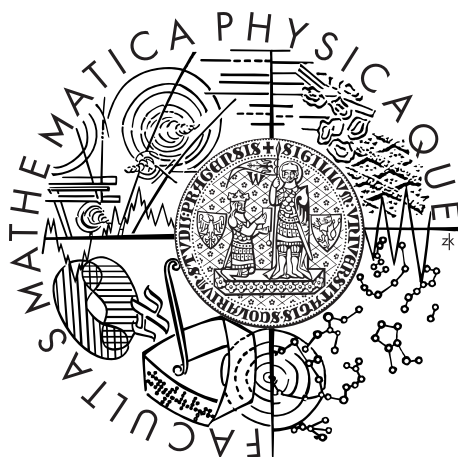


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Veronika Kozáková

## Časově rozlišená fluorescence protoporfyrinu IX

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2015

V prvom rade, by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. RNDr. Romanovi Dědicovi, Ph.D za veľkú trpezlivosť, ktorú so mnou mal, za opravy a cenné rady. Ďakujem aj ďalším pracovníkom katedry, ktorí mi počas písania pomáhali. Obrovská vďaka patrí najlepším dvom kamarátkam, ktoré ma podporovali. Na záver nesmiem zabudnúť poďakovať rodine a ostatným kamarátom a známym. Ďakujem.

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

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

V Praze dne 20.5.2015

Veronika Kozáková

Název práce: Časově rozlišená fluorescence protoporfyrinu IX

Autor: Veronika Kozáková

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., Katedra chemické fyziky a optiky

Abstrakt: Moje bakalářská práce se zabývá studiem závislosti dob života fluorescence endogenního fotosensibilizátoru protoporfyrinu IX na koncentraci v modelových roztocích v THF a DMSO pomocí techniky časově korelovaného čítání jednotlivých fotonů. Protoporfyrin IX je fotosensibilizátor využívaný pro fotodynamickou terapii a fotodiagnostiku onkologických a dalších vážných onemocnění. Zároveň je přirozeně se vyskytujícím prekursorem v syntéze hemu ve všech buňkách živých organismů. Zkoumám v ní koncentrační řady pokrývající rozsah biologicky relevantních koncentrací protoporfyrinu IX v buňkách. Zjistila jsem, že doby života protoporfyrinu IX rostou s jeho koncentrací. V THF je nárůst z 8,85 ns na 9,22 ns pod 3 % experimentální nejistotou určení doby života. V DMSO je tento růst z 9,96 ns na 12,29 ns jasně prokazatelný.

Klíčová slova: fluorescence, TCSPC, protoporfyrin IX

Title: Time-Resolved Fluorescence of Protoporphyrin IX

Author: Veronika Kozáková

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., Department of Chemical Physics and Optics

Abstract: The bachelor thesis deals with concentration dependence of endogenous photosensitizer Protoporphyrin IX fluorescence lifetimes in model solutions in THF and DMSO using time-correlated single photon counting technique. Protoporphyrin IX represents a photosensitizer utilized in photodynamic therapy and photodiagnosis of oncologic and other chronic diseases. It is naturally occurring precursor in biosynthesis of heme in cells. Biologically relevant concentration ranges of Protoporphyrin IX were investigated. Increasing lifetimes with increasing concentrations of Protoporphyrin IX were found both in THF and in DMSO. The increase from 8,85 ns na 9,22 ns in the former is under 3 % experimental uncertainty. The increase from 9,96 ns to 12,29 ns is well over the uncertainty in the case of DMSO.

Keywords: fluorescence, TCSPC, Protoporphyrin IX

Názov práce: Časovo rozlíšená fluorescencia protoporfyrínu IX

Autor: Veronika Kozáková

Katedra: Katedra chemickej fyziky a optiky

Vedúci bakalárskej práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., Katedra chemickej fyziky a optiky

Abstrakt: V mojej bakalárskej práci sa zaoberám štúdiom závislostí dôb života fluorescencie endogénneho fotosenzibilizátoru protoporfyrínu IX na koncentrácii v roztokoch THF a DMSO pomocou techniky časovo korelovaného čítania jednotlivých fotónov. Protoporfyrín IX je fotosenzibilizátor využívaný vo fotodynamickej terapii a fotodiagnostike onkologických a iných vážnych ochorení. Zároveň je prirodzene sa vyskytujúcim prekursorom v syntéze hemu vo všetkých bunkách živých organizmov. V práci skúmam koncentračný rad pokrývajúci rozsah biologicky odpovedajúcich koncentracii protoporfyrínu IX v bunkách. Zistila som, že doby života protoporfyrínu IX s jeho koncentráciou rastú. V THF je nárast z 8,85 ns na 9,22 ns pod 3 % experimentálnou chybou určenia doby života. V DMSO je rast z 9,96 ns na 12,29 ns jasne ukázaný.

Kľúčové slová: fluorescencia, TCSPC, protoporfyrín IX

# Obsah

<b>Úvod</b>	<b>2</b>
<b>1 Teoretická časť</b>	<b>3</b>
1.1 Fotodynamická terapia . . . . .	3
1.2 Svetlo a svetelné zdroje . . . . .	5
1.3 Fotosenzibilizátor . . . . .	6
1.4 Protoporfyrín IX . . . . .	7
1.5 Výhody fotodynamickej terapie . . . . .	8
1.6 Fotodiagnostika . . . . .	8
1.7 Fluorescencia . . . . .	10
<b>2 Experimentálna časť</b>	<b>11</b>
2.1 TCSPC . . . . .	11
2.2 Aparatúra . . . . .	11
2.3 Príprava vzoriek . . . . .	11
2.4 Výsledky merania . . . . .	13
<b>Záver</b>	<b>20</b>
<b>Zoznam použitej literatúry</b>	<b>21</b>
<b>Zoznam obrázkov</b>	<b>22</b>
<b>Zoznam použitých skratiek</b>	<b>23</b>

# Úvod

Fotodynamická terapia je moderný spôsob liečby onkologických a iných závažných ochorení. V nej sa využíva oxidatívne poškodenie chorého tkaniva produkciou vysoko reaktívneho singletného kyslíka a voľných radikálov po lokálnom ožiarení fotosenzibilizátorov, ktoré sa prednostne hromadia v postihnutom tkanive. Viditeľná fluorescencia selektívne akumulovaných fotosenzibilizátorov môže byť využitá na diagnostiku a demarkáciu chorého tkaniva vo fotodiagnostike. Fotodiagnostika predstavuje pomerne jednoduchý a najmä rýchly spôsob diagnostiky. V prípade externe podaných fotosenzibilizátorov ich vedľajšie účinky zhoršujú kvalitu života pacientov, predovšetkým fotocitlivosť. Cieľom mojej práce je preto vyvinúť techniku luminiscenčnej detekcie založenej na fluorescencii luminoforov, ktoré sa prirodzene vyskytujú v tkanive a teda nevyžadujú vonkašie podanie fotosenzibilizátorov.

Nízke koncentrácie prirodzených luminoforov umožňujú využitie intenzívneho kontrastu k diagnostike. Je potrebné využívať ďalšie charakteristiky luminiscencie k rozlíšeniu chorého a zdravého tkaniva, napríklad doby života luminoforov. Doby života luminoforov môžu závisieť na vlastnostiach okolitého prostredia, ktoré sa pri zdravom a chorom tkanive môžu líšiť. Jeden z prirodzene sa vyskytujúcich luminoforov je protoporfyrín IX. Je to prekursor v biosyntéze hemu prítomný vo všetkých bunkách.

Úlohou bakalárskej práce je zoznámiť sa s princípmi fotodynamickej terapie a prednostne fotodiagnostiky a rešerše doterajších výsledkov. Na štúdium dôb života luminiscencie sa využíva technika časovo korelovaného čítanie fotónov (TCSPC). Zvládnutie tejto techniky je jednou z úloh práce. Hlavnou úlohou je meranie závislosti dôb života protoporfyrínu IX v rôznych roztokoch na jeho koncentrácii. Vybranými roztokmi sú tetrahydrofurán (THF) a dimetyl sulfoxid (DMSO). Koncentračný rad odpovedá biologicky relevantnej koncentrácii protoporfyrínu IX v bunkách pri rôznych podmienkach.

# 1. Teoretická časť

## 1.1 Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia je minimálne invazívna liečebná metóda, ktorá sa využíva pri liečbe mnohých onkologických a ďalších závažných ľudských ochorení.

