

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optimalizace metod pro stanovení kvantového výtěžku produkce singletového kyslíku a kvantového výtěžku fluorescence u derivátů azaftalocyaninů

Vedoucí diplomové práce : doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.



Hradec Králové, 2016

Lenka Hrubá

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a odborné vedení při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. a celému kolektivu laboratoře za ochotu a příjemné pracovní prostředí. Práce vznikla za finanční podpory Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 291).

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ABSTRAKT | 7 |
| 2 | ABSTRACT..... | 8 |
| 3 | SEZNAM ZKRATEK | 9 |
| 4 | CÍL PRÁCE | 11 |
| 5 | TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 5.1 | Fotodynamická terapie..... | 12 |
| 5.1.1 | Průběh PDT | 12 |
| 5.1.2 | Faktory ovlivňující úspěšnost PDT | 13 |
| 5.1.3 | Biologický mechanismus účinku PDT | 14 |
| 5.1.4 | Využití PDT..... | 14 |
| 5.2 | Fotosensitizerý | 15 |
| 5.2.1 | Vlastnosti fotosenzitizerů | 16 |
| 5.2.2 | Lambert – Beerův zákon | 18 |
| 5.3 | Jablonskiho diagram | 18 |
| 5.3.1 | Fotodynamická reakce | 20 |
| 5.3.2 | Singletový kyslík a vysvětlení jeho reaktivity..... | 21 |
| 5.4 | Fluorescence a přehled spekter | 22 |
| 5.4.1 | Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F)..... | 24 |
| 5.5 | Optické filtry | 24 |
| 5.6 | Lasery a světelné zdroje v PDT | 25 |
| 6 | METODICKÁ ČÁST | 26 |
| 6.1 | Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku | 26 |
| 6.2 | Fotofyzikální luminiscenční metoda..... | 27 |
| 6.3 | Fotochemická metoda měření Φ_Δ pomocí rozkladu DPBF | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 7.1 | Přechlazení ZnPc | 31 |
| 7.2 | Fluorescence | 32 |
| 7.2.1 | Měření absorpčního spektra ZnPc v různých rozpouštědlech..... | 32 |
| 7.2.2 | Měření fluorescenčního emisního spektra ZnPc v rozpouštědlech ... | 33 |
| 7.2.3 | Měření excitačního spektra ZnPc v rozpouštědlech | 33 |
| 7.2.4 | Měření kvantových výtěžků fluorescence u série derivátů připravených naší výzkumnou skupinou | 34 |
| 7.3 | Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku relativní metodou | 34 |
| 7.4 | Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku absolutní metodou..... | 34 |
| 7.4.1 | Stanovení extinkčního koeficientu DPBF v DMF..... | 34 |
| 7.4.2 | Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku v DMF | 35 |
| 7.4.3 | Model technického zařízení s ozařovací lampou..... | 36 |
| 7.4.4 | Model technického zařízení s laserem..... | 37 |
| 7.5 | Měření logP u série derivátů ftalocyaninů | 38 |
| 7.6 | Studium vazby fotosenzitizerů na bílkoviny v buněčném médiu | 38 |
| 8 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 40 |
| 8.1 | Studium fotofyzikálních vlastností derivátů ftalocyaninů připravených Azaphthalocyanine group | 40 |
| 8.2 | Fluorescence | 47 |
| 8.2.1 | Měření absorpčního spektra a excitačního spektra ZnPc | 47 |
| 8.2.2 | Měření emisních spekter a stanovení Φ_F | 48 |
| 8.2.3 | Stanovení Φ_F | 49 |
| 8.2.4 | Vyhodnocení korekčního faktoru chlornaftalenu | 49 |
| 8.2.5 | Φ_F ZnPc v různých rozpouštědlech | 50 |
| 8.3 | Kvantový výtěžek singletového kyslíku | 51 |
| 8.3.1 | Stanovení extinkčního koeficientu DPBF v DMF..... | 51 |

| | | |
|-------|---|----|
| 8.3.2 | Optimalizace metody stanovení Φ_{Δ} | 51 |
| 8.3.3 | Stanovení Φ_{Δ} pomocí technického zařízení s ozařovací lampou..... | 52 |
| 8.3.4 | Stanovení Φ_{Δ} pomocí laseru | 54 |
| 9 | ZÁVĚR | 57 |
| 10 | CITOVANÁ LITERATURA A ZDROJE OBRÁZKŮ | 58 |

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra : Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát : Lenka Hrubá

Školitel : doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce : Optimalizace metod pro stanovení kvantového výtěžku produkce singletového kyslíku a kvantového výtěžku fluorescence u derivátů azaftalocyaninů

Fotodynamická terapie (PDT), se singletovým kyslíkem jakožto hlavním cytotoxickým činitelem, představuje alternativní metodu na poli léčby rakoviny i dalších kožních onemocnění. Principem PDT je excitace fotosenzitizéru absorpcí světelné energie, následovaná transferem energie tkáňovému kyslíku ($^3\text{O}_2$) a následnou tvorbou cytotoxického singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Schopnost fotosenzitizéru transformovat absorbovanou energii na produkci singletového kyslíku je vyjádřena jako *kvantový výtěžek singletového kyslíku* (Φ_Δ).

Cílem této práce byl především vývoj a optimalizace absolutní metody pro stanovení Φ_Δ . V porovnání s metodou relativní zde není třeba žádné referenční látky, což umožňuje přesnější výsledky a menší počet chyb. Ověření nové metody bylo prováděno v prostředí *N,N*-dimethylformamidu se zinečnatým ftalocyaninem, jakožto modelovým fotosenzitizérem o známé hodnotě Φ_Δ a s 1,3-difenylisobenzofuranem, jehož funkcí bylo chemické zhášení $^1\text{O}_2$.

V práci byly porovnávány různé světelné zdroje pro excitaci a také různě sestavená technická zařízení. Efektivní a přesná absolutní metoda pro stanovení Φ_Δ byla úspěšně vyvinuta. Tato metoda bude používána pro měření Φ_Δ nových sloučenin syntetizovaných výzkumnou skupinou Azaphthalocyanine group na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

Součástí práce bylo rovněž pozorování vlivu rozpouštědla na kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) a stanovení fotofyzikálních vlastností dvou sérií derivátů ftalocyaninů.

2 ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: **Department of Biophysics and Physical Chemistry**

Candidate: **Lenka Hrubá**

Supervisor: **Assoc. Prof. Veronika Nováková, Ph.D.**

Title of Thesis: **Optimization of methods for determination of singlet oxygen production and fluorescence emission of azaphthalocyanine derivatives**

Photodynamic therapy (PDT) with a singlet oxygen as an essential agent is believed to be an alternative way of cancer treatment or treatment of some cutaneous diseases. The principle of PDT is based on excitation of a photosensitizer by light absorption, followed by transfer of energy to tissue oxygen ($^3\text{O}_2$) forming cytotoxic singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). The efficiency by which photosensitizer transforms absorbed energy to singlet oxygen is characterized by *singlet oxygen quantum yields* (Φ_Δ).

