích obsahujících PC.

do koncentrace 150  $\mu\text{M}$ . Tato hodnota je blízko hodnotě  $(3,7 \pm 0,1)$   $\mu\text{s}$  u TPPS<sub>4</sub>. Zkracování dob života  $^1\text{O}_2$  u kyslíkem saturovaným vzorků vůči vzorkům v rovnováze se vzduchem odpovídá zhášení singletního kyslíku singletním kyslíkem [12]. U koncentrací přesahujících 150  $\mu\text{M}$  dochází k prodlužování dob života  $^1\text{O}_2$  s koncentrací TMPyP a dosahuje hodnoty 5,3  $\mu\text{s}$  pro koncentraci 400  $\mu\text{M}$ .

Bыло показано, что TPPS<sub>4</sub> и TMPyP демонстрируют в растворах PBS при pH = 7,4 очень схожие кинетические, спектральные и фотосенсибилизационные свойства в широком диапазоне концентраций. Установленные различия были обнаружены даже при высоких концентрациях PS. Подробный анализ полученных спектроскопических свойств TMPyP можно найти в статье, опубликованной в Journal of Molecular Structure [10].

### 3.3 TPP v prostředí fosfatidylcholinu

Většina hydrofobních PS se převážně lokalizuje v hydrofobních oblastech buněčných membrán tvořených lipidy. Je známo, že lipidy výrazně ovlivňují dobu života singletního kyslíku. Otázkou zůstává, do jaké míry je lipidy ovlivněny i přenos energie z tripletních stavů fotosenzibilizátorů na singletní kyslík. Na tuto otázkou se nejdříve snažili odpovědět v naší laboratoři studiem chování lipofilních PS obsažených v liposomech [41, 42]. Pro lepší pochopení procesů přenosu energie z tripletních stavů PS na kyslík v prostředí lipidů bylo vhodné porovnat výsledky získané z liposomů s výsledky měření z méně uspořádaných systémů PC, než jsou liposomy, v kterých je PC velmi organizovaný. Nejdříve bylo takové měření provedeno s TPP rozpuštěným v chloroformu obsahujícím v různých koncentracích PC. Později pak byla snaha provést měření jen z čistých lipidů obsahujících TPP odpařením chloroformu z kvetly. Tyto

pokusy nebyly zcela úspěšné, jelikož se nepodařilo chloroform odpařit do té míry, aby již neovlivňoval chování TPP a kyslíku v lipidech. Další nevýhodou takto připravených lipidových vzorků s TPP byla jejich značná nehomogenita.

Až při úpravách aparatury pro měření z pevných vzorků se naskytly nové možnosti měření, tedy i rozsáhlejší možnosti charakteru vzorku, který se již nemusel nacházet v kyvetě. Vzhledem k přetrvávajícím problémům s luminiskujícími filtry, byla kvůli snížení intenzity excitačního záření dopadajícího na filtry zvolena alternativní metoda měření. Ta využívá světlovodu pouze k excitaci vzorku připraveného metodou spin-coating, zatímco detekce signálu probíhá z boční strany sklíčka pomocí původního světlosběrného systému, jak již bylo popsáno v kapitole 2.2.

Na obrázku 3.8 jsou vidět kinetiky fosforecence  $^1\text{O}_2$  generovaného TPP v čistém chloroformu i s přidanými lipidy. V obrázku jsou rovněž vynesena data získaná z kyvety po nedokonalém odpaření chloroformu a ze vzorku obsahujících jen TPP a fosfatidylcholin. Signály ze vzorků s odstraněným chloroformem byly výrazně slabší, proto jsou v obrázku příslušně vynásobeny pro lepší srovnání. V případě vzorku připraveného metodou spin-coating byl signál velmi slabý a začátek kinetiky  $^1\text{O}_2$  v obrázku chybí, jelikož ho překrývala luminiscence filtrů.

Pokles fosforecence TPP v chloroformu bez přidaného PC vykazuje jednoexponenciální pokles s dobou života  $(0,52 \pm 0,03) \mu\text{s}$ . V případě vzorků obsahující navíc PC v rozsahu koncentrací  $50 - 200 \text{ mM}$  se oproti vzorkům bez PC snížila celková intenzita fosforecence TPP a její kinetika začala vykazovat dvouexponenciální průběh. Zatímco zvyšování koncentrace PC ve vzorcích nemělo na celkovou intenzitu fosforecence téměř vliv, mělo vliv na zvyšování poměrného zastoupení delší z komponent dvouexponenciálního poklesu ( $7 - 63\%$ ). Doba života kratší z komponent odpovídá přibližně době života jednoexponenciálního poklesu bez přidaného PC, delší z nich má dobu života  $\sim 1 \mu\text{s}$ . Doby života obou komponent vykazují slabý pokles s narůstající koncentrací PC, což naznačuje zhášení tripletních stavů TPP fosfatidylcholinem.

Kinetiky  $^1\text{O}_2$  nebylo možné ani v jenom případě uspokojivě nafitovat modelem 1.31, který odpovídá konvoluci jednoexponenciálního nárůstu a jednoexponenciálního poklesu. Nejjednodušší možná funkce popisující v dobrém přiblížení získané kinetiky, byla konvoluce jednoexponenciálního nárůstu a lineární kombinace dvou jednoexponenciálních poklesů. Přestože dvouexponenciální model dob života tripletních stavů TPP s přidaným PC by naznačoval i dvouexponenciální nárůst fosforecence  $^1\text{O}_2$ , získané kinetiky nebylo bohužel možné spolehlivě nafitovat takto komplexním modelem. Proto doby nárůstu odpovídají pouze efektivním hodnotám. Doby nárůstu vykazují slabé prodlužování s koncentrací PC ( $0,34 - 0,59 \mu\text{s}$ ), což odpovídá vyššímu zastoupení delší komponenty tripletních stavů TPP se vzrůstající koncentrací PC. Zatímco hodnota první komponenty dvouexponenciálního poklesu zůstává přibližně stejná ( $\sim 7 \mu\text{s}$ ) pro všechny vzorky obsahující PC, její poměrné zastoupení se se zvyšující koncentrací PC zvyšuje ( $22 - 76\%$ ). Naopak delší z komponent se během zvyšování koncentrace PC zkracuje z  $78 \mu\text{s}$  na  $14 \mu\text{s}$ .

Kinetiky fosforecence TPP získané ze vzorku z kyvety po nedokonalém odpaření chloroformu vykazují ještě komplikovanější charakter a pro jejich nafitování bylo potřeba trojexponenciálního poklesu. Výsledné doby života všech tří komponent byly

výrazně delší než v případě roztoků TPP a PC v chloroformu (( $2,45 \pm 0,18$ )  $\mu$ s (24 %), ( $10,7 \pm 1,3$ )  $\mu$ s (17 %) a ( $84,8 \pm 8,8$ )  $\mu$ s (58 %)). To je dáno výrazně nižší rozpustností a nižším difuzním koeficientem kyslíku v lipidech. Proto je zhášení tripletních stavů TPP o tolik pomalejší než v chloroformu. Ze stejného důvodu je nižší i celková intenzita luminescence  $^1\text{O}_2$ . Doba nárůstu  $^1\text{O}_2$  ( $1,1 \pm 0,1$ )  $\mu$ s dobře odpovídá trendu prodlužování těchto dob se zvyšující se koncentrací lipidů v roztocích. Doby života  $^1\text{O}_2$  zde opět odpovídají dvouexponenciálnímu poklesu s první komponentou ( $5,9 \pm 0,6$ )  $\mu$ s (58 %) a druhou ( $34,8 \pm 4,1$ )  $\mu$ s (42 %).

Signál získaný ze vzorku, který byl připraven metodou spin coating a obsahoval nejnižší obsah chloroformu ze všech předchozích vzorků, byl také ze všech nejslabší. Vzhledem k velmi nízkému signálu z tohoto vzorku a tím pádem i dlouhé době akumulace, bylo možné obdržet pouze přibližné časové konstanty. Přesto doba života nárůstu fosorescence  $^1\text{O}_2$  3,8  $\mu$ s a poklesu 6,4  $\mu$ s (36 %) a 9,0  $\mu$ s (64 %) sledují dosud nastíněné trendy v dobách života měnících se v závislosti na koncentraci PC.

Bыло ukázáno, že PC zhásí jak singletní kyslík, tak tripletní stavu TPP. Rovněž se ukázalo, že PC chrání TPP a brání tvorbě jeho fotoproduktu v chloroformu, což je zřejmě způsobeno zhášením singletního kyslíku fosfatidylcholinem. Publikace shrnující tyto výsledky je momentálně v recenzním řízení [9].