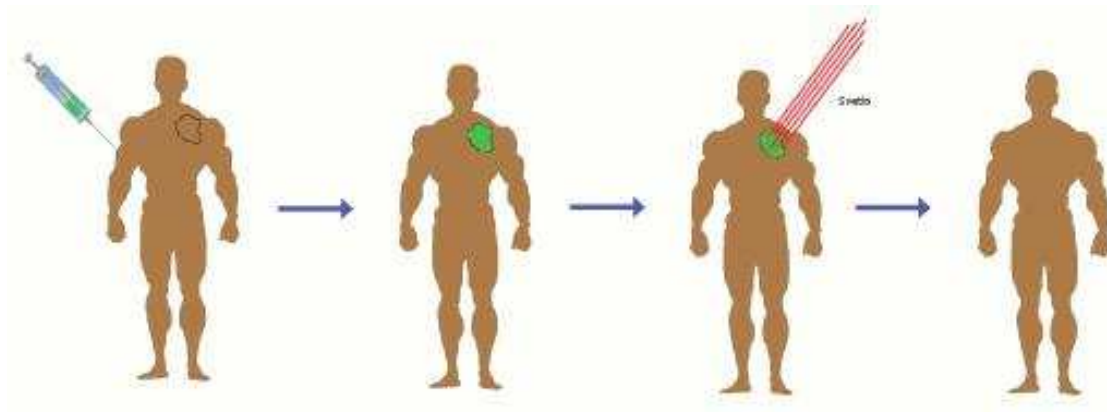
Pri tejto metóde dochádza k zahubeniu nádorového tkaniva produkciou vysoko reaktívnych alebo toxických látok po absorpcii svetelnej energie fotosenzibilizátorom. Dôležitá je produkcia reaktívnych substancií, medzi ktoré patrí aj singletný kyslík a mnoho voľných radikálov vo fotoefekte prvého typu. Odumretie nádoru je vždy dôsledkom reaktívnych látok, ktoré spôsobujú odumieranie tkaniva.

Liečebný proces prebieha v dvoch základných fázach. Ako schematicky vidíme na obrázku 1.1. Najprv sa pacientovi podá liek, fotosenzibilizátor. Ten sa môže aplikovať rôznymi spôsobmi. Priamo na postihnuté miesto na koži sa naniesie vrstva krému, v ktorom je táto daná látka obsiahnutá. Alebo sa fotosenzibilizátor podá injekčne do žily poprípade priamo do postihnutého tkaniva.

Existujú dva mechanizmy ako v cieľovom tkanive dochádza k hromadiu fotosenzibilizátoru. V prípade protoporfyrínu IX ide o to, že postihnuté tkanivo nie je schopné fotosenzibilizátor dostatočne rýchlo metabolizovať na neškodné produkty. Je to tým, že v prípade rakovinomerného tkaniva, v ktorom sa akumuluje protoporfyrín IX, sú narušené funkcie enzýmov, ktoré zabudovávajú železo do protoporfyrínu IX a robia z neho hem.

Iný spôsob je, že všetky bunky odbúravadajú fotosenzibilizátor rovnako, avšak rakovinomerné bunky ho prijímajú vo väčšej miere. Súvisí to s tým, že rakovina je neoplastické tkanivo, ktoré v tele rýchlo rastúce. Tkanivo potrebuje veľa živín, aby bolo schopné rýchlo rásť. Potrebné látky si berie z krvného riečiska na stavbu ďalších buniek, ktoré rýchlo rastú a tie si vyberajú z krvi veľké molekuly, napr. hematoporfyrín. V postihnutom tkanive sa fotosenzibilizátor kumuluje, v dôsledku pozmeneného metabolizmu a morfológie chorého tkaniva. Dosiahnutie dostatočne vysokej potrebnej koncentrácie trvá niekoľko hodín až pár dní (cca dva až tri). [1, 2]

Keď je koncentrácia fotosenzibilizátoru v postihnutom tkanive niekoľko násobne vyššia ako koncentrácia v okolitom zdravom tkanive, liečebný proces po-



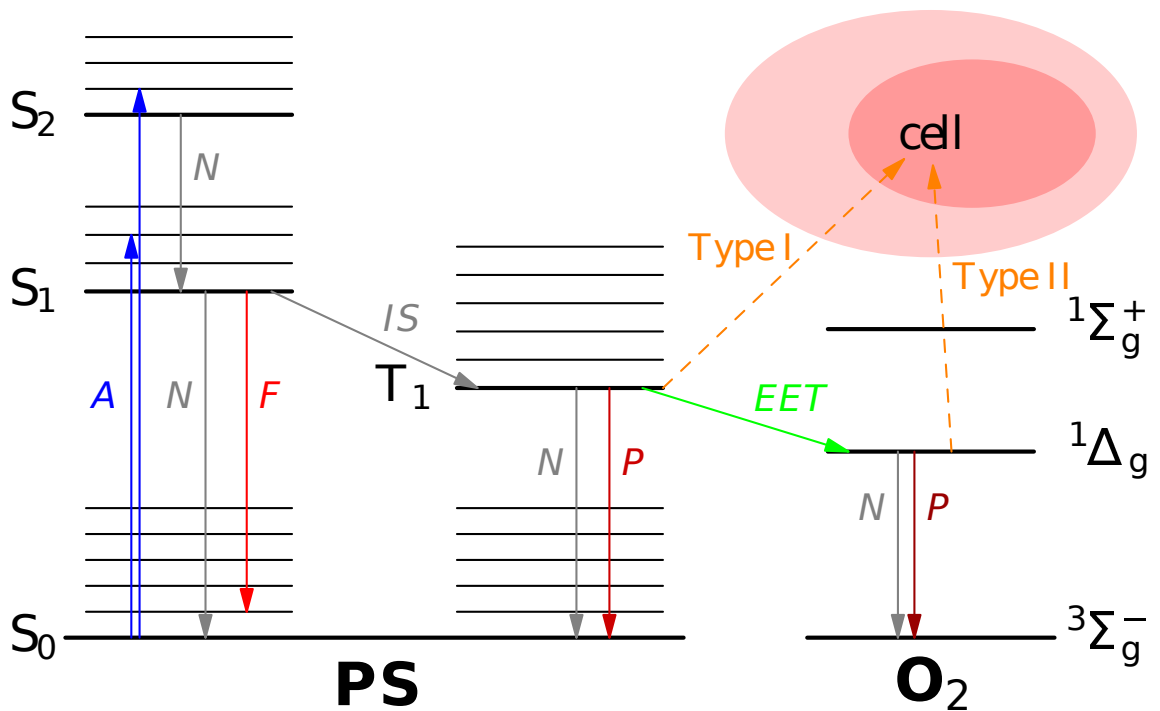
Obr. 1.1: Schematicky priebeh fotodynamickéj terapie. Obrázok prevzatý [3]



kračuje ožarovaním postihnutých miest svetlom, ktoré je pohlcované molekulami fotosenzibilizátoru. Fotosenzibilizátor tak získa energiu a prejde zo základného singletného stavu. Optický prechod do tripletného stavu je zakázaný, pretože interakcia žiarenia so spinovou časťou vlnovej funkcie je veľmi nízka. Pravdepodobnosť, že bude prechod absorbovať priamo do tripletného stavu je veľmi nízka. Fotosenzibilizátory absorbujú zo základného singletného stavu do excitovaného singletného stavu, ktorý je vyšší ako tripletný. Singletný stav absorbuje do singletného stavu. On môže prejsť do tripletného stavu vďaka spin-orbitálnej väzbe. Alebo môže relaxovať do základného stavu žiarivo, čím dochádza k fluorescencii fotosenzibilizátoru. Pozorovanie tejto viditeľnej fluorescencie je možné využiť vo fotodiagnostike. Fosforescencia je prechod z tripletného stavu do singletného. Vyžaduje si zmenu spinovej časti vlnovej funkcie a to je málo pravdepodobné oproti fluorescencii. Fotosenzibilizátor prechádza do singletného excitovaného stavu, ktorý potom tzv. medzisystémovou konverziou môže prejsť do tripletného stavu. V tomto stave je schopný reagovať s okolitými molekulami vďaka tomu, že má výrazne dlhšiu dobu života ( $\mu\text{s}$ ) oproti singletnému základnému stavu (ns). [1, 4]

Excitovaný stav, do ktorého prešlo farbivo medzisystémovou konverziou, je tripletný. Tento stav nebude prednostne reagovať s molekulami, ktoré sú v singletnom stave, pretože by muselo dôjsť k vzniku produktov v tripletnom stave, čo chemicky nie je veľmi pravdepodobné. Fotosenzibilizátor pravdepodobnejšie odovzdá energiu kyslíku, ktorý je tiež v tripletnom stave a je prirodzene pomerne bohato zastúpený v bunkách ľudského tela. Vďaka tomu, že sú obe molekuly v tripletnom stave dôjde k triplet-tripletnej anihilácii. Je to proces, ktorý je povolený spinovými pravidlami. Celkový spinový stav systému fotosenzibilizátor a kyslík, zostane zachovaný v prípade, kedy sa elektrón so spinom nahor vo fotosenzibilizátore vymení s elektrónom v kyslíku so spinom dolu. Celkový spinový stav všetkých elektrónov sa nezmení, len sa vymenia pozície elektrónov, ktoré sú vo fotosenzibilizátore a v kyslíku. Preto je tento proces povolený. Dôjde k tomu, že fotosenzibilizátor sa deexcituje do svojho základného singletného stavu. Kyslík sa z tripletného stavu dostane do excitovaného singletného stavu. Molekula kyslíku v singletnom stave je o niekoľko rádov reaktívnejšia ako tripletný stav molekuly kyslíka. Tento singletný kyslík oxiduje molekuly v bunkách cieľového tkaniva. Toto oxidatívne poškodenie vedie k apoptóze alebo nekróze buniek. Tento jav nazývaný fotoefekt II typu je zobrazený na obrázku 1.2 .