The aim of this thesis was to develop and optimize absolute method for determination of Φ_Δ . In comparison to a relative method, no reference is needed in this case, which enables accurate results with lower error. Verification of the new method was performed in *N,N*-dimethylformamide with a zinc phthalocyanine as a model photosensitizer because of its well-known Φ_Δ and with 1,3-diphenylisobenzofuran as a chemical quencher of $^1\text{O}_2$.

Different sources of light for excitation and different set-ups of the instrumentation were tried and compared. Efficient and accurate method for absolute determination of Φ_Δ was successfully developed. This method will be used for Φ_Δ measurements of the new compounds prepared in Azaphthalocyanine group on Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis.

Furthermore the determination of an effect of solvent on a fluorescence quantum yield (Φ_F) was also a part of this work as well as determination of photophysical properties of two series of phthalocyanine derivatives.

3 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| absorbance | A |
| aceton | ACE |
| acetonitril | ACN |
| aza-analogy ftalocyaninů | AzaPc |
| dichlormethan | DCM |
| 1,3 – difenylišobenzofuran | DPBF |
| <i>N,N</i> – dimethylformamid | DMF |
| dimethylsulfoxid | DMSO |
| ethanol | EtOH |
| extinkční koeficient | ε |
| fotodynamická terapie | PDT |
| fotosensitizer | PS |
| ftalocyaniny | Pcs |
| hematoporfyrinové deriváty | HpD |
| chlornaftalen | CHNF |
| index lomu rozpouštědla | n |
| kvantový výtěžek fluorescence | Φ_F |
| kvantový výtěžek singletového kyslíku | Φ_Δ |
| koncentrace | c |
| kyslík v základním stavu | $^3\text{O}_2$ |
| methylenová modř | MM |
| plocha pod křivkou | AUC |

| | |
|---------------------------------|----------------|
| pyridin | PYR |
| singletový kyslík | $^1\text{O}_2$ |
| tetrahydrofuran | THF |
| tetrapyridoporfyraziny | TPyPz |
| toluen | TOL |
| US Food and Drug Administration | FDA |
| vlnová délka | λ |
| zinečnatý ftalocyanin | ZnPc |

4 CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce je vyvinout a optimalizovat absolutní metodu měření kvantového výtěžku singletového kyslíku (Φ_{Δ}) tak, aby bylo možné tuto metodu úspěšně používat v naší výzkumné skupině Azaphthalocyanine Group pro hodnocení potenciálu námi připravovaných sloučenin, tzn. fotosenzitizérů ze skupiny derivátů ftalocyaninů, dle jejich schopnosti produkovat singletový kyslík. Řešení technického zařízení a nastavení podmínek měření by mělo zajistit poskytnutí relevantních hodnot Φ_{Δ} , bez nutnosti porovnávání s referenční látkou.

Námi navržená metoda bude ověřována na modelovém fotosenzitizéru, kterým bude zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) se známým kvantovým výtěžkem singletového kyslíku. Měření bude probíhat v prostředí *N,N*-dimethylformamidu (DMF) za použití chemického zhášedce singletového kyslíku 1,3-difenyliisobenzofuranu (DPBF).

Dílčím cílem diplomové práce bude rovněž zhodnocení vlivu rozpouštědla na kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) ZnPc. V neposlední řadě budou detailně zkoumány fotofyzikální vlastnosti dvou sérií derivátů ftalocyaninů připravených naší výzkumnou skupinou.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Fotodynamická terapie

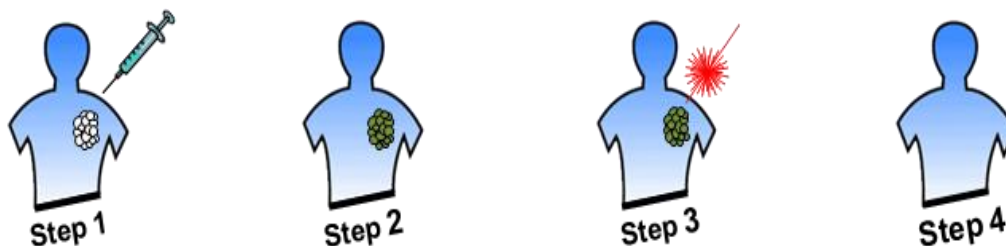
Fotodynamická terapie (PDT) je minimálně invazivní metoda vykazující cytotoxický účinek proti nádorovým buňkám. Nejvyšší účinnost byla prokázána především v raných stádiích rakoviny. Do povědomí se PDT jako terapeutická metoda dostává především díky mnoha výhodám, mezi které patří: minimální tkáňová toxicita, nedostatek přirozených mechanismů pro rezistenci, minimální nežádoucí účinky a výborné kosmetické efekty. PDT, jakožto účinná léčebná metoda, byla doporučena US Food and Drug Administration (FDA) již před dvěma dekádami. [1]

Účinek PDT závisí na přítomnosti tří základních komponent: **fotosensitizeru, světla a kyslíku**. Žádná z těchto komponent není sama o sobě toxická, jejich kombinací ale vzniká vysoce reaktivní **singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)**, který představuje hlavní cytotoxický působek PDT. [2]

Na destrukci nádoru se podílí přímý cytotoxický efekt $^1\text{O}_2$, stejně jako omezení vaskulární výživy nádoru a indukce zánětu s následnou systémovou imunitní odpovědí. Úspěšnost PDT je tak podmíněna mnoha faktory, jako např. doba ozáření a intenzita světla, celková dávka PDT i prokysličení tkáně. Z těchto důvodů vyžaduje stanovení optimálních podmínek pro PDT interdisciplinární spolupráci. [2] [3]

5.1.1 Průběh PDT

V praxi je do těla nejdříve injekčně aplikován fotosensitizer, který se koncentruje v místě nádorové tkáně. Poté dochází k jeho aktivaci světlem specifické vlnové délky (λ). Díky vzniku cytotoxického $^1\text{O}_2$ kyslíku dochází k destrukci nádoru (*viz. Obrázek 1*). [2]



Obrázek 1: Popis průběhu PDT v klinické praxi. Po injekční aplikaci a kumulaci fotosenzitizéru v místě nádoru, následuje jeho ozáření a destrukce. [35]

5.1.2 Faktory ovlivňující úspěšnost PDT

Saturace tkáně kyslíkem je považována za jeden ze zásadních faktorů PDT, což bylo zdůvodněno objevem rezistence hypoxických buněk vůči PDT. Množství kyslíku závisí na intenzitě použitého světla a i destrukce samotné tkáně může být intenzitou světla korigována. Světlo o nižší intenzitě nezpůsobí tak rychlé vyčerpání zásob kyslíku, a proto je tkáň singletovému kyslíku vystavena při léčbě po delší dobu. Navíc nedochází k tak rozsáhlému poškození zdravé tkáně, a tedy i k jejímu lepšímu hojení. K úplnému zničení nádoru je ale stále zapotřebí zničit mikrovaskulární zásobení tumoru živinami. [3]