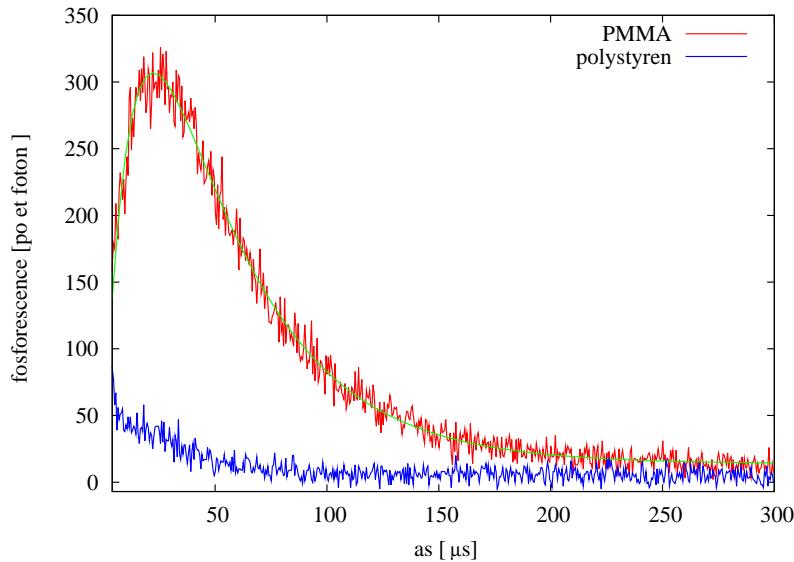
### 3.4 PpIX v polymerních fóliích

Pro potřeby prvních měření při optimalizaci aparatury a následného využití jakožto standardu byly vyrobeny polymerní fólie z PMMA a polystyrenu, které obsahují fotosenzibilizátor v různých fyziologických koncentracích.

Na obrázku 3.9 jsou vidět naměřené kinetiky fosorescence  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm z těchto fólií obsahujících PpIX v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Z obrázku je jasně patrný výrazný rozdíl v intenzitách signálu fosorescence  $^1\text{O}_2$  získaných za stejných podmínek z polymerních fólií vyrobených z PMMA a polystyrenu. V případě fólií vyrobených z polystyrenu je signál poměrně slabý a nárůst fosorescence  $^1\text{O}_2$  je do značné míry překryt zbytkovou luminiscencí filtrů. Naopak v případě fólie z PMMA je signál poměrně silný se zřetelným nárůstem i poklesem fosorescence  $^1\text{O}_2$ . Pro popis kinetiky  $^1\text{O}_2$  z PMMA postačuje jednoduchý model vyjádřený rovnicí 1.31. Vážený průměr dob života singletního kyslíku generovaného PpIX v PMMA získaný postupným nafitováním prvních deseti naměřených kinetik, jejichž sečtením je získáván lepší poměr signál/šum, je roven ( $42,2 \pm 1,7$ )  $\mu$ s a vážený průměr doby života tripletních stavů PpIX, získaný stejným způsobem, je roven ( $11,9 \pm 0,4$ )  $\mu$ s.

Na první pohled by se mohlo zdát, že fólie z PMMA by mohly sloužit jako vhodný standard pro měření z pevných vzorků. Při podrobnějším zkoumání jednotlivých kinetik ( $n = 20$ ) se však ukázalo výrazné snížování intenzity signálu  $^1\text{O}_2$  v čase. Tento jev je trvalý a byl vysvětlen pomocí následných fluorescenčních měření, při kterých bylo pozorováno rychlé formování fotoproduktu a postupné vybělování PpIX v prostředí PMMA.

Z těchto důvodů se vyroběny polymerní fólie s PpIX nejeví jako vhodný standard pro měření s vyššími energiemi excitačního zaření, které jsou však pro naše měření nezbytné.



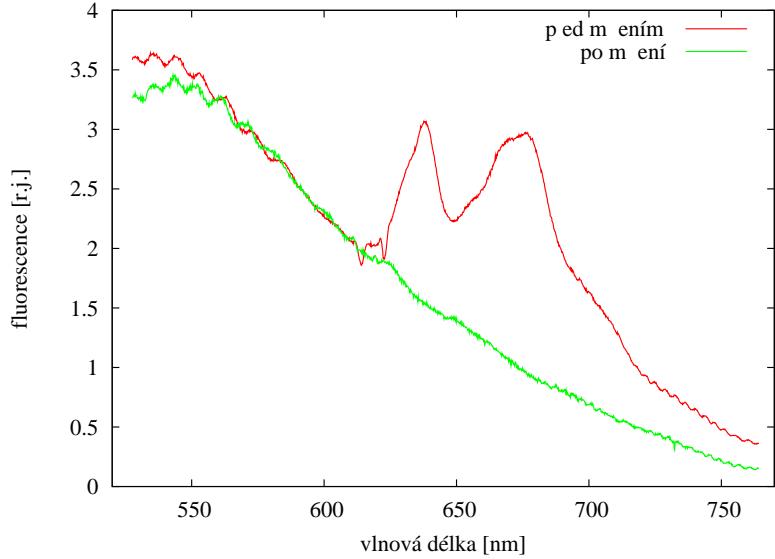
Obrázek 3.9: Kinetiky luminiscence  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm generovaného PpIX o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  v PMMA a polystyrenu.

## 3.5 Tkáňové kultury

### 3.5.1 Fluorescenční měření

První pokusy s kultivací buněčných kultur myších fibroblastů linie 3T3 s fotosenzibilizátorem byly prováděny s použitím ALA. Důvod, proč byl zvolen právě tento fotosenzibilizátor, je ten, že ALA je v České republice schválena pro klinické použití, a proto je hojně využívaným PS v praxi. Kultivace byla prováděna s buňkami ve stacionární fázi růstu ve 100  $\mu\text{M}$  ALA po dobu 20 hodin po vzoru [52]. Při tomto postupu kultivace bylo dosaženo produkce PpIX, což dokazuje jeho fluorescenční spektrum na obrázku 3.10 pořízené mikrospektroskopickou aparaturou, nicméně fluorescence PpIX z buňky nebyla v mikroskopu pouhým okem pozorovatelná. Ve spektru jsou jasné patrné fluorescenční pásy odpovídající PpIX na silném pozadí. Vzhledem k dlouhé době akumulace se nejspíše jedná o pozadí pocházející od autofluorescence buňky. Na obrázku 3.10 je rovněž uvedeno spektrum naměřené z buněk v kyvetě, které byly před tímto měřením vyštaveny expozici excitačního záření při měření luminiscence  $^1\text{O}_2$ . Intenzita obou spekter je pro lepší srovnání v obrázku přenormována. Je vidět, že po cca hodinové expozici téměř zmizely pásy okolo 640 nm a 675 nm odpovídající fluorescenci PpIX [40] a zbylo pouze silné pozadí rostoucí u kratších vlnových délek.

Pokusy naměřit kinetiku fosforecence  $^1\text{O}_2$  z takto připravených buněk nebyly úspěšné. Jednou z možných příčin se jevila nízká hladina PpIX vyprodukovaného buňkami z ALA. Možným východiskem z této nepříznivé situace by byla možnost změny kultivačního protokolu. Rešerše publikací ostatních autorů zabývajících se touto problematikou [46, 52, 72] ukázala, že kultivační protokoly se od sebe často výrazně odlišují, přičemž jsou používány různé druhy buněčných kultur. Optimalizace takové kultivace



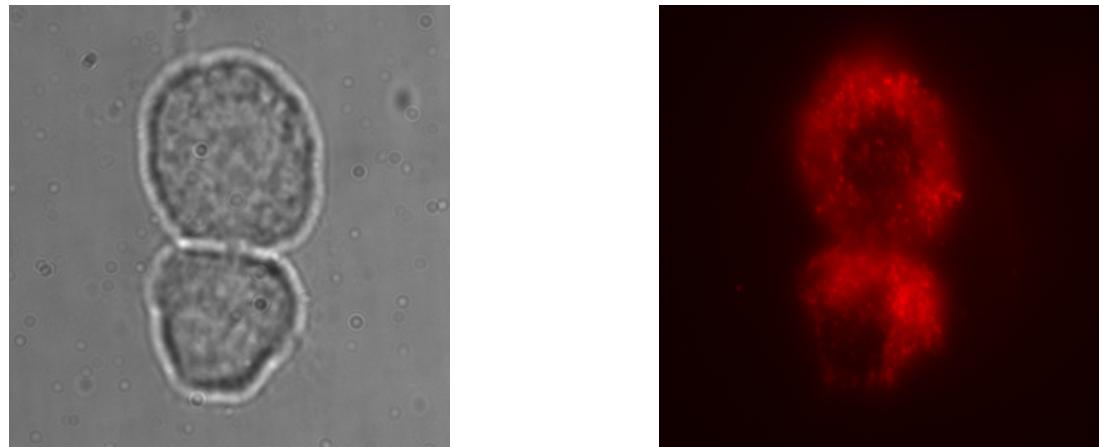
Obrázek 3.10: Fluorescenční spektrum PpIX z buněk kultivovaných 20 hodin v ALA před a po hodinovém měření luminiscence  $^1\text{O}_2$ .

by byla časově náročná, proto bylo výhodnější nejdříve vyzkoušet kultivaci s jinými PS, které jsou méně citlivé na stav buněčné kultury a další parametry kultivace.