Poznáme aj fotoefekt I typu. Fotosenzibilizátor v tripletnom stave priamo reaguje s biomolekulami v tkanive v procesoch s prenosom náboja. Generuje pri nich rôzne voľné radikály. Tieto radikály reagujú s okolitými molekulami, čo spôsobuje závažné porušenie vitálnych biologických procesov v liečenom tkanive. [5, 6]



Obr. 1.2: Jablonského schéma hladín fotosenzibilizátoru kyslíku a prenosu energie. Obrázok demonštruje fotoefekty prvého a druhého druhu. A - absorpcia, F - fluorescencia, N - nežiarivé prechody, P - fosforescencia, EET - prenos excitačnej energie. Obrázok je prevzatý z [5]

## 1.2 Svetlo a svetelné zdroje

Pri liečbe nádoru, ktorý sa nenachádza na povrchu ľudského tela musí svetlo prejsť cez zdravé tkanivo až k chorým bunkám. Záleží na hĺbke umiestnenia tkaniva a na použítom fotosenzibilizátore. Využíva sa svetlo vo viditeľnej oblasti spektra 380–700 nm. Ľudské telo obsahuje mnoho látok, ktoré absorbujú vo viditeľnej oblasti. Ide napr. o látky: hemoglobín v krvi, melanín v koži. Aj rozptyl žiarenia na makromolekulách alebo absorpcia vody prispievajú k tomu, že najmenej pohlcované je svetlo v červenej oblasti. Buď z viditeľnej oblasti 620–700 nm alebo aj blízke infračervené svetlo 700–1000 nm.

Z viditeľnej oblasti je najvýhodnejšie červené svetlo, pretože preniká najhlbšie do živého tkaniva, typicky ide o 3–4 cm pre vlnové dĺžky okolo 800 nm. Na ožarovanie postihnutého tkaniva sa využívajú rôzne svetelné zdroje – laser, LED a lampy s predradenými filtermi, ktoré filtrujú správnu oblasť vlnových dĺžok. (volfrámová lampa, argónová výbojka). [2]

Laser je zdroj monochromatického a elektromagnetického žiarenia. Najväčšou výhodou laserov je ich schopnosť emitovať veľmi intenzívne a spektrálne úzke svetlo, avšak bývajú pomerne drahou záležitosťou. Liečia sa s nimi povrchové nádory, ale aj tumory vzniknuté niekde v hlbšie v tele. Tu sa využíva endoskop. Endoskop je prístroj s optickými vláknami, pomocou ktorého sa svetlo dostane až k nádoru, ktorý je vo vnútri pacienta. Laserové diódy sú tiež užitočné. Majú úzku oblasť vlnových dĺžok, v ktorých svietia. Nie je nutné používať filter pred širokospektrálnou lampou.

LED (ang. Light-Emitting Diode), dióda emitujúca svetlo, má výhodu oproti

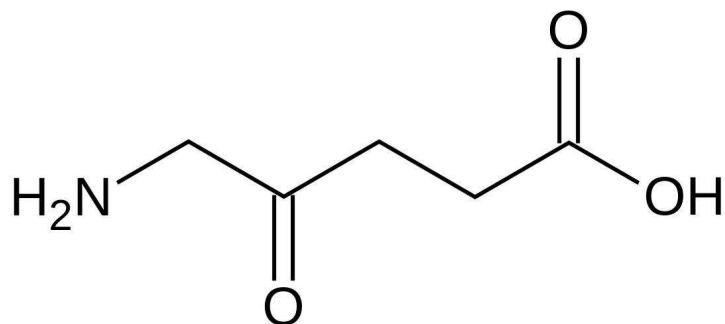
laserom najmä v cene. Je podstatne lacnejšia, čo je v prípade využitia v medicíne veľmi dôležité. Lineárny zväzok lúčov sa využíva pri metóde liečenia endoskopicky alebo intersticiálne. Limitujúca je relatívne malá účinnosť bežných LED diód. [1]

### 1.3 Fotosenzibilizátor

Existuje široké spektrum molekúl, ktoré môžu byť využívané ako fotosenzibilizátory. Tieto látky však musia splňovať určité vlastnosti, aby sa dali použiť. V prvom rade používaný fotosenzibilizátor nesmie za tmy byť toxická látka. Mal by byť stabilného charakteru so známou chemickou štruktúrou. Toxickým sa stáva až po ožiarení vhodným svetlom. Dôležitá je aj vysoká schopnosť generovať singletný kyslík. Mal by sa ľahko vylúčiť z organizmu. Ďalej by sa mal hromadiť najmä v nádorových bunkách a v okolitom zdravom tkanive by mala byť jeho koncentrácia výrazne nižšia.

Fotosenzibilizátory sa rozdeľujú napr. na endogénne a exogénne, taktiež poznáme prvú alebo druhú generáciu fotosenzibilizátorov. Všetky fotosenzibilizátory prvej generácie sú derivátmi hematoporfyrínu. Málo však absorbujú a po ich aplikácii ostáva dlhšiu dobu fotocitlivosť tkaniva po terapii. Fotofrin radíme do prvej generácie fotosenzibilizátorov. Má hlavnú nevýhodu, že pacient je pomerne dlhý čas (niekoľko týždňov) fotosenzibilný po skončení liečebného úkonu. Pri vlnovej dĺžke červeného svetla (630nm) má menšiu schopnosť absorpcie. Aj napriek tomu sa však často využíva pri liečbe rakovinových ochorení.

Druhá generácia fotosenzibilizátorov má nevýraznú fotosenzitivitu po aplikovaní liečby. Dokáže viac či menej efektívne absorbovať svetlo z širšieho rozsahu vlnových dĺžok a tým aj hlbšie preniká do tkaniva. Dokáže generovať viac singletového kyslíka a tým pádom sa kumulovať v nádorovom tkanive. Zaraďujeme tu napr. Foscan, ktorý je veľmi efektívny pri 652nm. Pacient ostáva fotocitlivý ešte asi dva týždne po danej liečbe. [2] [5]

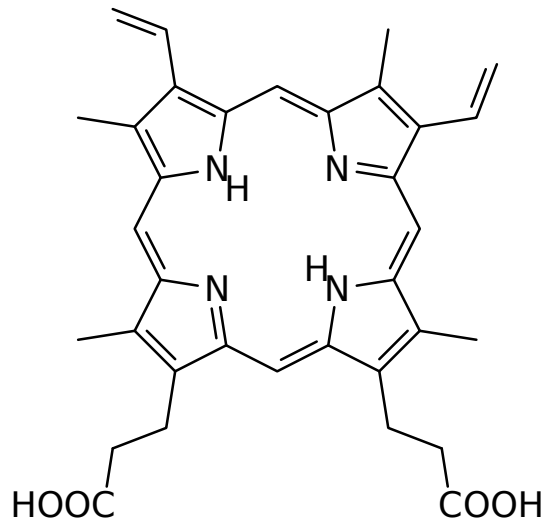


Obr. 1.3: Delta-aminolevulová kyselina. [8]

## 1.4 Protoporfyrín IX

Delta-aminolevulínovú kyselinu (ALA) zobrazenú na obrázku 1.3, niekedy tiež označovanú ako kyselinu 5-aminolevulínovú, radíme do druhej generácie. Je to prírodný biochemický prekursor hemoglobínu. Komerčne vyrábané liečivá Levulan a Metvix sú prekurzormy protoporfyrínu IX a obsahujú delta-aminolevulovú kyselinu. [7]

Protoporfyrín IX, obrázok 1.4, je prirodzene sa vyskytujúci endogénny fotosenzibilizátor. Je súčasťou bežných procesov v bunkách, preto je prirodzenou súčasťou ľudského organizmu. Protoporfyrín IX vzniká z delta-aminolevulovej kyseliny. Je to tetrapyról. Na začiatku celého procesu je ALA. Tieto dve ALA kyseliny spolu kondenzujú na porfobilinogén. Takto štyri vzniknuté molekuly sa spoja dohromady a vznikne hydroxymethylbilan. Oxidáciou a modifikáciami bočných reziduí vzniká cez mnoho medziproduktov protoporfyrín IX. Z toho sa potom oxidáciou, kde vznikajú ďalšie dvojité väzby, vytvorí protoporfyrín IX. Je produktom metabolickej dráhy hemoglobínu. Zdravé tkanivo si zo všetkých protoporfyrínov IX vyrobí hem, ktorý nie je škodlivý. Choré tkanivo to však nedokáže. Má málo železa, ktoré by mohlo do tohto procesu dať. Enzým ferochelatáza, ktorý tento proces zaisťuje, je tu oveľa menej aktívny ako v zdravých bunkách. Je to spôsobené najmä tým, že choré bunky sú zamerané na rast, ktorý je veľmi rýchly. Tým pádom preferenčne vyrábajú enzýmy potrebné pre rast. Preto po aplikácii ALA je jej v chorom tkanive viac. Aplikácia ALA tak vedie k zvýšenej koncentrácii protoporfyrínu IX v nádorovom tkanive oproti zdravému. Protoporfyrín IX sa v klinickej praxi aktivuje ožarovaním pomocou svetla s vlnovou dĺžkou 628nm. Okrem liečby vnútorných orgánov, sa často využíva aj v dermatológii. [9]