Rychlost produkce singletového kyslíku $\frac{d[1O_2]}{dt}$ závisí na intenzitě světla (ψ), celkové dávce PDT (D_{PDT}) a koncentraci kyslíku v základním stavu. Zároveň je funkcí koncentrace (c), extinkčního koeficientu (ε) a kvantového výtěžku singletového kyslíku (Φ_{Δ}) fotosenzitizéru. [3]

$$\frac{d[1O_2]}{dt} = \frac{\varepsilon c \psi}{E_{\Phi}} \Phi_{\Delta} = \frac{D_{PDT}}{t E_{\Phi}} \Phi_{\Delta} = k[3O_2] \quad (\text{rovnice č.1})$$

Účinnost PDT je přímo ovlivňována parametry osvětlení – tedy celkovou dávkou světla, dobou expozice a způsobem osvětlení. [2]

Penetrace světla závisí na optických vlastnostech tkáně a vlnové délce světla. Část fotonů pronikajících do tkáně je odražena povrchem, část je rozptýlena v okolní tkáni nebo pohlcena chromoforem, ať už endogenního (hemoglobin, melanin, atd.) nebo exogenního typu (např. fotosenzitizér). Penetrace světla je rovněž snižována vysokou pigmentací tkáně, z důvodu silné absorpce melaninu patřícího mezi endogenní chromofory. Průnik do tkáně může být rovněž snižován vysokým ε a koncentrací

fotosenzitizéru v nádorové tkáni. Nutno dodat, že vysoký ϵ fotosenzitizéru přináší výhodu v tom, že stačí pacientovi podávat nižší koncentrace fotosenzitizéru k dosažení dostatečného PDT účinku. [3]

5.1.3 Biologický mechanismus účinku PDT

Biologický účinek PDT je kromě přímého cytotoxického účinku singletového kyslíku zprostředkován také vazokonstrikcí a zánětem. Rozsáhlá vazokonstrikce a hemostáza po použití PDT izoluje nádorové buňky od zdroje živin a kyslíku. Velmi nízké tkáňové koncentrace kyslíku, až jeho úplný nedostatek pak způsobují apoptózu nádorových buněk. Mechanismus účinku PDT bývá také přirovnáván k zánětlivé odpovědi následující infekci, popřípadě poranění. Za mediátory PDT jsou považovány eikosanoidy, které jsou běžně produkovány endoteliálními buňkami za účelem udržení normálního cévního tonu. V případě zasažení tkáně PDT spustí kaskáda eikosanoidů vazokonstrikci. Krevní destičky a neutrofilů nejen adherují a agregují, ale také migrují do okolních tkání následovány chemokininy. Krevní destičky rovněž ve velkém množství produkují tromboxan A_2 , který představuje další silný stimul k hemostáze. [3]

Z nukleových bazí se pomocí singletového kyslíku v PDT oxiduje především guanin a tím způsobuje nevratné poškození DNA. [3]

5.1.4 Využití PDT

PDT se používá při léčbě kožních melanomů, rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, peritoneální dutiny, žaludku, střev, jater, močového měchýře, prostaty a děložního čípku. PDT našla využití rovněž při léčbě degenerativních změn na sítnici, nemoci koronárních cév, chronického zánětu dásní a mikrobiálních infekcí. [4]

Význam fotodynamické inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků roste především se stále častějším výskytem antibiotikové rezistence. Výsledný antimikrobní efekt závisí jak na povaze fotosenzitizéru tak druhu mikroorganismu. Obecně účinnější jsou kationické fotosenzitizéry, některé gramnegativní bakterie jsou dokonce citlivé pouze na tento typ (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). [4] [5]

Perspektivní využití PDT se objevuje i v oblasti dezinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze. PDT v tomto případě ničí nukleovou kyselinu, která na rozdíl od mikroorganismů a bílých krvinek, v plazmě a červených krvinkách obsažena není. [6]

5.2 Fotosenzitizéry

Prvními v praxi používanými fotosenzitizéry byly hematoporfyrinové deriváty. (HpD). Přestože Photofrin® způsobuje permanentní senzitivizaci kůže, stále zůstává jedním z několika oficiálně schválených a používaných fotosenzitizérů v PDT. [7]

Po uvedení HpD následovalo hledání molekul intenzivně absorbujících v dlouhých λ a produkujících dostatečné množství $^1\text{O}_2$. [8]

Ftalocyaniny (Pcs) jsou považovány za druhou generaci fotosenzitizérů především díky podobnosti struktury s porfyriny, avšak s výhodnějšími vlastnostmi. Syntéza započala již ve 30. letech 20. století. Tehdejší sloučeniny (komplexy ftalocyaninů) byly založeny na dvojmocné mědi – Cu^{2+} , tedy inertním nefotosenzitivizujícím chromoforu. Postupně byla měď nahrazena chloroalumiinem, popřípadě zinečnatým kationtem. V klinické praxi existovala pouze isomerní směs získaná sulfonací chloroaluminiového ftalocyaninu. Tato směs byla používána především k léčbě rakoviny v tehdejší Sovětském svazu. [8] V klinické praxi zůstává dodnes pod označením Photosens. Experimenty prováděné s touto látkou byly také součástí této diplomové práce.

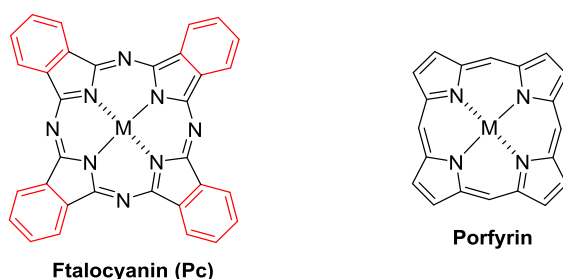
Z chemického hlediska jsou Pcs tetra-benzo-5,10,15,20-tetraazaporfyriny (*viz. Obrázek 2*). Oproti klasickým porfyrinům mají absorpci posunutou blíže červené části spektra, což je vysvětlováno anelací 4 benzenových jader, vedoucí k rozšíření konjugovaného systému dvojných vazeb. Díky relativně přímé cestě syntézy je možné získat množství sloučenin variabilních z hlediska centrálního atomu i postranních řetězců. Centrálním atomem může být kation kovu i polokov. Kvantovým výtěžkem singletového kyslíku předčí ftalocyaniny i klasické fotosenzitizéry, jako je methylenová modř (MM). Možnými centrálními atomy ftalocyaninů používaných pro PDT mohou být také hlinité, zinečnaté, germanité, gallnaté a siliconové kationty. [8]