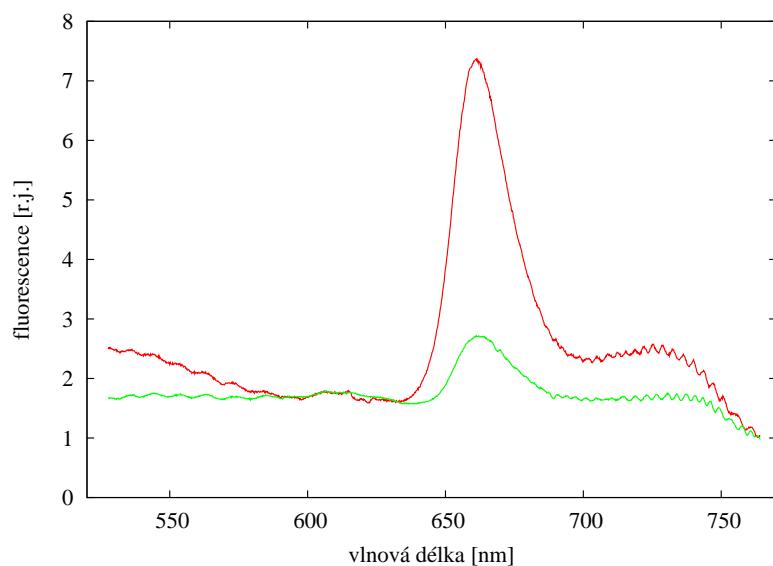
Jako další PS byly proto zvoleny hydrofilní TPPS<sub>4</sub>, schválený v České republice pro klinické použití, a jeho kladně nabité analog TMPyP, který dosud povolení nemá. Kultivace byla provedena dle optimalizované metody [3], která se shoduje s předešlým postupem použitým pro ALA.

Na obrázku 3.11 jsou vidět mikroskopické snímky 3T3 myších fibroblastů kultivovaných s TPPS<sub>4</sub>. Vyobrazen je jak snímek v procházejícím světle, tak i snímek fluorescenční. Jinak černobílý fluorescenční obrázek byl softwarově upraven tak, aby barevně odpovídal fluorescenci PS. Hlavní lokalizací TPPS<sub>4</sub> jsou lyzozomy, které jsou na obrázku vidět jako malé svítící tečky v cytoplazmě, přičemž v jádře buněk se TPPS<sub>4</sub> téměř nevyskytuje. Na obrázku 3.12 jsou vidět fluorescenční spektra pořízená z buněk na obrázku 3.11. U obou spekter je vidět silný fluorescenční pás TPPS<sub>4</sub> s hlavním maximem na 660 nm a vedlejším na 730 nm. Toto spektrum je oproti spektru TPPS<sub>4</sub> v PBS [40] celé posunuté asi o 20 nm do červené oblasti. Spektra z jednotlivých buněk se od sebe liší poměrem intenzit fluorescenčních pásů TPPS<sub>4</sub> oproti pozadí. To je zřejmě dáno tím, že se buňky od sebe lišily v množství obsaženého TPPS<sub>4</sub>. Dalším rozdílem mezi spektry z obou buněk je pozorovaný pás autofluorescence, který se v případě buňky se silnějším signálem TPPS<sub>4</sub> zvedá od 600 nm směrem ke kratším vlnovým délkám. Důvod, proč se tento pás u buňky s nižším obsahem TPPS<sub>4</sub> nevyskytuje, není zcela jasný.

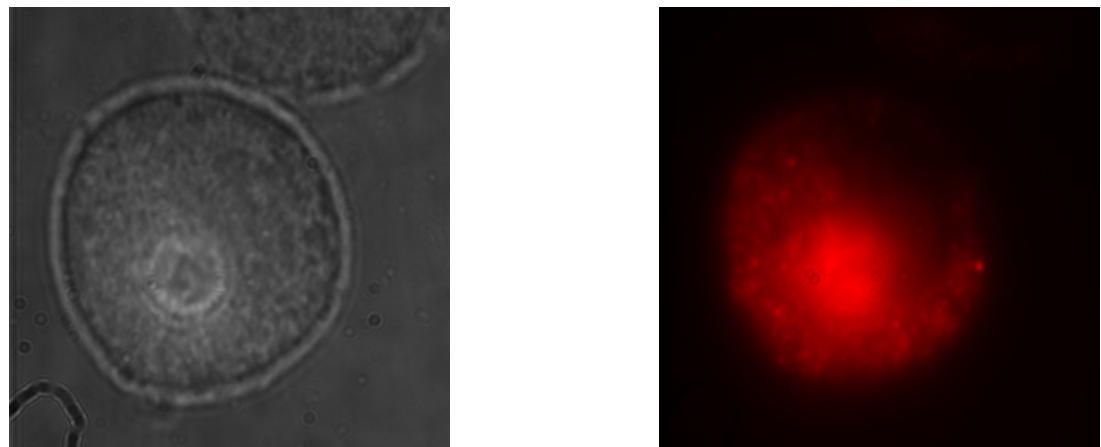
Na obrázku 3.13 je stejná dvojice obrázků, jako v případě buněk kultivovaných s TPPS<sub>4</sub>, pro buňky kultivované s TMPyP. Z obrázku je dobře patrná vlastnost TMPyP přednostně se akumulovat v jádře buňky. Fluorescenční spektrum TMPyP, které bylo pořízeno z buňky na obrázku 3.13, je na obrázku 3.14. Spektrum TMPyP je sice z velké



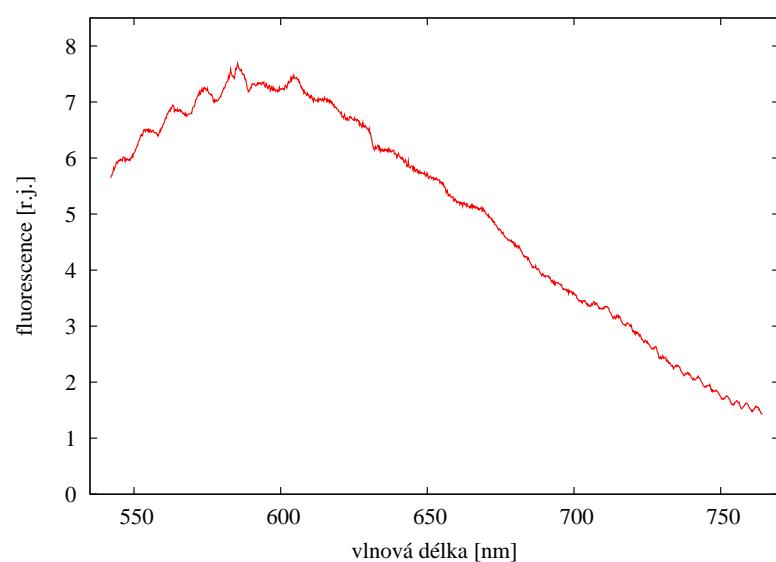
Obrázek 3.11: Mikroskopický snímek 3T3 myších fibroblastů kultivovaných ve  $100 \mu\text{M}$   $\text{TPPS}_4$  po dobu 20 hodin v procházejícím světle (vlevo) a fluorescenční snímek (vpravo).



Obrázek 3.12: Fluorescenční spektra  $\text{TPPS}_4$  z buňek na obr. 3.11.



Obrázek 3.13: Mikroskopický snímek 3T3 myšího fibroblastu kultivovaného ve  $100 \mu\text{M}$  TMPyP po dobu 20 hodin v procházejícím světle (vlevo) a fluorescenční snímek (vpravo).



Obrázek 3.14: Fluorescenční spektrum TMPyP z buňky na obr. 3.13.