Obr. 1.4: Molekula protoporfyrínu IX prevzatá z [5]

## 1.5 Výhody fotodynamickej terapie

Fotodynamická terapia má viacero výhod. V prvom rade je to minimálne invazívna liečebná metóda, na povrchu tela úplne neinvazívna. Pri využití pre diagnostiku získavame takmer okamžitú informáciu. Po aplikácii fotosenzibilizátora sa protoporfyrín akumuluje zhruba dve hodiny. Vieme teda, či je tkanivo nádorové alebo nie je. Pri tejto diagnostike je zaznamenaných minimum vedľajších účinkov. Nevýhodou môže byť krátka fotocitlivosť, ktorá nastáva po aplikácii fotosenzibilizátora. Pri liečebnom procese pacient nepociťuje veľkú bolesť. Nie je potrebná anestézia ani silné sedatíva. Liečbu pomocou fotodynamickej terapie je možné opakovať po nie dlhom časovom odstupe znovu. Má totiž krátku dobu rekonvalescencie. [2, 11]

## 1.6 Fotodiagnostika

Viditeľná fluorescencia fotosenzibilizátora preferenčne akumulovaného v nádorovom tkanive môže byť využitá k diagnostike v metóde nazývanej fotodiagnostika alebo fotodynamická diagnostika.

V prípade použitia fotosenzibilizátora pri diagnostike môžeme využiť ustálenú fluorescenciu na zobrazenie nádoru pomocou fotografie. Pri využívaní fluorescencie na diagnostiku rôznych ochorení, je veľmi dôležitá dokumentácia. Kvalitná fotografia pri diagnostike je veľmi nápomocná a štandardne patrí k lekárskej dokumentácii. K vytvoreniu takýchto fotografií sa používajú moderné digitálne fotoaparáty. Tieto zariadenia vytvárajú kvalitné obrázky s vysokým rozlíšením. Vďaka tomu je možné zachytiť fluorescenciu fotosenzibilizátorov. [2, 10]

Pre pacienta, ktorý ďalej nemá byť liečený fotodynamickou terapiou, je zbytočné, aby bol zaťažovaný pridaním fotosenzibilizátora. Toto použitie mu zníži kvalitu života kvôli fotocitlivosti, ktorá sa vyskytuje po podaní fotosenzibilizátora. Takže k diagnostike je lepšie využiť prirodzene sa vyskytujúce luminofory v ľudskom tkanive. Jedným z týchto luminoforov je protoporfyrín IX. Má charakteristické fluorescenčné spektrum na maxime o vlnovej dĺžke 635nm. Intenzita



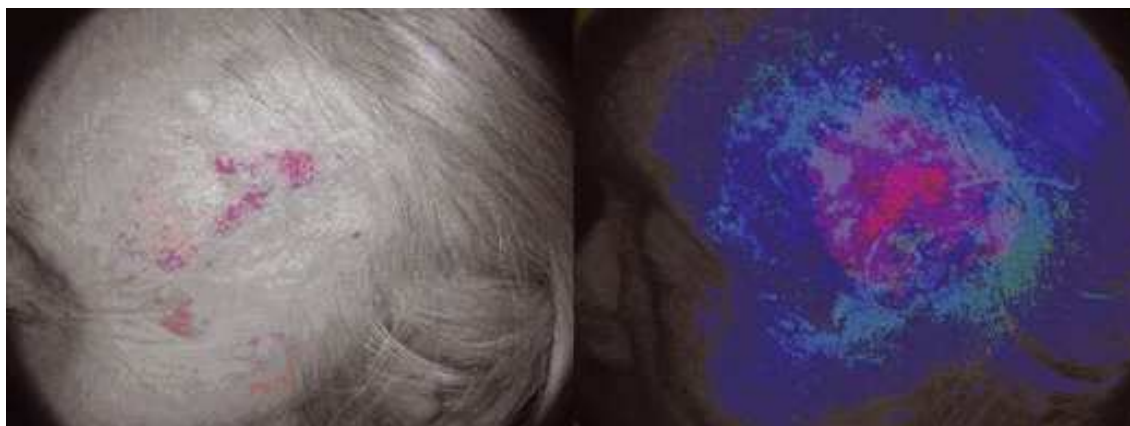
Obr. 1.5: Prístroje na zachytenie fluorescence. [7]

fluorescencie nemusí korelovať s tým, či dané tkanivo je alebo nie je rakovinotvorné, pretože ľudia všeobecne majú rôznu prirodzenú koncentráciu protoporfyrínu IX v tele. V prípade, keď nie je aplikovaný prekursor fotosenzibilizátoru, je jeho koncentrácia v nádorovom tkanive rovnaká ako koncentrácia v zdravom tkanive. Tu sa naskytuje možnosť využitia časovo rozlíšeného merania fluorescence, ktoré môže poskytnúť kontrast medzi zdravým a chorým tkanivom. Pozeráme sa preto nie na intenzitu luminiscencie, ale na doby života luminiscencie. Doby života luminiscencie v sebe odrážajú prostredie, v akom sa nachádza daná molekula. Snažíme sa zistiť, či je možné na základe dôb života protoporfyrínu IX rozlíšiť choré a zdravé tkanivo. [2]

Curalax je výrobca, ktorý ponúka zariadenia detekujúce fluorescenciu. Je s ním ľahká manipulácia a hlavne sa získavajú kvalitné fotografie. Eliminuje totiž rozmazanie snímky. Využíva rôzne filtre, pomocou ktorých minimalizuje reflexiu excitovaného svetla.

Inou metódou na získanie kvalitných snímok je využitie jednoúčelových fluorescenciu detekujúcich zariadení. Obvykle pozostáva z rady snímačov spojených s detektorom. Obsahuje aj rôzne svetelné zdroje a systém šošoviek. Zdroje zahŕňajú viditeľné svetlo a UV. Nevýhodou je, že môžeme mať rozmazaný obrázok. Pri snímaní totiž držíme zariadenie v ruke, čo nemusí byť úplne stabilné.

Ďalej sa na zaznamenávanie používajú CCD kamery. Sú to kamery s rôznymi filtermi. Intenzita môže byť detekovaná na ploche. Analýza dát prebieha pomocou špeciálneho softvéru, kde je k počítaču pripojená táto kamera. Data sú zobrazované pomocou odtieňov sivej farby. Každý pixel zodpovedá danej hodnote meranej intenzity. [7]



Obr. 1.6: Fluorescencia zachytená digitálnym fotoaparátom. [7]

## 1.7 Fluorescencia

Fluorescencia je druh luminiscencie. Je to emisia látky, ktorá absorbuje svetlo a elektromagnetické žiarenie. Fluorescenciu môžeme pozorovať, keď elektrón z orbitálneho obalu molekuly alebo atómu relaxuje do svojho základného stavu za súčasného vyžiarovania fotónu. Doba života je priemerný čas, kedy molekula ostáva v excitovanom stave, skôr ako emituje fotón. Prirodzená doba života excitovaného stavu molekuly, ktorá nie je narúšaná zrážkami, je rádovo nanosekundy. Excitované molekuly svoju energiu strácajú zrážkami, takže dochádza k zrážkovému zhášaniu fluorescence. Pri väzbe molekúl na niektoré zhášače môže dochádzať k statickému zhášaniu fluorescence. Doba života fluorescence môže závisieť aj na vlastnostiach okolia, ako je napr. polárnosť prostredia.

Doby života fluorescence môžu odrážať vlastnosti prostredia, v ktorom sa nachádza molekula. Ak sa tieto vlastnosti prostredia zásadne líšia medzi chorým a zdravým tkanivom, môže byť doba života fluorescence využitá k fotodiagnostike.