Všechny porfyrinové sloučeniny mají silný absorpční pás v oblasti 400 nm tzv. „Soretův pás“. Tento pás není vhodný pro PDT, neboť modrá oblast světla neproniká

efektivně do tkáně. Absorpční pásy v rozmezí 600 – 800 nm, tzv. „Q-pásy“, se pro terapii používají. Porfyriny vykazují bohužel slabá absorpční maxima kolem 630 nm, naopak ftalocyaniny mají Q-pásy obvykle několikanásobně silnější. [3]

Ftalocyaniny, jakožto ve vodě nerozpustné chromofory mohou být na místo účinku dopraveny díky solubilizujícím skupinám na periferii. Nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) je rovněž nerozpustný ve vodě. Do místa nádoru může být doručen za pomoci různých nosičových systémů, např. lipozomů. [8]

Nevýhodou těchto relativně velkých planárních molekul je sklon k agregaci, která inhibuje světelný přenos a může snadno relaxovat již excitovanou molekulu. Agregaci lze zabránit použitím objemných substituentů. [8]



Obrázek 2: Obecná struktura ftalocyaninů a porfyrinů (M je centrální kation kovu nebo 2H)

5.2.1 Vlastnosti fotosenzitizérů

V současnosti mezi nejvíce používané fotosenzitizéry *in vivo* patří porfyriny, chloriny a bakteriochloriny. K využívaným fotosenzitizérům řadíme i ftalocyaniny a texafyriny. Uváděné látky vykazují absorpční maxima v červené oblasti elektromagnetického spektra a jsou účinnými generátory singletového kyslíku. Obecně jsou to planární aromatické molekuly skládající se ze čtyř pyrrolových jednotek. [3]

Mezi nejzásadnější požadované vlastnosti fotosenzitizérů patří vhodná absorpce. Ideální rozsah λ pro excitaci je 630 – 800 nm. V tomto rozmezí dochází k dostatečnému průniku světla do tkáně a produkci singletového kyslíku. Naopak nízká absorpce v oblasti denního světla tzn. 400 – 600 nm způsobuje senzibilizaci kůže. Při absorpci vyšší než 800 nm, nedochází k tvorbě dostatečného množství energie a tím ani singletového kyslíku. [2] [9]

Fotosenzitizér musí samozřejmě vykazovat dostatečnou produkci singletového kyslíku, fluorescenční vlastnosti těchto molekul pak mohou být výhodné pro sledování distribuce fotosenzitizéru v organismu pomocí fluorescenční endoskopie. Neodmyslitelnou podmínkou průběhu PDT je také dostatečná kumulace fotosenzitizéru v nádorové tkáni spojená s nízkou toxicitou a dobrou eliminací z organismu. Samotná aplikace fotosenzitizéru je přímo ovlivněna jeho polaritou. Polární fotosenzitizéry mohou být aplikovány intravenózně. Hydrofóbní senzitivizéry je nutné většinou aplikovat pomocí nosičových systémů, vykazují ale obecně vyšší retenci v nádorové tkáni. [4]

Schopnost fotosenzitizéru produkovat singletový kyslík je vyjádřena jako kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_{Δ}) – tedy počet vzniklých molekul singletového kyslíku ku počtu absorbovaných fotonů. [3]

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\text{počet vzniklých molekul } ^1O_2}{\text{počet absorbovaných fotonů}} \quad (\text{rovnice č.2})$$

Agregace je nežádoucí vlastností ftalocyaninů. Přináší problémy s rozpustností, čištěním i charakterizací sloučenin. Agregace fotosenzitizérů dále zkracuje čas existence tripletového stavu kyslíku, tím snižuje i Φ_{Δ} a způsobuje rozptyl energie fotodynamické reakce směrem ke vnitřní konverzi. Tomuto nežádoucímu chování může být zabráněno objemnými substituenty nebo dlouhými alkylovými řetězci na periferii makrocyklu. Roli hraje ale i výběr vhodného rozpouštědla, popřípadě centrální kation kovu sloučeniny. Centrální kationty kovů s více koordinačními místy pak přináší výhodu v podobě větší inhibice agregace pomocí tzv. axiální substituce. Kompletní monomerizace ve vodě dále může být dosaženo silnou ionizací molekuly. V in vitro testech nebo při studiu vlastností fotosenzitizéru v roztoku lze agregaci inhibovat přidávkem *N,N*-dimethylformamidu (DMF), dodecylsulfátu sodného, nebo dimethylsulfoxidu (DMSO). [10]

5.2.2 Lambert – Beerův zákon

Díky systému konjugovaných vazeb jsou ftalocyaniny schopny absorbovat světlo určitých λ , což jim dodává barevnosti. [9]

Schopnost látky absorbovat světlo určité λ je charakterizována jako absorbance (A), popřípadě transmitance (T). [11]

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{rovnice č.3})$$

kde ε je molární extinkční koeficient ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c je koncentrace ($\text{mol} \cdot L^{-1}$), l je tloušťka media (cm). [11]

$$T(\lambda) = \frac{I_\lambda}{I_\lambda^0} \quad (\text{rovnice č.4})$$

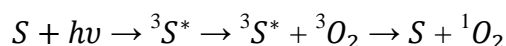
kde I_λ^0 a I_λ je intenzita světelného paprsku vstupujícího a vystupujícího z média. [11]

Chyby v lineární závislosti A na koncentraci c se dle Lambert-Beerova zákona mohou objevit díky agregaci v důsledku vysoké koncentrace roztoku, popřípadě díky přítomnosti jiných absorbujících látek. [11]

Schopnost molekuly absorbovat světlo určité λ v daném rozpouštědle vyjadřuje molární absorpční koeficient (ε). Vysoká hodnota koeficientu pak naznačuje vyšší pravděpodobnost elektronových přechodů. ε je slabě závislý také na rozpouštědle. [11]

5.3 Jablonskiho diagram

Základem fotodynamické terapie je fotochemická reakce, díky které vzniká cytotoxický singletový kyslík. $^1\text{O}_2$ může vznikat mnohými způsoby, obvyklou cestu představuje předání energie tkáňovému kyslíku z excitovaného stavu ozářené molekuly fotosenzitizéru. [12] [3]

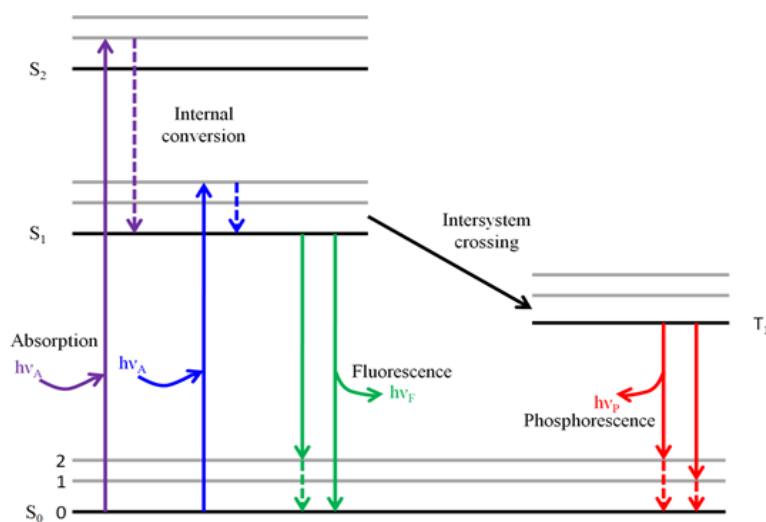


kde S je molekula fotosenzitizéru citlivého na světlo. [12]