části překryto pozadím, přesto jsou okolo vlnových délek 670 nm a 710 nm rozlišitelné fluorescenční pásy TMPyP. Na rozdíl od buněk kultivovaných s TPPS<sub>4</sub> buňky s TMPyP svítily více v zelené oblasti, čemuž odpovídá i naměřené spektrum, přesto je na obrázku 3.13 fluorescence rovněž znázorněna v červené barvě.

Fluorescenční spektra pořízená z buněk odpovídají svítícím maximům v buňce vymezeným štěrbinou. Ta byla umístěna tak, že vertikálně protínala celou buňku napříč v jejím středu. Intenzita spekter odpovídá intenzitě svítících míst v buňkách, z kterých byla spektra pořízena. Jako reprezentativní spektra byla vybrána ta, která odpovídala nejsilněji svítícím místům v rámci štěrbiny. Ostatní spektra pořízená v rámci jedné buňky se lišila pouze intenzitou, ne však svým charakterem. Zvlnění spekter, které je nejvíce patrné na okrajích spekter, je dánno interferenčními jevy na zpětně osvětlované detekční kameře (tzv. etaloningu).

Bыло потверждено, что локализация PS зависит от того, о какой PS идет речь. TMPyP локализован в основном в ядре, в то время как TPPS<sub>4</sub> концентрируется преимущественно в лизосомах. Флуоресценчные спектры, полученные из клеток, культивированных с TMPyP, отличаются от спектров, полученных из клеток, культивированных с TPPS<sub>4</sub>, тем, что в первых преобладают зеленые полосы, в то время как во вторых преобладают красные полосы. Это соответствует измеренному спектру, несмотря на то, что на изображении 3.13 изображена красная флуоресценция.

### 3.5.2 Fosforescenční měření

Po neúspěšném měření fosforecence  $^1\text{O}_2$  z buněk kultivovaných s ALA bylo provedeno stejné měření s buňkami kultivovanými s TPPS<sub>4</sub>. Toto měření bylo z hlediska detekce  $^1\text{O}_2$  rovněž neúspěšné, ale byla již zaznamenána silná fluorescence TPPS<sub>4</sub> pocházející z intracelulárního prostoru buněk. Tato fluorescence byla v mikroskopu dobře pozorovatelná pouhým okem. Tento stav naznačoval, že budoucí měření mohou být využity pouze buňky kultivované s TPPS<sub>4</sub>. Vzhledem k tomu, že TPPS<sub>4</sub> má vysokou koncentraci v buňkách, měření mohou být provedena s využitím buňek kultivovaných s TPPS<sub>4</sub>.

Pro příští měření byly připraveny dvě skupiny buněk. Jedny kultivované s TMPyP, druhé s TPPS<sub>4</sub>. Postup měření byl takový, že 20 minut před začátkem měření začalo být probubláváno PBS nad buňkami čistým kyslíkem, přičemž toto bublání pokračovalo i během celého měření fosforecence  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm. Tím bylo zajištěno, že problém absence signálu  $^1\text{O}_2$  není způsoben nedostatkem kyslíku v buňkách. Poté bylo měření pozastaveno a PBS nad buňkami začalo být probubláváno dusíkem. To opět probíhalo 20 minut a pokračovalo po celé měření, které bylo shodné s měřením  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm. Tento postup zajišťoval vytěsnění kyslíku z buněk, tudíž se zamezilo tvorbě  $^1\text{O}_2$  a data mohla být využita jako relevantní pozadí, které se od předchozích dat následně odečetlo. Po tomto měření následovalo ještě měření fosforecence PS na vlnové délce 958 nm při současném bublání kyslíkem. Shodný postup byl použit jak pro buňky s TPPS<sub>4</sub>, tak pro buňky s TMPyP. Vzhledem k redukovániu signálu už i tak velmi slabé fosforecence PS a  $^1\text{O}_2$  v biologických systémech byla pro tato měření odstraněna vstupní i výstupní štěrbina monochromátoru, a tím byla zvýšena efektivita sběru signálu, jak je popsáno v kapitole 3.1.4.

Na obrázcích 3.15 a 3.16 jsou vidět naměřené kinetiky fosforecence  $^1\text{O}_2$  na vlnové délce 1278 nm z 3T3 myších fibroblastů kultivovaných s 100  $\mu\text{M}$  TPPS<sub>4</sub> resp. TMPyP

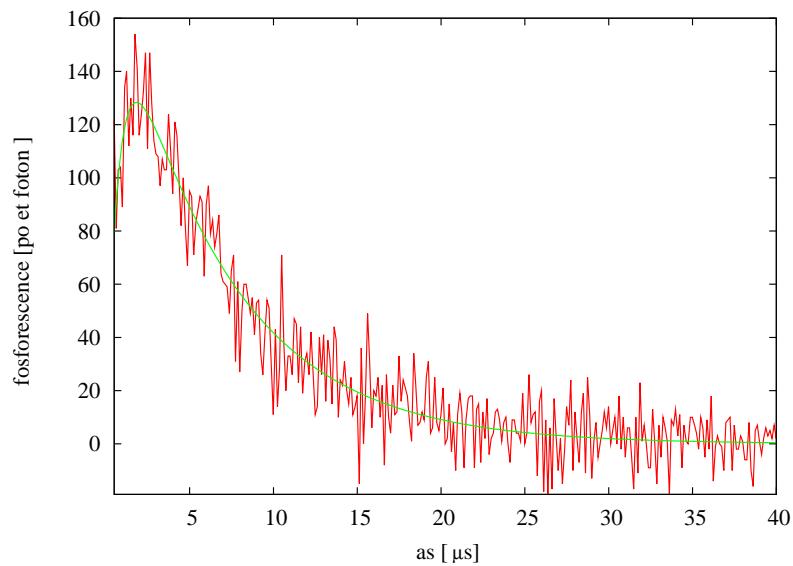
po dobu 20 hodin. Od dat je odečteno pozadí pocházející z buněk probublávaných dusíkem a data jsou pro lepsí přehlednost sečtena po 25 kanálech. Pro nafitování dat stačila konvoluce jednoexponenciálního nárůstu a jednoexponenciálního poklesu dle rovnice 1.31. Vzhledem k tomu, že vynesená data jsou získána sečtením třiceti po sobě jdoucích měření, byla data rozdělena na pět skupin po šesti měřeních a ty byly nafitovány. Jejich statistickým zpracováním bylo možné získat relevantnější doby života a jejich standardní chyby, než které uvádí program Gnuplot použitý pro fitování dat.

Na obrázcích 3.17 a 3.18 je vynesena časová závislost dob života singletního kyslíku  $\tau_\Delta$  a dob nárůstu jeho fosforecence  $\tau_T$  pro TPPS<sub>4</sub> i TMPyP tak, jak se měnily během měření. V případě TPPS<sub>4</sub> začíná tato závislost až v třinácté minutě od začátku měření, jelikož předcházející kinetiky nebylo možné uspokojivě nafitovat kvůli nárůstům fosforecence  $^1\text{O}_2$  překrytým luminiscencí pozadí. Z obou obrázků je vidět, že postupně dochází k ustalování dob života tripletních stavů  $\tau_T$  TMPyP i TPPS<sub>4</sub> v buňce. S poklesem dob života  $\tau_T$  na ustálenou úroveň je rovněž patrné mírné prodloužení dob života  $\tau_\Delta$ , které jsou dále prakticky konstantní. Zkracování dob života  $\tau_T$  nejspíše souvisí s postupným zvyšováním koncentrace kyslíku v buňkách způsobené bubláním kyslíkem do vzorku. Doba bublání kyslíkem před měřením odpovídala ověřenému postupu používanému při měření z roztoků, kde byla tato doba pro ustálení koncentrace kyslíku dostatečná. V případě buněk je pro ustálení koncentrace kyslíku nejspíše nutné dobu bublání prodloužit, jelikož difuze kyslíku je v tomto případě omezena propustností buněčných membrán. Důvod, proč se doby života  $\tau_T$  zkracují se zvyšující se koncentrací kyslíku, je dán zhášením tripletních stavů PS kyslíkem.