Existuje niekoľko pravidiel, ktorými sa fluorescence riadi. Najznámejšie je Kasha-Vavilovo pravidlo. Hovorí o tom, že kvantový výťažok luminiscencie nezávisí na vlnovej dĺžke vzbuđeného žiarenia. [1, 10]

## 2. Experimentálna časť

### 2.1 TCSPC

Časovo korelované čítanie jednotlivých fotónov je jednou z metód merania dôb života fluorescence v časovej doméne. Princíp je v tom, že sa vzorka veľmi krátkym pulzom svetla excituje. Pulz zároveň spúšťa časovú rampu v detekčnom prístroji. Vo chvíli, keď je detekovaný fotón emitovaného žiarenia je zastavená časová základňa. Vzhľadom k tomu, že fluorescencia je stochastický proces, histogram početnosti časov odpovedá luminiscenčnej kinetike. Je potrebné nastaviť detekciu tak, aby na 100 excitácii bol detekovaný len jeden luminiscenčný fotón. Stanovené pravidlo zaisťuje, že pravdepodobnosť detekcie alebo vyžiarenia dvoch fotónov v priebehu jedného excitačného cyklu je zanedbateľná. V dôsledku toho, že meranie zastavuje prvý prichádzajúci fotón, neboli by fotóny vyžiarené v neskorších časoch detekované, čím by sa výsledná kinetika javila kratšia. [2, 10]

### 2.2 Aparatúra

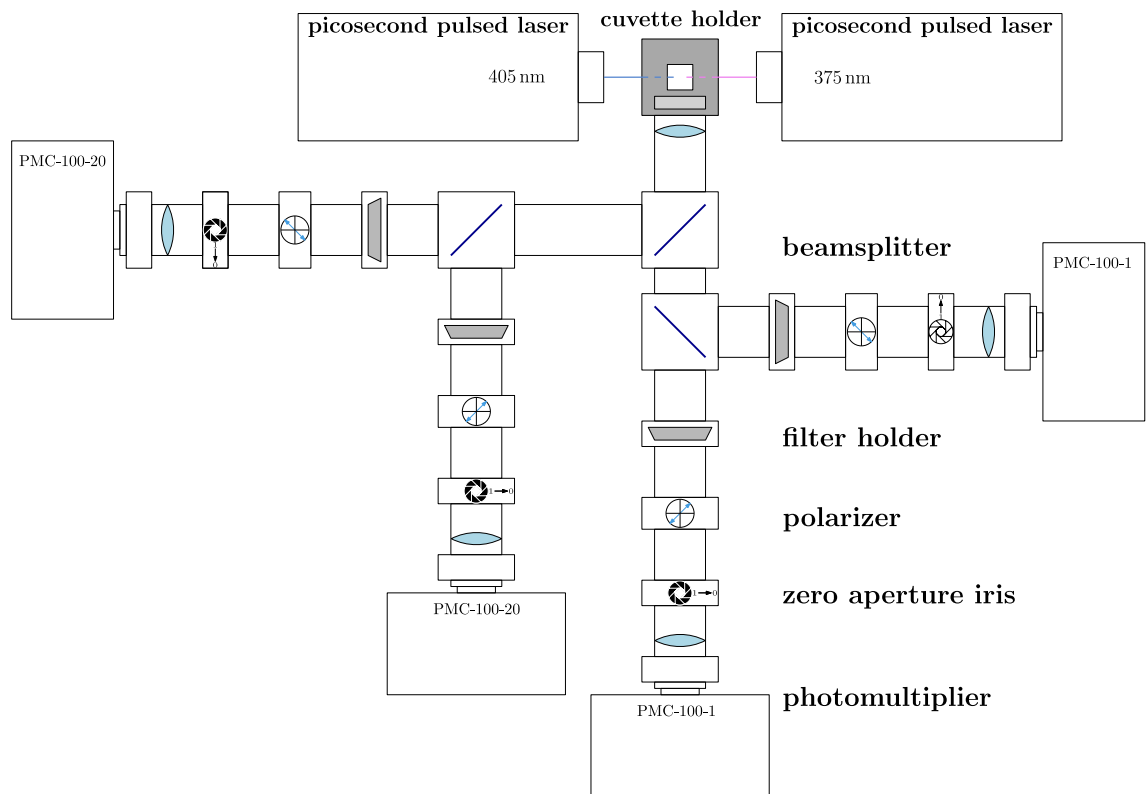
Aparatúra na obrázku 2.1 je štvorkanálový systém na detekciu časovo rozlišiteľnej luminiscencie so štyrmi fotonásobičmi Becker-Hickl PMC-100. V tejto práci sa využíva iba jeden kanál s luminiscenčným filtrom RG-610 od firmy Edmund Optics, ktorý prepúšťa žiarenie s vlnovými dĺžkami dlhšími ako 610 nm. Vzorky sú excitované pikosekundovým pulzným laserom BDL-405-SMC s vlnovou dĺžkou 405 nm a šírkou pulzu 50–90 ps od firmy Becker-Hickl. Fluorescencia vzorky je rozdelená do všetkých štyroch kanálov. Svetlo sa do fotonásobiča zbiera pomocou šošovky a filtra, ktoré obsahuje každý kanál. Sú tam taktiež polarizátory, ktoré umožňujú merať fluorescenciu pod magickým uhlom, čím sa odstraňuje vplyv fluorescencenej anizotropie. Dva moduly DCC 100 v počítači sa používajú k ovládaniu chladenia a zisku fotonásobičov. K časovo korelovannej detekcii fotónov sa využíva modul SPC 130 od firmy Becker-Hickl. Čítajú sa doby detekcie fotónov po excitačnom pulze a ich histogram odpovedá luminiscenčnej kinetike, z ktorej je možné určiť dobu života. Signál je z štyroch detektorov prenášaný do modulu SPC 130 pomocou routra HRT-41.

Charakteristiku a sledovanie možnej fotodegradácie robíme pomocou merania absorpčných a fluorescenčných spektier pred a po meraní časovo rozlišiteľnej fluorescence. Absorpčné spektrá meriame na prístroji SPECORD 250 od firmy Analytik Jena. Fluorescenciu meriame pri excitácii kontinuálnym laserom LDM405 od firmy Omikron s vlnovou dĺžkou 405 nm spektrometrom AVANTES AvaSpec-2048.

### 2.3 Príprava vzoriek

Pripravila som si 20 ml zásobného roztoku protoporfyrínu IX s koncentráciou 100  $\mu\text{M}$ . Rozpustila som  $(1,42 \pm 0,02)$  mg protoporfyrínu IX v 25,35 ml THF (tetrahydrofuran). Z pripraveného zásobného roztoku som si postupne rozriedila koncentračný rad. A to koncentrácie 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ .





Obr. 2.1: Schéma aparatury na meranie TCSPC. [4]

Pre bunky pestované v kultúre ľudských fibroblástov v exponenciálnej fáze rastu je prirodzená koncentrácia protoporfyrínu IX  $0,5 \mu\text{M}$ . V normálnych bunkách v stacionárnej fáze je koncentrácia protoporfyrínu IX  $5 \mu\text{M}$ . Tá istá koncentrácia protoporfyrínu IX je v bunkách, ktoré boli kultivované s ALA v exponenciálnej fáze rastu. Pri týchto bunkách, kultivovaných s ALA, koncentrácia v stacionárnej fáze rastu odpovedá mojej maximálnej koncentrácii, teda  $100 \mu\text{M}$ . [12] Ostatné koncentrácie som zvolila na doplnenie koncentračného radu.

Vyrobila som si ďalší  $100 \mu\text{M}$  zásobný roztok v DMSO (dimetylsulfoxid). Rozpustila som  $(0,69 \pm 0,02)$  mg protoporfyrínu IX v  $12,32$  ml rozpúšťadla DMSO. Riedením s čistým rozpúšťadlom som vytvorila rovnaký koncentračný rad ako v prípade THF. DMSO je, narozdiel od THF, kompatibilný s biologickým prostredím. Umožňuje to využitie pre medicínske aplikácie.

## 2.4 Výsledky merania

Pre každú koncentráciu pri oboch rozpúšťadlách, THF aj DMSO, som urobila charakterizáciu vzoriek pomocou absorpčnej a fluorescenčnej spektroskopie ešte pred meraním časovo rozlíšenej fluorescence. Tieto spektrá vylučujú prítomnosť nečistôt v meraných roztokoch. Absorpčné a fluorescenčné spektrum som merala vždy aj po zmeraní časovo rozlíšenej luminiscencie.

Obrázok 2.2 ukazuje typické absorpčné spektrum protoporfyrínu IX v THF pred a po meraní pri koncentrácii 30  $\mu\text{M}$ . Namerané krivky sú rovnaké. To indikuje, že nedošlo k fotodegradácii ani k tvorbe fotoproduktov v priebehu merania. Pre ostatné koncentrácie a rozpúšťadlá boli výsledky obdobné. Absorpčnému spektru dominuje silný Soretov absorpčný pás s maximom 407 nm. Vlnová dĺžka excitačného laseru bola vybraná, aby spadala do silného absorpčného pásu. Slabšie pásy na väčších vlnových dĺžkach sú tzv.  $Q_y$  a  $Q_x$  pásy.

Obrázok 2.3 zobrazuje typické fluorescenčné spektrum rovnakej vzorky ako obrázok 2.2. Krivky sa opäť nelíšia, čo dokumentuje, že počas merania nedošlo k tvorbe žiadneho fotoproduktu. Fluorescenčnému spektru dominuje charakteristický pás s maximom na 633 nm.

Následne som merala časovo rozlíšenú fluorescenciu. Pre každú vzorku som nastavila počet pulzov tým spôsobom, aby nedochádzalo k pulsu pile up-u. Frekvencia excitácie je  $2 \times 10^7$  Hz. K tomu nastavíme intenzitu excitačného laseru a clonu tak, aby v detekčnom kanáli bolo detekovaných približne  $2 \times 10^4$  pulzov za sekundu. Tým je splnené empirické pravidlo, že poklesy nebudú zafaržené efektom pile up-u.