Princip excitace molekuly fotosenzitizéru zachycuje Jablonskiho diagram (*viz. Obrázek 3*). [3]

Absorpcí světla (fotonů) se molekula fotosenzitizéru dostává ze základního stavu S_0 do stavu excitovaného S_n , tedy na energeticky vyšší vibrační hladinu. [13]

- a) Molekula ve stavu S_n se může vrátit do nejnižšího excitovaného stavu S_1 rozptýlením energie do okolního prostředí. Tento jev se nazývá vnitřní konverze.
- b) Z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 se molekula vrací následujícími způsoby: [13]
 - Vyzářením fotonu (fluorescence).
 - Uvolněním energie ve formě tepla.
 - Předáním energie jiné molekule, a to buď kolizí, popřípadě přenosem na dálku.
- c) Pro každý excitovaný stav S existuje také excitovaný stav T o nižší energii. Přechodný pohyb elektronů probíhá i na úrovni $S_1 - T_1$. Proces je nazýván „intersystem crossing“ (mezisystémový přechod).
- d) Další vyzáření energie probíhá z tripletového excitačního stavu T_1 emisí fotonu. (fosforescence) [13]



Obrázek 3 : Modifikovaný Jablonskiho diagram [14]

Terminologicky je singletový (S_n) i tripletový (T_n) stav molekuly výsledkem spinového chování elektronů. Každému elektronu jsou přisuzována dvě spinová čísla ($+\frac{1}{2}$ a $-\frac{1}{2}$). Dva elektrony náležící do stejného orbitalu se tak chovají jako magnety a dle Pauliho vylučovacího principu se musí lišit spinem. [13]

Energie elektrických přechodů je pak vyjádřena jako:

$$E = hv = hc/\lambda \quad (\text{rovnice č.5})$$

kde h je Planckova konstanta ($h = 6,63 \cdot 10^{-34} J \cdot s$), v je frekvence světla (Hz), c je rychlost světla a λ je vlnová délka (nm). Z rovnice tedy vyplývá, že každý energetický posun je závislý na specifické λ . [13]

5.3.1 Fotodynamická reakce

Princip vzniku 1O_2 v PDT zachycuje fotodynamická reakce, která probíhá za předpokladu excitace fotosenzitizéru (*viz. Obrázek 4*). Navazuje tedy na děje popisované Jablonskiho diagramem.

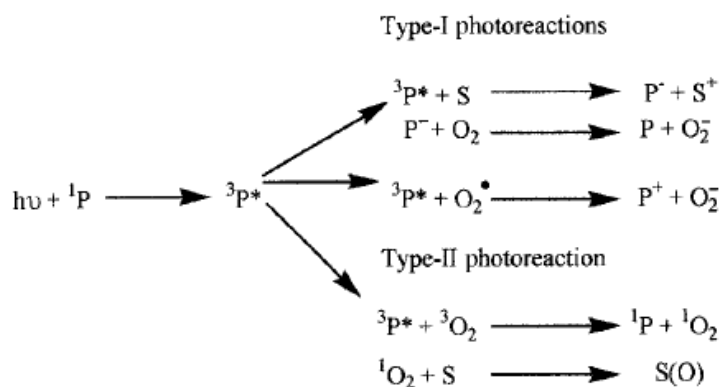
V aerobním prostředí chromofor ochotně předává svoji energii molekulárnímu kyslíku v základním stavu (3O_2) a umožňuje tak vznik 1O_2 , který poté interaguje s organickým substrátem. V tomto případě se jedná o Typ – II fotodynamické reakce, jež je závislá na koncentraci kyslíku. [3] [15]

V anaerobním prostředí reaguje excitovaný fotosenzitizér ($^3P^*$) se substrátem (S) prostřednictvím výměny elektronu. Dochází tak k oxidaci substrátu (S^+) a redukci fotosenzitizéru (P^-). Redukovaný fotosenzitizér může zapříčinit vznik vysoce reaktivního superoxidového anionu (O_2^-). Naproti tomu excitovaný fotosenzitizér ($^3P^*$) reaguje se superoxidovým radikálem (O_2^-) za vzniku superoxidového anionu (O_2^-). Superoxidový anion může dát vznik vysoce reaktivnímu hydroxylovému anionu (OH^-) [3] [15]

Tento Typ-I fotodynamické reakce je ale v PDT minoritní a je závislý na koncentraci substrátu. [3]

Výsledkem obou typů fotodynamické reakce je vysoce reaktivní forma kyslíku schopná destrukce nádorových buněk. [15]

Ve fotodynamické terapii obvykle převažuje Typ-II fotodynamické reakce. Ke změně na Typ-I může dojít v hypoxickém prostředí nebo při vysoké koncentraci fotosenzitizéru. [15]



Obrázek 4: Fotodynamická reakce Typ-I a Typ-II [3]

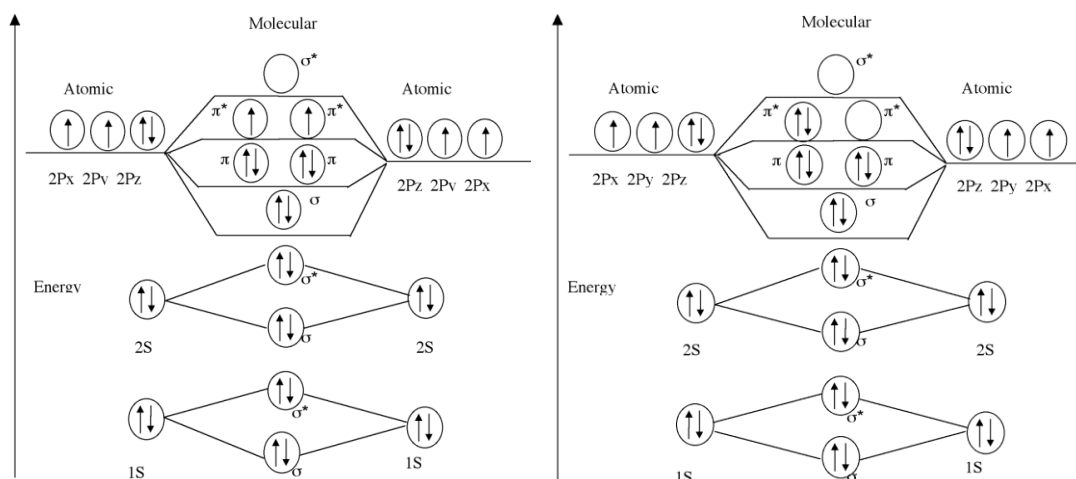
5.3.2 Singletový kyslík a vysvětlení jeho reaktivity