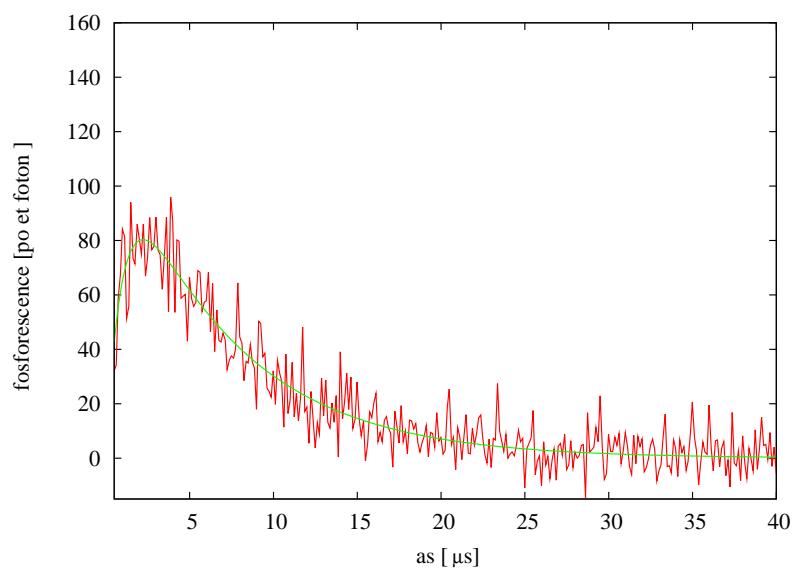
Doby života  $\tau_\Delta$  i  $\tau_T$  pro TMPyP i TPPS<sub>4</sub> jsou uvedeny v tabulce 3.2. Hodnoty dob života i jejich standardní chyby jsou vypočteny jako vážený průměr z hodnot po jejich ustálení. Konkrétně se jedná o poslední čtyři hodnoty v případě dob života  $\tau_\Delta$  pro TPPS<sub>4</sub> i TMPyP a v případě nárůstů  $\tau_T$  se pak jedná o poslední tři hodnoty v případě TPPS<sub>4</sub> a poslední čtyři hodnoty pro TMPyP (viz obr 3.17 a 3.18).

V případě fitování kinetik  $^1\text{O}_2$  naměřených z biologických systémů se ukázalo, že koeficient  $I_0/(\tau_\Delta^{-1} - \tau_T^{-1})$  z rovnice 1.31 může vyjít i kladný. V takovém případě již není jasné dáno, zda koeficienty  $\tau_\Delta$  a  $\tau_T$  stále vyjadřují dobu života  $^1\text{O}_2$  resp. dobu života tripletů PS, nebo se význam těchto koeficientů vymění. To, že v prostředí buněk je opravdu význam obou koeficientů opačný, potvrzuje [3] pomocí měření kinetik  $^1\text{O}_2$  z buněk v H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O. Vzhledem k tomu, že doba života singletního kyslíku je výrazně více závislá na této izotopické záměně než doba života tripletních stavů PS, je pak jednoduché určit význam jednotlivých koeficientů. Záměna významu obou koeficientů tedy znamená, že doba života  $^1\text{O}_2$  je v buněčném prostředí kratší než doba života tripletních stavů PS. Ke stejnemu závěru došel rovněž Niedere *et al.* [45] při měřeních *in vivo*.

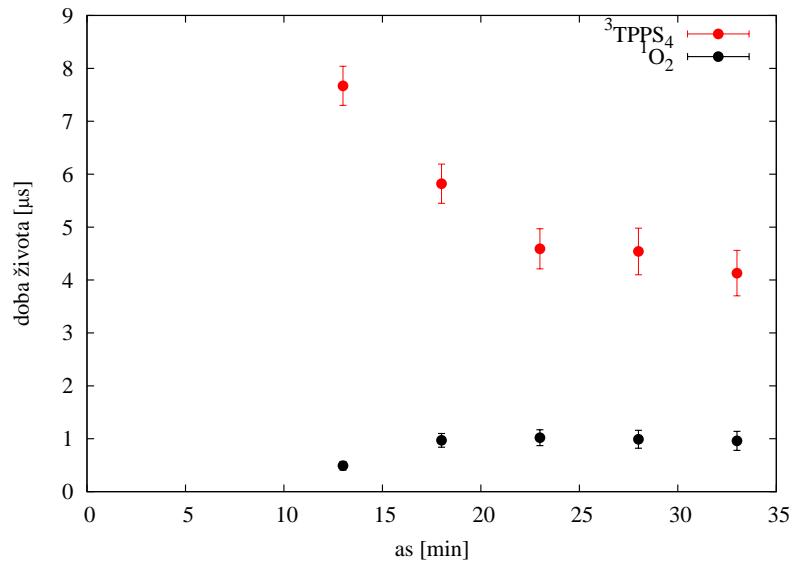
Výsledky měření fosforecence tripletních stavů PS na vlnové délce 958 nm jsou na obrázcích 3.19 a 3.20. Od dat je odečteno pozadí (temný signál) získané z konce naměřených dat. Obdržená data nebylo možné přijatelně nafitovat pomocí jednoexponenciálního poklesu, proto jsou data proložena lineární kombinací dvou jednoexponečních poklesů. V tabulce 3.3 jsou uvedeny doby života obou komponent včetně jejich procentuálního zastoupení. Porovnáním doby života  $\tau_T$  obdržených z kinetik  $^1\text{O}_2$



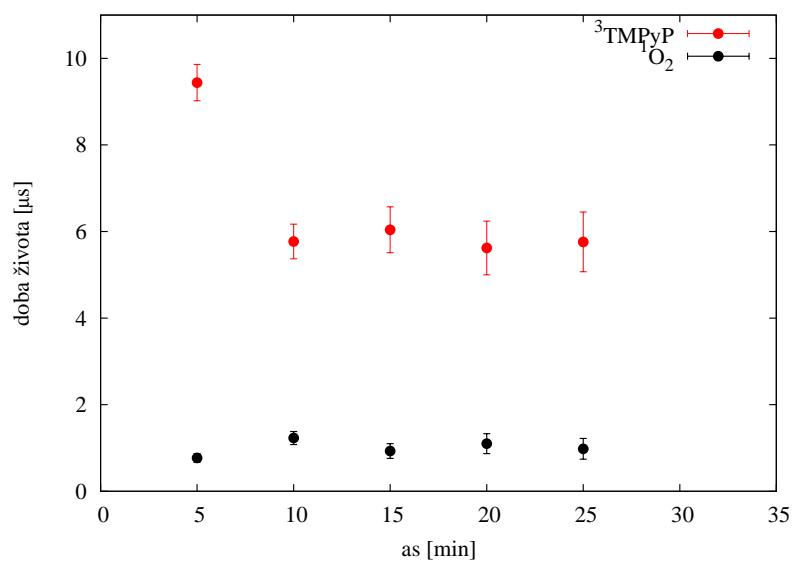
Obrázek 3.15: Fosforescence  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm z 3T3 myších fibroblastů kultivovaných ve 100  $\mu\text{M}$  TPPS<sub>4</sub> po dobu 20 hodin.



Obrázek 3.16: Fosforescence  $^1\text{O}_2$  na 1278 nm z 3T3 myších fibroblastů kultivovaných ve TMPyP po dobu 20 hodin.



Obrázek 3.17: Vývoj dob života  $^1\text{O}_2$  a  $^3\text{TPPS}_4$  během měření.



Obrázek 3.18: Vývoj dob života  $^1\text{O}_2$  a  $^3\text{TMPyP}$  během měření.

	$\tau_\Delta$ [μs]	$\tau_T$ [μs]
TPPS <sub>4</sub>	$0,99 \pm 0,02$	$4,5 \pm 0,2$
TMPyP	$1,11 \pm 0,09$	$5,8 \pm 0,1$

Tabulka 3.2: Doby života singletního kyslíku  $\tau_\Delta$  a doby nárůstů jeho fosorescence  $\tau_T$  pro TPPS<sub>4</sub> a TMPyP.

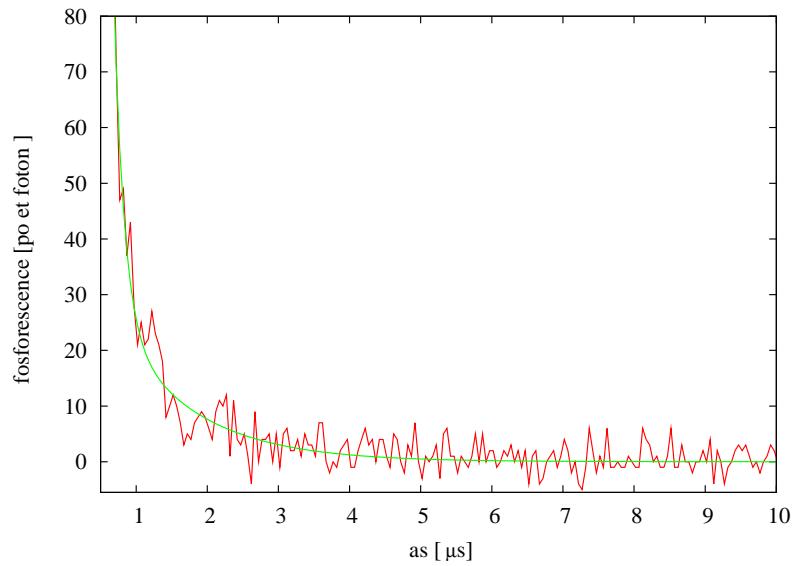
	$\tau_{T_1}$ [μs]	[%]	$\tau_{T_2}$ [μs]	[%]
TPPS <sub>4</sub>	$0,14 \pm 0,02$	94	$1,1 \pm 0,1$	6
TMPyP	$0,25 \pm 0,02$	84	$3,1 \pm 0,8$	16

Tabulka 3.3: Doby života fosorescence tripletních stavů TPPS<sub>4</sub> a TMPyP.