Merala som IRF (Impulse response function) ako rozptyl excitačného svetla na roztoku ludoxu bez emisného filtra v detekčnom kanáli. Typická IRF pre rovnakú vzorku je obrázku 2.5.

Namerané dáta spracujeme pomocou programu trfit, ktorý do dat nafituje konvolúciu jednoexponenciálneho poklesu s príslušnou IRF. Obrázok 2.6 ukazuje typický výstup programu trfit. V tomto prípade je to pre rovnakú vzorku ako pri obrázku 2.2 a 2.3. Problém je s určovaním pozadia, pretože doba života luminiscencie protoporfyrínu IX je dlhšia ako je perióda medzi jednotlivými pulzmi. Signál pred narušením luminiscencie pri excitačnom pulze preto neodpovedá temnému pozadiu, ale koncu kinetiky z predchádzajúceho excitačného cyklu.

Pre určenie chýb merania som urobila meranie jednej vzorky desaťkrát, aby som zistila ako veľmi sa od seba jednotlivé merania odlišujú. Toto opakované meranie som vykonala pre dve rôzne nastavenia clony. Výsledky dokumentuje obrázok 2.7. Merania jeden až desať odpovedajú otvorenej clone a merania jedenásť až dvadsať zase privretej clone. Obrázok ukazuje, že rozdiely výsledkov získané pri pevnom nastavení clony sú omnoho menšie ako rozdiely, ktoré spôsobuje rôzne nastavenie clony. Preto je celková chyba jednotlivých meraní pri rôznych koncentráciách daná predovšetkým neistotou spôsobenou rôznym neznámym nastavením clony pri meraní rôznych koncentrácií. Táto hodnota je určená ako 3% zo zmeranej doby života.

Vplyv otvorenia clony na doby života je taký, že v prípade slabších vzoriek, ktoré menej luminiskujú (majú nižšiu intenzitu luminiscencie) musela byť clona otvorená viac a teda je skutočná doba života skôr kratšia ako nameraná doba života. Na druhej strane pri koncentrovanejších vzorkách, kde je intenzita lumi-

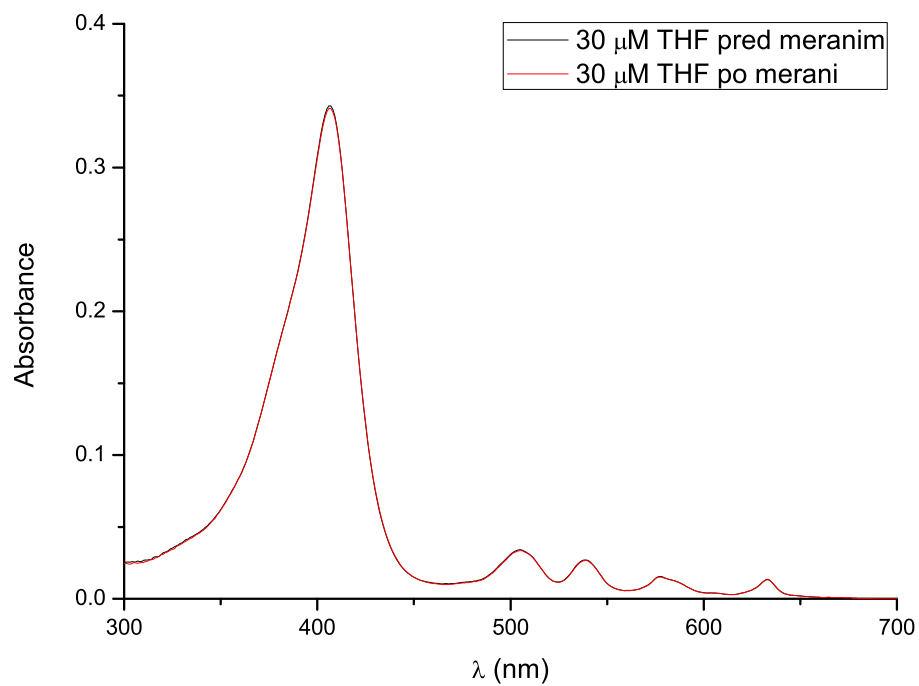
niscencie vyššia a clona musí byť pri meraní viac privretá, bude skutočná doba života luminiscencie dlhšia ako je zdanlivá nameraná doba. To odpovedá efektu dokumentovanom na obrázku 2.7 .

Obrázok 2.8 ukazuje koncentračnú závislosť dôb života protoporfyrínu IX v THF. Doby života s rastúcou koncentráciou vykazujú náznak rastúceho trendu z 8,85 ns na 9,22 ns, ale tento trend je bohužiaľ v rámci neistoty merania.

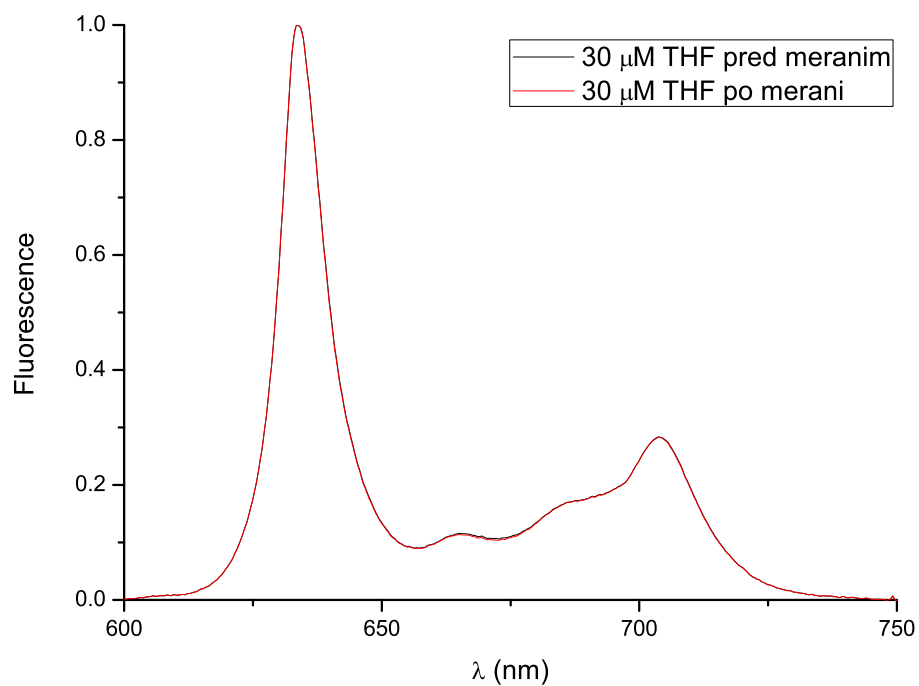
Obrázok 2.9 ukazuje rovnakú koncentračnú závislosť v DMSO, kde je trend rastu dôb života s rastúcou koncentráciou protoporfyrínu IX z 9,96 ns na 12,29 ns už nad neistotou určenia dôb života.

Po zistení rozdielov koncentrácie protoporfyrínu IX v roztokoch, sa naskytuje otázka, ako sa prejavuje rôzna koncentrácia protoporfyrínu IX v bunkách na dobách života. Obdobné merania dôb života s rôznou koncentráciou protoporfyrínu IX v bunkových kultúrach zdravých a rakovinotvorných bunkách *in vitro* budú nasledovať.

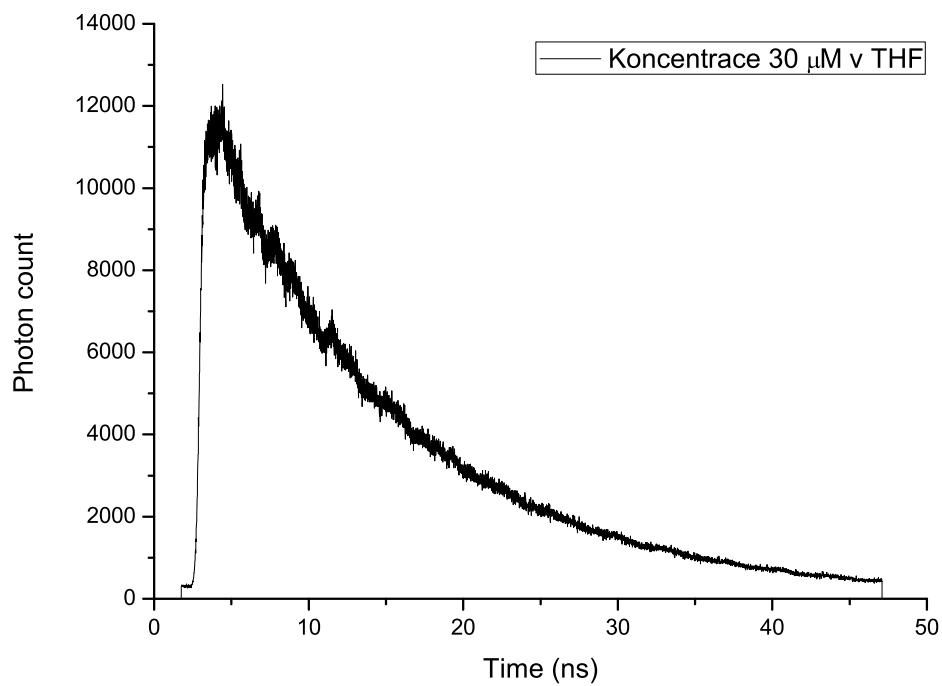
Posledná úloha, prispôbenie zberného systému aparatúry pre meranie so svetlovodom, nebola s časových dôvodov splnený. Pretože v laboratóriu prebiehali stavebné úpravy vynútené nákupom nových investičných celkov z OP VaVpI.