V základním stavu jsou všechny molekuly kromě molekulárního kyslíku v singletové formě. Naopak O_2 se běžně vyskytuje ve své tripletové formě (${}^3\text{O}_2$), do singletové se dostává excitací. [13]

Singletový kyslík vznikající při PDT představuje vysoce reaktivní formu kyslíku, u níž došlo k převrácení spinu jednoho z nejvzdálenějších elektronů. Základní stav kyslíku považujeme vždy za stav tripletový, a to díky třem způsobům spinového uspořádání elektronů. V základním stavu mají elektrony vždy shodný spin, jejich kvantová čísla jsou rovněž shodná, a proto jsou elektrony nuceny následovat Pauliho vylučovací princip (*viz. Obrázek 6*). [16]

Během interakce s excitovaným fotosenzitizérem se spin jednoho z elektronů mění, čímž dochází i ke změně kvantového čísla. Tyto změny dovolí dvěma z elektronů párovat se v ne vazebném orbitalu, což způsobí destabilizaci molekuly (*viz. Obrázek 5*). [16]

Extrémní reaktivita singletového kyslíku tedy vychází z párování dvou elektronů do jednoho z ne vazebných orbitalů π_{2p}^* . [16]



Obrázek 6: Molekulový orbital tripletového kyslíku [16]

Obrázek 5: Molekulový orbital singletového kyslíku [16]

5.4 Fluorescence a přehled spekter

Fluorescence je dalším důležitým parametrem fotosenzitizérů, a proto jí bude věnována následující kapitola. Každý fluorofor, tedy látka schopná fluorescence, může být charakterizován svými vlastními fluorescenčními vlastnostmi, které jsou závislé na prostředí. Každé z možných generovaných spekter uvažuje molekulu v jejím specifickém stavu (*viz. Obrázek 7*) [11] [13]

Absorpční spektrum je graf závislosti absorbance na vlnové délce a ukazuje distribuci elektronů sloučeniny v základním stavu. [13] Měří se pomocí absorpčního spektrometru. Absorpční spektrum popisuje schopnost látky absorbovat světlo různých λ . Pro čisté látky je absorbance při dané λ přímo úměrná koncentraci. [17]

Pcs se vyznačují dvěma charakteristickými pásy a to v oblasti kolem 360 nm (tzv. B-pás) a v oblasti nad 600 nm (tzv. Q-pás). Absorpční spektrometrie je zaměřená především na tvar a polohu Q – pásu, který může odhalit např. složení makrocyclického systému, chování látek v roztoku i pevné fázi, supramolekulární seskupování, protonizaci makrocycly, interakce s jinými molekulami nebo agregaci. [9]

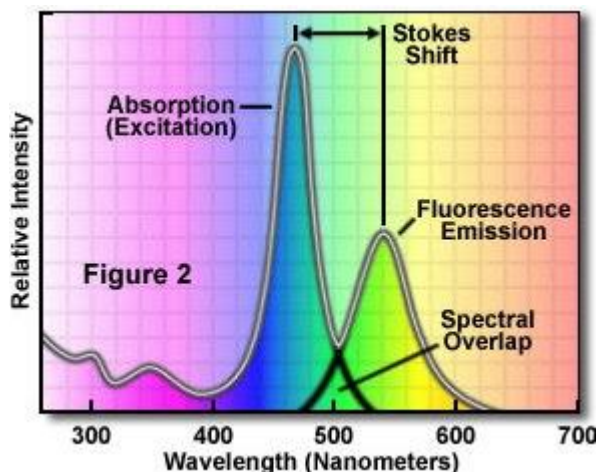
Fluorescenční i fosforescenční spektra vychází z excitovaného stavu a jsou tedy zrcadlovými obrazy spektra absorpčního. Fluorescence je obrazem excitačního stavu S, fosforescence excitačního stavu T. Fluorescence je velmi rychlý proces, odehrávající se v řádech nanosekund, zatímco fosforescence může trvat mikrosekundy až hodiny. Fosforescence se rovněž vyskytuje při vyšších λ . [17] [13]

Emisní spektrum je specifické pro každý typ sloučeniny a je obrazem fluorescence. Jedná se o graf závislosti emise na λ . Emise fotonů je nezávislá na excitační λ . [11]

Excitační spektrum charakterizuje elektronovou distribuci molekuly v základním stavu. Excitační spektrum lze považovat za ekvivalentní spektru absorpčnímu a slouží proto i k prokázání, která ze složek systému je zodpovědná za danou emisi fluorescence. Rozdíly mezi spektrem excitačním a absorpčním indikují přítomnost další látky ve vzorku. [13] [17]

Měřením za pomoci spektrofluorimetru můžeme získat spektrum fluorescenční emisní i excitační. Spektrum emisní je získáno fixním nastavením excitační λ a emisního monochromátoru. Pro spektrum excitační je použita jedna emisní λ a excitační monochromátor. [13]

Obrázek 7: Ilustrace poloh jednotlivých spekter. Maxima absorpčního a excitačního spektra se shodují. Spektrum fluorescenční emisní se vyskytuje ve vyšších vlnových délkách (Stokesův posun). Absorpční a emisní spektra se vzájemně mohou překrývat. [36]



Stokesův posun je rozdíl mezi absorpčním a emisním maximem dané sloučeniny. Množství energie nutné k absorpci, popřípadě emisi, může být vyjádřeno rovnicí 5 (viz výše). [13] Bylo zjištěno, že energie nutná k emisi (E_{em}) je vždy nižší, než energie absorpční. (E_a).

$$E_{em} < E_a \quad (\text{rovnice č.6})$$

Z tohoto důvodu je maximum emisního spektra vždy posunuto k vyšším λ , v porovnání s maximem absorpčního spektra. [13] [11] Jinými slovy, část absorbované energie je vždy ztracena různými procesy (např. přechod mezi vibračními hladinami v rámci stejného excitovaného stavu), emise probíhá z nejnižší hladiny S_1 , proto je vždy energie emitovaného fotonu nižší než energie absorbovaného fotonu.