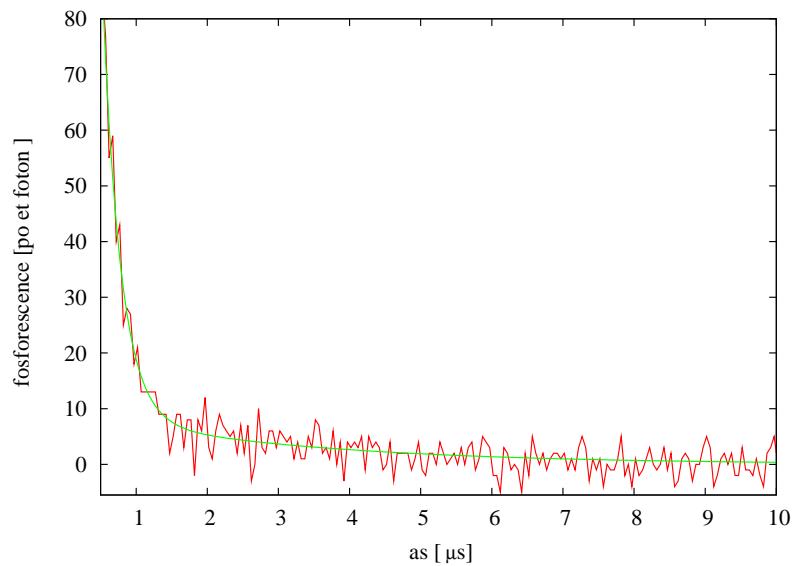
uvedených v tabulce 3.2 je vidět, že jsou obě doby života  $\tau_{T_1}$  a  $\tau_{T_2}$  výrazně kratší. Jedním z možných vysvětlení tohoto nesouladu je to, že po delší době bublání dusíkem a vystavení obecně nepříznivým podmínkám buňky z velké části lyzovaly, a došlo tedy k vylití jejich intracelulárního prostoru, obsahujícího PS, do okolního prostředí. Tím pádem by zkrácené doby života z části odpovídaly kratším dobám života triplených stavů PS v PBS nasyceným kyslíkem (pro TMPyP  $\sim 0,45$  μs, viz kapitola 3.2 a obr. 3.7) a částečně dobám života PS interagujících se zbytky buněk.

Získané doby života  $^1\text{O}_2$  generovaného v 3T3 myších fibroblastech pomocí TPPS<sub>4</sub> resp. TMPyP se v rámci experimentální chyby shodují s hodnotami naměřenými ze suspenze buněk lidských fibroblastů Jiménez-Banzo *et al.* [3] při použití stejných PS. V případě TPPS<sub>4</sub> obdržela Jiménez-Banzo *et al.* [3] hodnotu  $(1,5 \pm 1,0)$  μs a pro případ TMPyP  $(1,7 \pm 1,0)$  μs. Námi naměřené výsledky jsou  $(0,99 \pm 0,02)$  μs pro TPPS<sub>4</sub> a  $(1,11 \pm 0,09)$  μs pro TMPyP. Obě tyto hodnoty se v rámci udávané chyby vzájemně shodují, přičemž naše výsledky jsou naměřeny s minimálně řádově nižší chybou. Výsledky se shodují i v tom, že doba života  $^1\text{O}_2$  je v případě použití TMPyP delší než při použití TPPS<sub>4</sub>. Pro srovnání jsou naše hodnoty doby života  $^1\text{O}_2$  mezi hodnotami Jiménez-Banzo *et al.* [3] a Niedre *et al.* [45], který uvádí dobu života  $^1\text{O}_2$  ze suspenze buněk při použití hydrofilního PS AlS<sub>4</sub>Pc  $(0,6 \pm 0,4)$  μs, opět s řádově vyšší chybou.

Pokud se jedná o doby života tripletních stavů  $\tau_T$  získaných z kinetik fosorescence  $^1\text{O}_2$ , pak Jiménez-Banzo *et al.* [3] uvádí hodnotu  $(20 \pm 1)$  μs pro TPPS<sub>4</sub> a  $(15 \pm 2)$  μs pro TMPyP. Niedre *et al.* [45] pro AlS<sub>4</sub>Pc uvádí  $(19 \pm 3)$  μs. Námi naměřené hodnoty  $(4,5 \pm 0,2)$  μs pro TPPS<sub>4</sub> a  $(5,8 \pm 0,1)$  μs pro TMPyP jsou kratší. To je nejspíše způsobeno vyšší koncentrací kyslíku v buňkách, než jaká byla v případě ostatních autorů. Tomu by nasvědčovaly i obrázky časového vývoje dob života tripletních stavů 3.15 a 3.16, kde se doby života s dobou bublání zkracují. Vzhledem k malému počtu bodů bohužel není možná přijatelná extrapolace dat pro určení dob života tripletních stavů PS bez bublání kyslíkem.



Obrázek 3.19: Fosforescence  ${}^3\text{TPPS}_4$  na 958 nm z 3T3 myších fibroblastů kultivovaných ve 100  $\mu\text{M}$   $\text{TPPS}_4$  po dobu 20 hodin.



Obrázek 3.20: Fosforescence  ${}^3\text{TMPyP}$  na 958 nm z 3T3 myších fibroblastů kultivovaných ve 100  $\mu\text{M}$   $\text{TMPyP}$  po dobu 20 hodin.

# Závěr

V úvodní teoretické části práce byly popsány základní spektroskopické vlastnosti mnohaatomových molekul a singletního kyslíku. Ty byly následně aplikovány a dále rozvinuty v souvislosti s popisem základních poznatků o pochodech probíhajících při fotodynamické terapii. Jsou zde rovněž shrnutý dosud publikované výsledky luminiscenční detekce singletního kyslíku v biologických systémech a možnosti jejího využití pro výzkum mechanizmů a sledování průběhu fotodynamické terapie.

Pro seznámení s funkcí původní aparatury byla provedena měření spektroskopických a fotosenzibilizačních vlastností hydrofilního kladně nabitého fotosenzibilátoru TMPyP a jejich srovnání s dříve publikovanými vlastnostmi jeho záporně nabitého analogu TPPS<sub>4</sub> [11]. Tyto výsledky byly současně publikovány v impaktovaném časopise Journal of Molecular Structure [10].

Určitým mezistupněm mezi měřením s původním uspořádáním aparatury z roztoků a měřením z pevných vzorků pomocí světlovodu s luminiscenční sondou byla měření vlivu fosfatidylcholinu na fotosenzibilizační vlastnosti TPP a dobu života jím generovaného singletního kyslíku. Tato měření jsou mimo jiné zajímavá způsobem výroby vzorků pomocí metody spin-coating, ale i metodou detekce signálu z boční strany sklíčka, na kterém byl vzorek nanesen. Takto naměřená data jsou součástí publikace [9], u které momentálně probíhá recenzní řízení.

Dále se práce zabývá úpravou a optimalizací aparatury pro sběr luminiscence singletního kyslíku z povrchu pevných vzorků pomocí světlovodu s luminiscenční sondou. Přes mnohé obtíže související hlavně s luminiscencí filtrů a navázáním excitačního záření do vláken světlovodu se podařilo požadovaným způsobem upravit aparaturu pro měření z pevných vzorků při zachování možnosti měřit z roztoků.

Byl navrhnut a odzkoušen postup výroby polymerních matric z PMMA a polystyrenu obsahující protoporfyrin IX. Přestože se později ukázalo, že tyto polymerní fólie nejsou ideálním standardem pro naše měření, podařilo se pomocí nich provést první úspěšné měření luminiscence singletního kyslíku z pevných vzorků pomocí světlovodu.