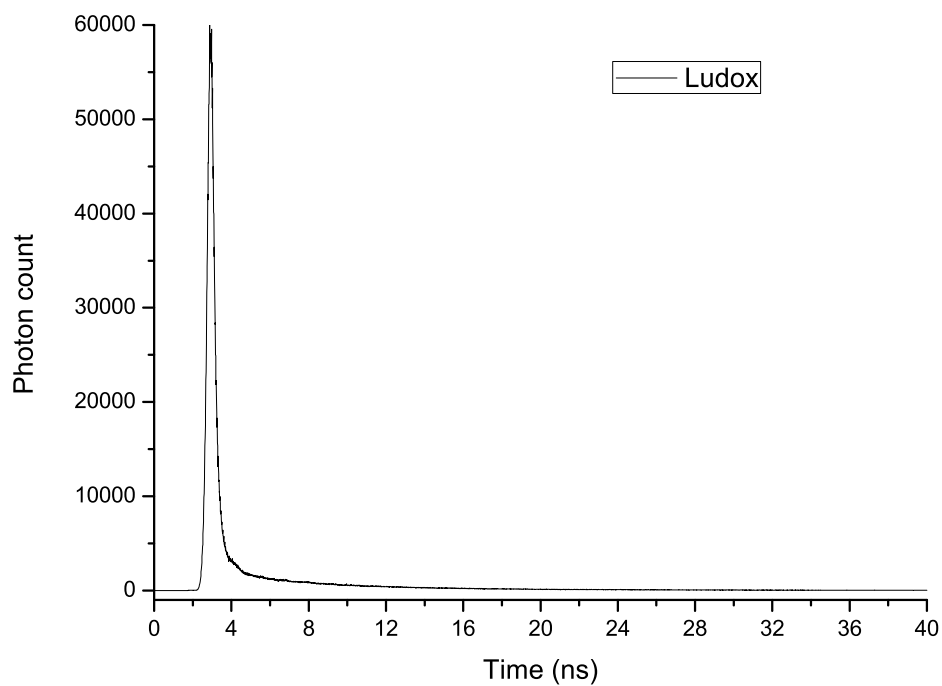
Obr. 2.2: Absorpčné spektrum 30  $\mu$ M roztoku PPIX v THF pred a po meraní



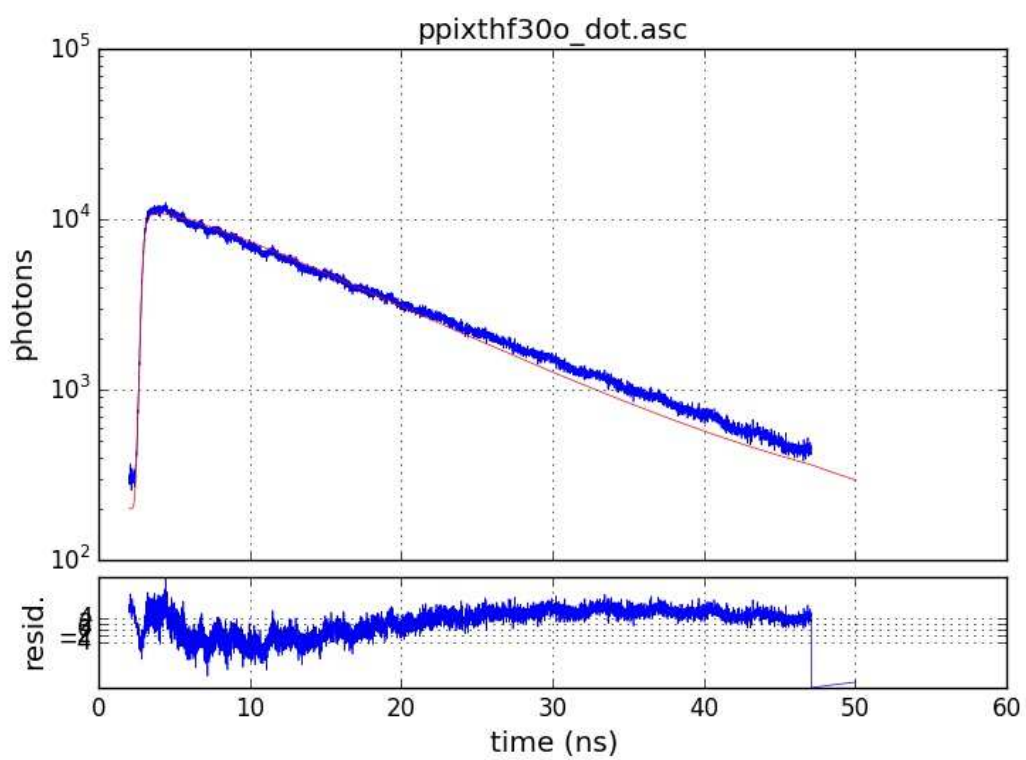
Obr. 2.3: Fluorescenčné spektrum 30  $\mu$ M roztoku PPIX v THF pred a po meraní



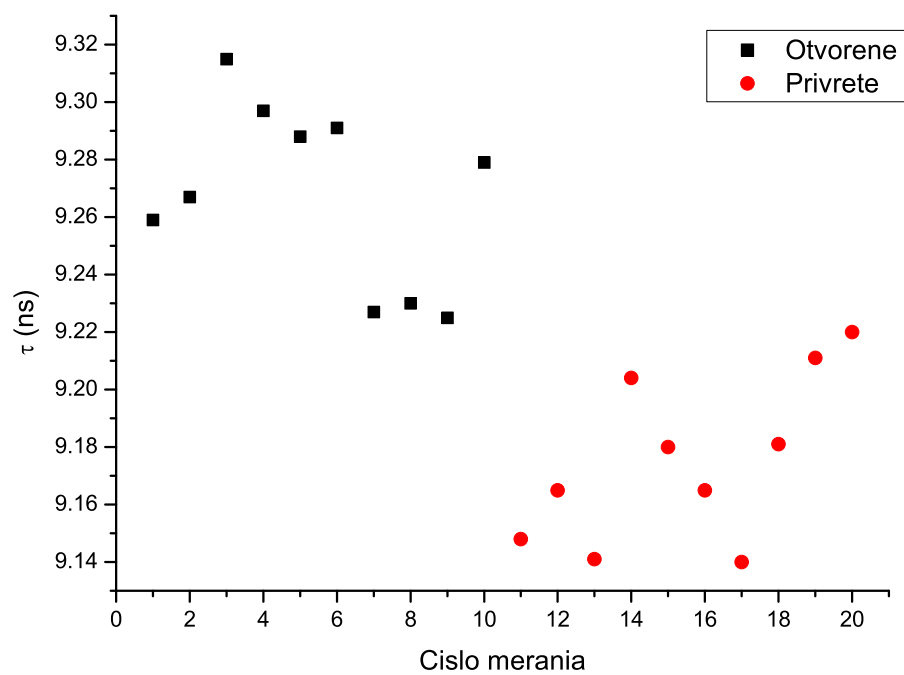
Obr. 2.4: Kinetika roztoku PPIX s koncentráciou 30  $\mu\text{M}$  v THF



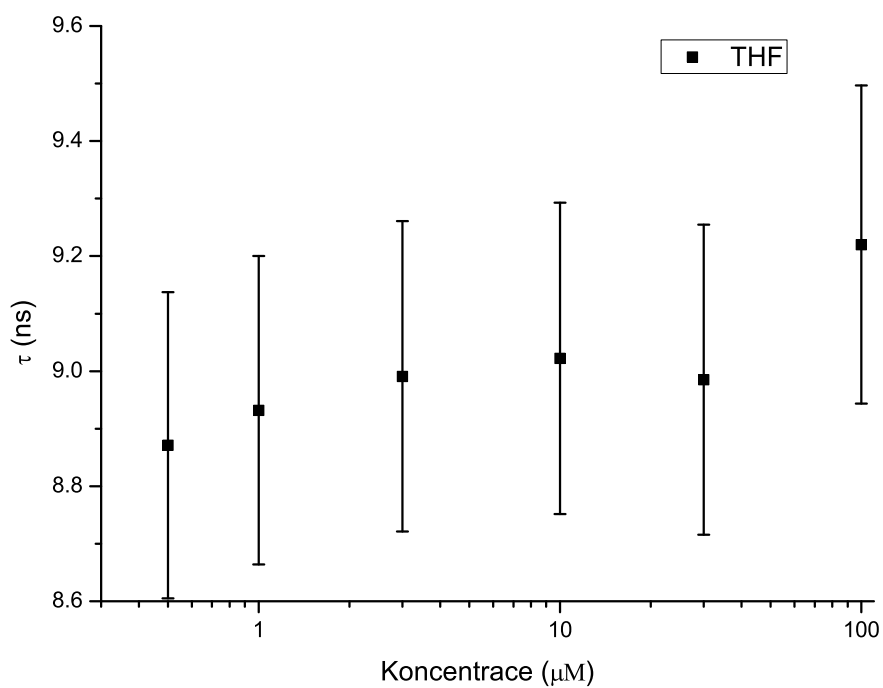
Obr. 2.5: IRF zmeraná ako rozptyl excitačného žiarenia na roztoku Ludoxu