Efekt vnitřního filtru (v angl. „inner-filter effect“) je projevem autoabsorpce vzorku, kdy při použití silně koncentrovaných roztoků může dojít k reabsorpci emitovaných fotonů. V důsledku tohoto efektu dochází k poklesu fluorescenční intenzity. V experimentech se tomuto jevu předchází použitím nižších koncentrací měřených sloučenin. Jev může být také matematicky korigován. [13]

5.4.1 Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F)

Pcs mají obecně o něco vyšší tendenci k produkci singletového kyslíku a relativně málo fluoreskují. U zinečnatých Pcs převyšují hodnoty Φ_Δ nad Φ_F výrazně. U těchto sloučenin tak dochází k preferenci mezisystémového přechodu na úkor emise fluorescence. Jelikož součet všech kvantových výtěžků může být vždy maximálně roven jedné, s růstem Φ_Δ klesají hodnoty Φ_F . [9]

Stanovení Φ_F pomocí referenční metody (tedy srovnání dat naměřených za stejných podmínek s látkou o známé hodnotě Φ_F) lze vyjádřit rovnicí:

$$\Phi_F^S = \Phi_F^R \left(\frac{F^S}{F^R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A^R}}{1 - 10^{-A^S}} \right) \left(\frac{n^S}{n^R} \right)^2 \quad (\text{rovnice č.7})$$

kde F je plocha pod emisním spektrem, A je absorbance při excitační λ , n je index lomu rozpouštědla, R a S odpovídají referenční látce (z angl. reference) a vzorku (z angl. sample). [18]

Měření Φ_F musí probíhat při jedné excitační λ pro vzorek i referenční látku, mohou se však lišit použitá rozpouštědla, jejichž rozdílný vliv je kompenzován příslušnými indexy lomu n . [11] [13]

5.5 Optické filtry

Optické filtry jsou určeny k výběru specifických λ a zabránění průniku nežádoucích λ .

Bandpass filtry jsou používány v oblasti spektroskopie, laserů i selektivní fotolýzy s cílem odfiltrování pouze určitých λ ze spektra, bez jejich většího ovlivnění. Filtr je tak schopen přijmout světlo definovaných λ , rozptýlit spektrum a mechanickým zablokováním průchodu odfiltrovat specifické λ . Následně dochází k rekonstituci

spektra. Výsledkem je tedy plnohodnotné spektrum, kde dojde pouze k vynechání nežádoucích λ . [19] [20]

Neutral density filter (ND filtry) se používají ke snížení intenzity světelného zdroje a tím k poklesu intenzity světelného paprsku vstupujícího do čočky. ND filtry redukuje všechny λ bez výjimky. Neslouží tedy k odfiltrování specifických λ . [21]

5.6 Lasery a světelné zdroje v PDT

Jednou z největších překážek rozšíření PDT jsou vysoké požadavky na lasery a světelné zdroje sloužící k excitaci různých typů fotosenzitizérů. Vhodný světelný zdroj (viditelného nebo infračerveného světla), musí zajistit také dodání světla do oblasti postižené tkáně za přijatelný časový interval. Vývoj v oblasti světelných zdrojů byl podnícen především zjištěním, že do tkání nejlépe pronikají λ delší než 620 nm. [22] [23]

V současné době jsou širokospektré lampy nahrazovány lasery, které kromě monochromatického paprsku o vysokém výkonu, zajišťují i přímé ozáření místa nádoru, bez nutnosti propojení zdroje s optickým vláknem. Díky tomu také lasery snižují dobu nutnou k poskytnutí dávky PDT. Vzhledem k monochromatickému paprsku světla se stává výběr vhodné λ , která odpovídá úzkému absorpčnímu pásu fotosenzitizéru, zcela zásadní. Jeden typ laseru je pak používán pouze pro excitaci limitovaného počtu fotosenzitizérů. Lasery jsou v současné době jedinou možností léčby malignit v oblastech, které by byly za normálních okolností dosažitelné pouze optickými vlákny o průměru menším než 500 μm . [22]

Lampy poskytují široké spektrum λ o nižším výkonu. Což nutně nemusí znamenat významné prodloužení doby léčby. Díky tomu mohou být lampy univerzálněji používány pro větší počet různých fotosenzitizérů o různých absorpčních maximech. Zúžení spektra λ je poté vždy podmíněno aplikací vhodného bandpass filtru. V praxi se hodí především pro léčbu větších kožních lézí, neboť je nelze kombinovat s optickými vlákny. V porovnání s lasery jsou lampy rovněž cenově dostupnější. [22]

6 METODICKÁ ČÁST

6.1 Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku

Metody měření Φ_{Δ} mohou být principiálně rozděleny na:

- a) **fyzikální** - příkladem je metoda luminiscenční sledující luminiscenci (emisi fotonů) $^1\text{O}_2$ se specifickou λ při 1270 nm

Luminiscenční metoda je vhodná pro měření v micelárních roztocích, neboť nedochází k tvorbě vedlejších produktů vlivem přítomnosti zhášeče. Použití metody je ale podmíněno náročnějším přístrojovým vybavením. [1]

- b) **fotchemické** využívající zhášeče $^1\text{O}_2$

Obecně fotchemická metoda nevyžaduje náročné přístrojové vybavení a je poměrně jednoduchá. Roztok obsahující fotosenzitizér, kyslík, substrát a zhášeč je osvětlen světlem vhodné λ po specifickou časovou periodu. Následuje spektroskopické vyhodnocení. [1]

Zhášeč je látka schopná selektivně reagovat s molekulami $^1\text{O}_2$ za vzniku produktu, který má vlastnosti odlišné od původního zhášeče. Zpravidla se sledují změny v absorpčních vlastnostech. Nejčastěji používaným zhášečem singletového kyslíku je 1,3-difenylisobenzofuran (DPBF) (sledovaná $\lambda = 415 \text{ nm}$ v DMF). DPBF je považováno za účinný indikátor vzniku reaktivního kyslíkového radikálu O_2^- i kyslíku singletového $^1\text{O}_2$. V roztoku podstupuje přímou reakci s produkovaným singletovým kyslíkem. Výsledkem je pokles absorbance DPBF při 415 nm, který může být zaznamenáván spektrometrem. Se vzrůstající koncentrací $^1\text{O}_2$ tedy klesá hodnota absorbance (A) DPBF. [24]

Jako zhášeč lze použít i další deriváty furanu, antracenu, guaninu, popřípadě bilirubinu. Vhodný zhášeč by měl reagovat se $^1\text{O}_2$ v poměru 1:1 bez vedlejších reakcí. Rozkladné produkty reakce by rovněž neměly zasahovat do stanovení absorpcí ve viditelné oblasti, popřípadě dalším zhašením singletového kyslíku. [1]

Stanovení Φ_{Δ} by mělo probíhat v **rozpouštědle**, ve kterém je fotosenzitizér přítomen ve své monomerní formě. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je DMF. V mnoha dalších rozpouštědlech dochází u Pcs k agregaci, která silně závisí na celkové koncentraci fotosenzitizéru. Stanovení Φ_{Δ} ovlivňuje rozpouštědlo několika možnými

způsoby: celkovou koncentrací $^3\text{O}_2$ v rozpouštědle, životností $^1\text{O}_2$ závisící na typu rozpouštědla i sklonem k tvorbě agregátů mezi fotosenzitizérem a rozpouštědlem. [25]

V organických rozpouštědlech fotochemická metoda rozkladu DPBF poskytuje uspokojivé výsledky. V micelárních roztocích dochází ale k mnoha vedlejším reakcím a tvorbě endoperoxidu, která může být omezena přidavkem thiosulfátu. [1]