Po dalších testovacích měřeních a optimalizaci aparatury i kultivace buněčných kultur se podařilo naměřit pilotní fluorescenční spektra i kinetiky fosorescence singletního kyslíku z 3T3 myších fibroblastů obsahujících TPPS<sub>4</sub> resp. TMPyP. Obdržené doby života singletního kyslíku ( $0,99 \pm 0,02$ ) μs (TPPS<sub>4</sub>) a ( $1,11 \pm 0,09$ ) μs (TMPyP) odpovídají dosud publikovaným výsledkům a navíc jsou určeny s řádově nižší chybou. Doby života tripletních stavů fotosenzibilizátorů se s publikovanými výsledky rozcházejí, což je ale vysvětlováno vyšší koncentrací kyslíku v buňkách při námi prováděných experimentech.

Pozitivní výsledky získané z tenké vrstvy 3T3 myších fibroblastů obsahujících TPPS<sub>4</sub> resp. TMPyP naznačují, že měření s upravenou aparaturou z živých pokusných zvířat by mohlo být rovněž úspěšné. Před tímto krokem je však plánováno zvládnutí rutinní kultivace buněčných kultur lidských fibroblastů přímo v naší laboratoři a provedení navrhované úpravy v optickém přizpůsobení vstupního světlosběrného systému.

Díky možnosti detekovat fosforescenci fotosezibilizátorů a singletního kyslíku s časovým i spektrálním rozlišením z celé řady různorodých vzorků, včetně extrémně slabého signálu ze vzorků *in vivo*, by se tato aparatura stala zcela unikátní i v celosvětovém měřítku. Později by mohla být používána nejen k výzkumu mechanizmů fotodynamické terapie, ale rovněž by mohla sloužit k optimalizaci terapie u jednotlivých pacientů přímo v jejím průběhu. K tomu by však bylo potřeba detekční aparaturu dále vhodně upravit pro potřeby klinického využití a výrazně snížit její technologickou náročnost. V první řadě by bylo nutné nahradit fotonásobič chlazený tekutým dusíkem za jeho novější verzi chlazenou Peltierovými články a místo stávající kombinace excitačních laserů využít nejspíše nějaký typ pevnolátkového laseru.

# Literatura

- [1] Babilas P., Landthaler M., Szeimies R. M.: Photodynamic therapy in dermatology. *European Journal of Dermatology* **16** (2006), 340 – 348.
- [2] Baier J., Maier M., Engl R., Landthaler M., Bäumler W.: Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *Journal of Physical Chemistry B* **109(7)** (2005), 3041 – 3046.
- [3] Jiménez-Banzo A., Sagristà M. L., Mora M., Nonell S.: Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free radical biology & medicine* **44** (2008), 1926 – 1934.
- [4] Jiménez-Banzo A.: *New Insights in Photodynamic Therapy: Production, Diffusion and Reactivity of Singlet Oxygen in Biological Systems*. Doctoral thesis, Universitat Ramon Llull, Barcelona, Spain (2008), <<http://www.tesisenred.net/TDX-0429108-171532/>> [cit. 2009-04-16].
- [5] Bonnett R.: *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. CRC Press (2000).
- [6] Calzavara-Pinton P., Szeimies B. M., Ortel B.: Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology. *Elsevier Science & Technology* (2001).
- [7] Coutier S., Bezdetnaya L. N., Foster T. H., Parache R. M., Guillemina F.: Effect of Irradiation Fluence Rate on the Efficacy of Photodynamic Therapy and Tumor Oxygenation in Meta-Tetra (Hydroxyphenyl) Chlorin (mTHPC)-Sensitized HT29 Xenografts in Nude Mice1. *Radiation Research* **158** (2002), 339 – 345.
- [8] Davies M. J.: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305** (2003), 761 – 770.
- [9] Dědic R., Molnár A., Vyklický V., Hála J.: Tetraphenylporphyrin Phosphorescence and Photosensitization of Singlet Oxygen in Lipids. v recenzním řízení.
- [10] Dědic R., Vyklický V., Svoboda A., Hála J.: Phosphorescence of Singlet Oxygen and 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphine: Time and Spectral Resolved Study. *Journal of Molecular Structure*, v tisku.

- [11] Dědic R., Svoboda A., Pšenčík J., Hála J.: Phosphorescence of singlet oxygen and meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphin: Time and spectral resolved study. *Journal of Molecular Structure* **651** (2003), 301 – 304.
- [12] Dědic R., Kořínek M., Molnár A., Svoboda A., Hála J.: Singlet oxygen quenching by oxygen in tetraphenyl-porphyrin solutions. *Journal of Luminescence* **119** (2006), 209 – 213.
- [13] DeRosa M.C., Crutchley R.J.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **233** (2002), 351 – 371.
- [14] Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K.: Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **3** 2003, 380 – 387.
- [15] Dysart J. S., Singh G., Patterson M. S.: Calculation of Singlet Oxygen Dose from Photosensitizer Fluorescence and Photobleaching During mTHPC Photodynamic Therapy of MLL Cells. *Photochemistry and Photobiology* **81** (2005), 196 – 205.
- [16] Frederiksen P. K., McIlroy S. P., Nielsen Ch. B., Nikolajsen L., Skovsen E., Jørgensen M., Mikkelsen K. V., Ogilby P. R.: Two-Photon Photosensitized Production of Singlet Oxygen in Water. *Journal of the American Chemical Society* **127(1)** (2005), 255 – 269.
- [17] Hatz S., Poulsen L., Ogilby P. R.: Time-resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration. *Photochemistry and Photobiology* **84** (2008), 1284 – 1290.
- [18] Hirano T., Kohno E., Nishiwaki M.: Detection of near infrared emission from singlet oxygen in PDT with an experimental tumor bearing mouse. *Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine* **22** (2002), 99 – 108.
- [19] Hongcharu W., Taylor C. R., Chang Y., Aghassi D., Suthamjariya K. Anderson R. R.: Topical ALA-Photodynamic Therapy for the Treatment of Acne Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology* **115** (2000), 183 – 192.
- [20] <[http://focosi.altervista.org/heme\\_biosynthesis.gif](http://focosi.altervista.org/heme_biosynthesis.gif)> [cit. 2009-04-16].
- [21] Chen B., Pogue B. W., Goodwin I. A., O'Hara J. A., Wilmot C. M., Hutchins J. E., Hoopes P. J., Hasan T.: Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor. *Radiation research* **160** (2003), 452 – 459.
- [22] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition. (1997), <[www.iupac.org/goldbook/T06505.pdf](http://www.iupac.org/goldbook/T06505.pdf)> [cit. 2009-04-16].
- [23] Jarvi M. T., Niedre M. J., Patterson M. S., Wilson B. C.: Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry (SOLD) for Photodynamic Therapy: Current Status, Challenges and Future Prospects. *Photochemistry and Photobiology* **82** (2006), 1198 – 1210.

- [24] Jelínek O.: *Experimentální metody biofyziky III.: Luminiscence*. SPN, Praha (1983).
- [25] Karotki A.: *Simultaneous Two-Photon Absorption of Tetrapyrrolic Molecules: From Femtosecond Coherence Experiments to Photodynamic Therapy*, Doctoral thesis, Montana State University, Bozeman USA (2003).
- [26] Khan A. U., Kasha M.: Direct spectroscopic observation of singlet oxygen emission at 1268 nm excited by sensitizing dyes of biological interest in liquid solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76** (1979), 6047 – 6049.
- [27] Klotz L. O., Kröncke K. D., Sies H.: Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2** (2003), 88 – 94.
- [28] Kolářová H.: *Fotodynamická terapie*. <[http://eamos.pf.jcu.cz/amos/kra/externi/-kra\\_7169/ch09.htm](http://eamos.pf.jcu.cz/amos/kra/externi/-kra_7169/ch09.htm)> [cit. 2009-04-16].
- [29] Konan Y. N., Gurny R., Allemann R.: State of the art in the delivery of photo-sensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **66** (2002), 89 – 106.
- [30] Krasnovskii A. A.: Photosensitized luminescence of singlet oxygen in solution. *Biofizika* **21** (1976), 748 – 749.
- [31] Kulmova M. K., Yahioglu G., Ogilby P. R.: Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. *Journal of the American Chemical Society* **131(1)** (2009), 332 – 340.
- [32] Lapointe D., Brasseur N., Cadorette J., Madeleine C., Rodrigue S., Lier J. E., Lecomte R.: High-Resolution PET Imaging for In Vivo Monitoring of Tumor Response After Photodynamic Therapy in Mice. *The Journal of Nuclear Medicine* **40** (1999), 876 – 882.
- [33] Laubach H. J., Chang S. K., Lee S., Rizvi I., Zurakowski D., Davis S. J., Taylor Ch. R., Hasan T.: *In-vivo* singlet oxygen dosimetry of clinical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics* **13(5)** (2008), 050504.
- [34] LeClerc R.: *Photofrin: A Promising Drug with a Rocky History*. (2002), <<http://www.quasar.ualberta.ca/edse456/apt/vignettes/photofrin.htm>> [cit. 2009-04-16].
- [35] Lee S., Zhu L., Minhaj A. M., Hinds M. F., Vu D. H., Rosen D. I., Davis S. J.: Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen. *Journal of Biomedical Optics* **13(3)** (2008), 034010.
- [36] Lee S., Vu D. H., Hinds M. F., Davis S. J.: Pulsed diode laser-based singlet oxygen monitor for photodynamic therapy: *in vivo* studies of tumor-laden rats. *Journal of Biomedical Optics* **13(6)** (2008), 064035.