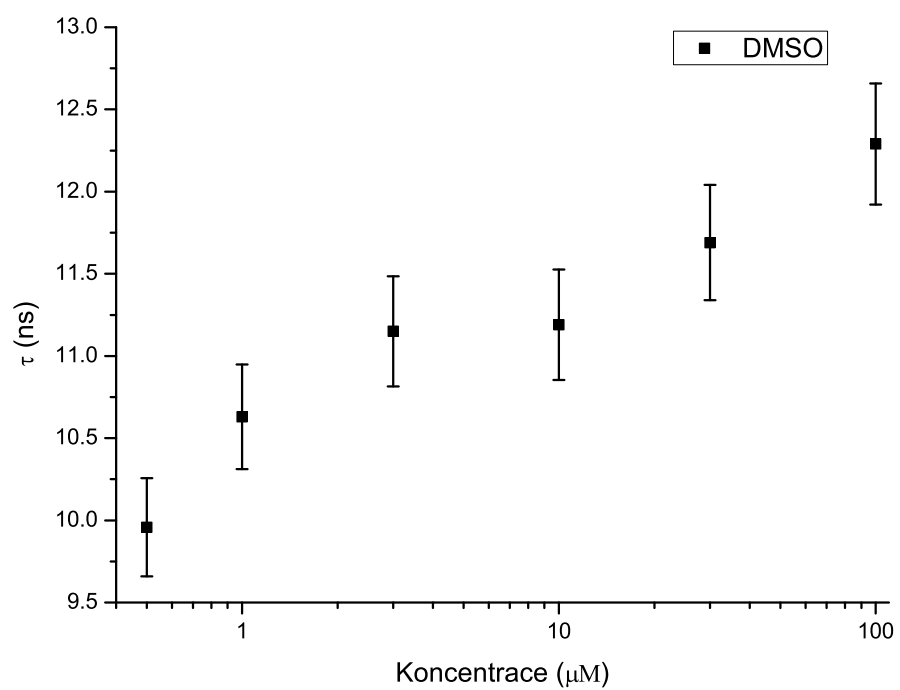
Obr. 2.6: Kinetika luminiscence vzorku  $30\ \mu\text{M}$  spracovaná programom trfit s nafiťovanou krivkou poklesu s dobou života  $8,98\ \text{ns}$



Obr. 2.7: Porovnanie dôb života u vzorky 100  $\mu\text{M}$  v THF pri otvorenej a privretej clone



Obr. 2.8: Doby života protoporfyrínu IX v závislosti na koncentrácii pre THF



Obr. 2.9: Doby života protoporfyrínu IX v závislosti na koncentracii pre DMSO



# Záver

Podarilo splniť všetky úlohy položené v zadaní mojej bakalárskej práce okrem prispôsobenia zberného systému aparatury pre merania so svetlovodom. Počas bakalárskej práce som sa zoznámila so základmi a princípmi fotodynamickej terapie, no predovšetkým fotodiagnostiky v medicíne. Študovala som doteraz publikované práce a literatúru tykajúcu sa luminiscenčnej diagnostiky, najmä so zameraním na protoporfyrín IX. Zvládla som prácu s absorpčným a fluorescenčným spektrometrom. Taktiež som pracovala s viackanálovou aparaturou pre časovo rozlíšené meranie dôb života fluorescencie metódou časovo korelovaného čítania jednotlivých fotónov. Vykonala som meranie závislosti dôb života luminiscencie protoporfyrínu IX na jeho koncentrácii v roztokoch tetrahydrofuranu (THF) a dimethyl sulfoxidu (DMSO) o medicínsky relevantných koncentráciách. V prípade THF je zameraný trend rastu dôb života protoporfyrínu IX s koncentráciou z 8,85 ns na 9,22 ns pod experimentálnou chybou určenia dôb života. V DMSO je naopak trend rastúcich závislostí dôb života protoporfyrínu IX na koncentrácii z 9,96 ns na 12,29 ns jasne nad touto experimentálnou chybou. Z časových dôvodov a rekonštrukcie laboratória nebolo možné pristúpiť k adaptácii zberného systému pre meranie so svetlovodom.

Po zistení rozdielov koncentrácie protoporfyrínu IX v roztokoch, sa naskytuje otázka, ako sa prejavuje rôzna koncentrácia protoporfyrínu IX v bunkách na dobách života. Obdobné merania dôb života s rôznou koncentráciou protoporfyrínu IX v bunkových kultúrach zdravých a rakovinotvorných bunkách *in vitro* budú nasledovať. Overenie spolu s adaptáciou bude nápnou ďalšieho výskumu v tejto oblasti.

# Zoznam použitej literatúry

- [1] WILSON, Brian C.; PATTERSON, Michael S.: *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*. Physics in Medicine and Biology, roč. 53, č. 9, 2008: R61-R109.
- [2] HÄDER, Donat P.; GIULIO, Jori. *Photodynamic Therapy with ALA*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006. ISBN 0-85404-341-1.
- [3] *Mladý vedec* [online]. [cit 15.4.2015]. Bratislava. č. 4. Dostupné z <http://www.mladyvdedec.sk/archiv/archiv-stvrteho-cisla/66-rakovina.html>.
- [4] STÍBAL, A.; DĚDIC, R.: *Photodiagnosics and Luminiscence Diagnostics of Cancer*. WDS'14 Proceedings of Contributed Papers — Physics, 113–120, 2014. ISBN 978-80-7378-276-4. MATFYZPRESS
- [5] DĚDIC, R.: *Luminiscence Detection of Singlet Oxygen in Photosynthesis and Photodynamic Therapy*. Habilitačná práca, MFF UK, 2011.
- [6] MOORE, Walter J.. *Fyzikální chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1979, 974 s.
- [7] HEGYI, Juraj; HEGYI, Vladimír; RUZICKA, Thomas; ARENBERGER, Petr; BERKING, Carola: *New developments in fluorescence diagnostics*. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, roč. 9, č. 5, Máj 2011: s. 368-372.
- [8] [Online], 3.5.2015  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Aminolevulinic\\_acid#/media/File:Aminolevulinic\\_acid.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Aminolevulinic_acid#/media/File:Aminolevulinic_acid.svg)
- [9] [Online], 15.4.2015  
<http://www.solen.sk/pdf/95b247c4e65ccdcb1972b540f89fb518.pdf>.
- [10] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, xxvi, 954 s. ISBN 0-387-31278-1.
- [11] KRIZ, Martin; HEGYI, Juraj; RUZICKA, Thomas; BERKING, Carola: *Fluorescence diagnostics as a guide for demarcation and biopsy of suspected anal cancer*. International Journal of Dermatology, roč. 51, č. 1, Január 2012: s. 31-34.
- [12] VIKLICKÝ, V.: *In situ luminiscenční detekce singletního kyslíku*. Diplomová práca, MFF UK, 2009.

# Zoznam obrázkov

1.1	Schematicky priebeh fotodynamickej terapie . . . . .	3
1.2	Jablonského schéma . . . . .	5
1.3	Delta-aminolevulová kyselina. . . . .	7
1.4	Molekula protoporfyrínu IX . . . . .	8
1.5	Prístroje na zachytenie fluorescencie. . . . .	9
1.6	Zachytená fluorescencia . . . . .	10
2.1	Schéma aparatúry . . . . .	12
2.2	Absorpčné spektrum . . . . .	15
2.3	Fluorescenčné spektrum . . . . .	15
2.4	Kinetika roztoku PPIX s koncentráciou 30 $\mu$ M v THF . . . . .	16
2.5	IRF . . . . .	16
2.6	Kinetika luminiscencie z trfitu . . . . .	17
2.7	Porovnanie dôb života . . . . .	18
2.8	Doby života pre THF . . . . .	18
2.9	Doby života pre DMSO . . . . .	19

# Zoznam použitých skratiek

ALA	Aminolevulová kyselina
DMSO	Dimethyl sulfoxid
IRF	Impulse response function
PDT	Fotodynamická terapia
PPIX	Protoporfyrín IX
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultrafialové svetlo