- [37] Lee S., Vu D. H., Hinds M. F., Davis S. J., O'Hara J. A., Pogue B.W.: *A Singlet Molecular Oxygen Imaging Sensor for Photodynamic Therapy*, presented at OSA BIOMED 2008 Biomedical Optics Topical Meeting (St. Petersburg, FL), (16-20 March2008).
- [38] Mojzeš P., Kruglik S. G., Baumruk V., Turpin P. Y.: Interactions of Electronically Excited Copper(II)–Porphyrin with DNA: Resonance Raman Evidence for the Exciplex Formation with Adenine and Cytosine Residues. *The Journal of Physical Chemistry B* **107(31)** (2003), 7532 – 7535.
- [39] Molckovsky A., Wilson B. C.: Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology* **46** (2001), 983 – 1002.
- [40] Molnár A.: *Optická spektroskopie fotogenerovaného singletního kyslíku*. Diplomová páce, KCHFO MFF UK, Praha (2003).
- [41] Molnár A., Dědic R., Svoboda A., Hála J.: Singlet oxygen production by lipophilic photosensitizers in liposomes studied by time and spectral resolved phosphorescence. *Journal of Molecular Structure*, **834** (2007), 488 – 491.
- [42] Molnár A., Dědic R., Svoboda A., Hála J.: Spectroscopic study of singlet oxygen photogeneration by lipophilic photosensitiser in liposomes. *Journal of Luminescence*, **128** (2008), 783 – 785.
- [43] Moša M.: Fotodynamická terapie maligních nádorů. *Vesmír* **74** (1995), 676.
- [44] Moser J. G.: *Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers*. Taylor & Francis (1998).
- [45] Niedre M., Patterson M. S., Wilson B. C.: Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells *In Vitro* and Tissues *In Vivo*. *Photochemistry and Photobiology* **75(4)** (2002), 382 – 391.
- [46] Niedre M. J., Secord A. J., Patterson M. S., Wilson B. C.: *In Vitro* Tests of the Validity of Singlet Oxygen Luminescence Measurements as a Dose Metric in Photodynamic Therapy. *Cancer Research* **63** (2003), 7986 – 7994.
- [47] Niedre M. J., Patterson M. S., Giles A., Wilson B. C.: Imaging of Photodynamically Generated Singlet Oxygen Luminescence *In Vivo*. *Photochemistry and Photobiology*, **81** (2005), 941 – 943.
- [48] Nový J., Urbanová M., Volka K.: Vibrational and electronic circular dichroism and absorption spectral study of the DNA–5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin interaction. *Journal of Molecular Structure* **748(1-3)** (2005), 17 – 25.
- [49] Patterson M. S., Madsen S. J., Wilson B. C.: Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring *in vivo* during photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **5** (1990), 69 – 84.

- [50] Poet A.: *Light-Tissue Interactions*. <[http://www.shorelaser.com/Light\\_Tissue\\_Interactions.html](http://www.shorelaser.com/Light_Tissue_Interactions.html)> [cit. 2009-04-16].
- [51] *Photodynamic Therapy for Cancer: Questions and Answers*. (2004), <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/photodynamic>> [cit. 2009-04-16].
- [52] Pourzand C., Reelfs O., Kvam E., Tyrrell R. M.: The Iron Regulatory Protein Can Determine the Effectiveness of 5-Aminolevulinic Acid in Inducing Protoporphyrin IX in Human Primary Skin Fibroblast. *Journal of Investigative Dermatology* **112** (1999), 419 – 425.
- [53] Prosser V. et al.: *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha (1989).
- [54] *Rakovina v Evropě: Klíčová fakta a statistiky*. European Cancer Patient Coalition, <[www.cabrnnoch.cz/media/2006-11-22\\_Rakovina\\_v\\_Evropce.pdf](http://www.cabrnnoch.cz/media/2006-11-22_Rakovina_v_Evropce.pdf)> [cit. 2009-04-16].
- [55] Qin Y., Xing D., Luo S., Zhou J., Zhong X., Chen Q.: Feasibility of Using Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog in a Novel Chemiluminescence Method for Real-time Photodynamic Therapy Dosimetry. *Photochemistry and Photobiology* **81(6)** (2005), 1534 – 1538.
- [56] Robinson D. J., Bruijn H. S., Veen N., Stringer M. R., Brown S. B., Star W. M.: Fluorescence Photobleaching of ALA-induced Protoporphyrin IX during Photodynamic Therapy of Normal Hairless Mouse Skin: The Effect of Light Dose and Irradiance and the Resulting Biological Effect. *Photochemistry and Photobiology* **67(1)** (1998), 140 – 149.
- [57] Schweitzer C., Schmidt R.: Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews* **103** (2003), 1685 – 1757.
- [58] Skovsen E., Snyder J. W., Lambert J. D., Ogilby P. R.: Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *Journal of Physical Chemistry B* **109(18)** (2005), 8570 – 8573.
- [59] Snyder J. W., Zebger I., Gao Z., Poulsen L., Frederiksen P. K., Skovsen E., McIlroy S. P., Klinger M., Andersen L. K., Ogilby P. R.: Singlet oxygen microscope: from phase-separated polymers to single biological cells, *Accounts of Chemical Research* **37(11)** (2004), 894 – 901.
- [60] Snyder J. W., Skovsen E., Lambert J. D. C., Ogilby P. R.: Subcellular, Time-Resolved Studies of Singlet Oxygen in Single Cells. *Journal of the American Chemical Society* **127** (2005), 14558 – 14559.
- [61] Snyder J. W., Skovsen E., Lambert J. D., Poulsen L., Ogilby P. R.: Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics* **8** (2006), 4280 – 4293.

- [62] Snyder J. W., Lambert J. D. C., Ogilby P. R.: 5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21 H,23H-Porphine (TMPPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPPyP in a Single Cell. *Photochemistry and Photobiology* **82(1)** (2006), 177 – 184.
- [63] Spikes J. D.: Photodynamic Action: From Paramecium to Photochemotherapy. *Photochemistry and Photobiology* **65** (1997), 142 – 147..
- [64] Stief T.W.: The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical Hypotheses*, **60** (2003), 567 – 572.
- [65] Trauner K. B., Gandour-Edwards R., Bamberg M., Shortkroff S., Sledge C., Hasan T.: Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochemistry and Photobiology* **67** (1998), 133 – 139.
- [66] Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H., Stewart F. A.: Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11** (2006), 1034 – 1044.
- [67] Wainwright M.: Photoinactivation of viruses. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3** (2004), 406 – 411.
- [68] Weishaupt K. R, Gomer Ch. J., Dougherty T. J.: Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor. *Cancer Research* **36** (1976), 2326 – 2329.
- [69] Wilson B. C., Patterson M. S.: The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* **53** (2008), 61 – 109.
- [70] Wormald R., Evans J., Smeeth L., Henshaw K.: Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **18** (2007).
- [71] Xie S., Li H., Li B.: Measurement of optical penetration depth and refractive index of human tissue. *Chinese Optics Letters* **1** (2003), 44 – 46.
- [72] Yamamoto J., Yamamoto S., Hirano T., Li S., Koide M., Kohno E., Okada M., Inenaga C., Tokuyama T., Yokota N., Terakawa S., Namba H.: Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. *Clinical Cancer Research* **12(23)** (2006), 7132 – 7139.
- [73] Zang L. Y., Zhang Z., Misra H. P.: EPR studies of trapped singlet oxygen ( ${}^1\text{O}_2$ ) generated during photoirradiation of hypocrellin A. *Photochemistry and Photobiology* **52(4)** (1990), 677 – 683.
- [74] Zweig A., Henderson W. A. Jr.: Singlet oxygen and polymer photooxidations. I. Sensitizers, quenchers, and reactants. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **13** (1975), 717 – 736.