Jiným hlediskem rozdělení metod měření Φ_{Δ} může být nutnost použití referenční látky. Podle toho rozdělujeme metody na:

- a) absolutní – poskytující relevantní hodnoty Φ_{Δ} bez nutnosti porovnávání s referenční látkou. Podstatou metody je výpočet uvedený výše (viz. rovnice č.2).
- b) relativní – jejichž využití je podmíněno porovnáním získaných hodnot s referenční látkou [26]

6.2 Fotofyzikální luminiscenční metoda

Fotofyzikální luminescenční metoda představuje metodu relativní. Při použití této metody je správná hodnota Φ_{Δ} nalezena porovnáním s hodnotou referenční látky. Z tohoto důvodu může dojít k zavedení systémové chyby do celého měření. Výsledek Φ_{Δ} pak závisí na kvalitě stanovené hodnoty u látky referenční. [1]

V praxi tato metoda vyžaduje ozáření standardu o známém Φ_{Δ} za shodných podmínek jako ozáření vzorku. Použito je vždy monochromatické světlo, neboť absorbance dvou roztoků při shodné λ je vždy ekvivalentní. [27]

K docílení monochromatického světelného paprsku jsou často využívány tzv. bandpassové filtry nebo je nutné použití laseru. [28]

Principem metody je přímé měření luminiscence $^1\text{O}_2$ při 1270 nm. Intenzitu luminiscenčního signálu singletového kyslíku popisuje následující rovnice: [1]

$$I = \gamma \cdot k_r \cdot \tau_{\Delta} \cdot \Phi_{\Delta} \cdot (1 - 10^{-OD}) \cdot I_{ex} \quad (\text{rovnice č.8})$$

kde k_r je rychlostní konstanta radiačního přechodu, I_{ex} je intenzita excitace, γ je konstanta závislá na vybavení, τ_{Δ} je poločas singletového kyslíku, OD je optická hustota excitované vlnové délky a Φ_{Δ} je požadovaný kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$. V praxi závisí intenzita pouze na γ , Φ_{Δ} , OD , a I_{ex} . Zbylé dvě hodnoty jsou konstantami. [1]

Samotné stanovení Φ_{Δ} poté podléhá porovnání intenzity vzorku s referenční látkou dle rovnice: [1]

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I}{I_{ref}} \cdot \Phi_{\Delta ref} \quad (\text{rovnice č. 9})$$

6.3 Fotochemická metoda měření Φ_{Δ} pomocí rozkladu DPBF

$^1\text{O}_2$, který vzniká především fotodynamickou reakcí Typu II, rozkládá DPBF oxidací za vzniku 1,2-dibenzoylbenzenu (*viz. Schéma 1*). Zčásti může být úbytek $^1\text{O}_2$ zapříčiněn přeměnou na kyslík molekulový. Fyzikální zhášení DPBF je zanedbáváno. [26]

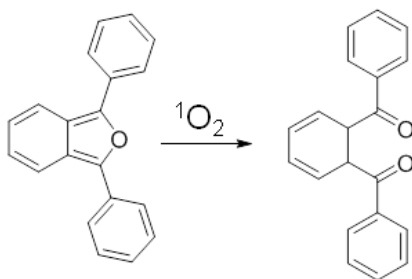
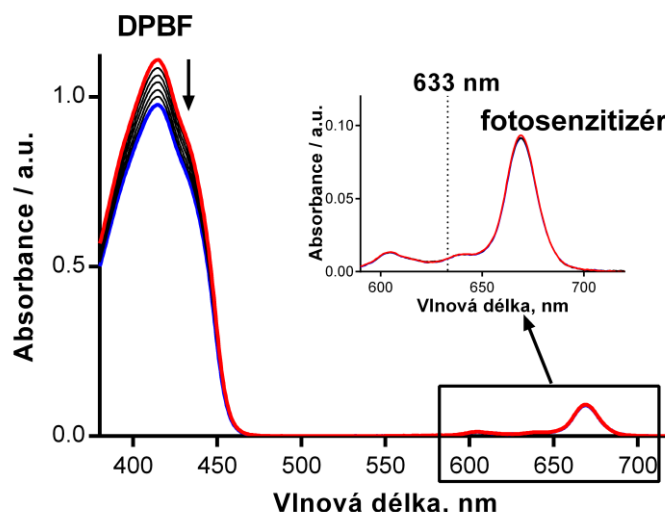


Schéma 1: Rozklad DPBF pomocí singletového kyslíku

Přirozený pokles singletového kyslíku je charakterizován rychlostní konstantou k_d , zatímco reakce singletového kyslíku s DPBF konstantou k_r . Poměr kr/kd může být rovněž hledanou hodnotou. [26]

Pokles absorbance (-A) DPBF je sledován ve specifických intervalech ozáření, celkový pokles by pak měl odpovídat 10 – 15% počáteční A (*příklad viz. Obrázek 8*). Takovýto pokles za celkový časový interval ozáření je pak úměrný produkci $^1\text{O}_2$. [27]



Obrázek 8: Příklad absorpčních spekter během měření fotochemickou metodou pomocí rozkladu DPBF

Metoda předpokládá nulovou existenci přímých reakcí mezi fotosenzitizérem a DPBF, především těch, které by způsobily pokles v absorbanci zářivce. Přítomnost podobných reakcí může být zkontrolována úplným odstraněním kyslíku ze vzorku pomocí dusíku a následným přeměření absorpční křivky. [27]

Absolutní metoda měření Φ_{Δ} matematicky vychází z následující rovnice: [26]

$$\frac{1}{\Phi_{DPBF}} = \left(\frac{1}{\Phi_{\Delta}}\right) \left(\frac{k_d}{k_r}\right) \left(\frac{1}{[DPBF]}\right) + 1/\Phi_{\Delta} \quad (\text{rovnice č.10})$$

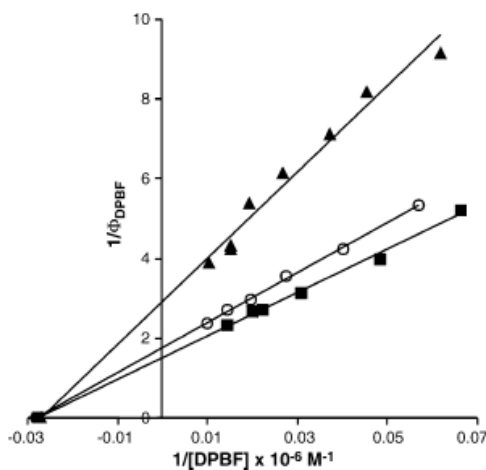
kde Φ_{DPBF} je kvantový výtěžek fotoreakce, k_d/k_r směrnice přímky, $[DPBF]$ je koncentrace DPBF v čase 0, Φ_{Δ} kvantový výtěžek singletového kyslíku. Tato základní rovnice absolutní metody se ve zjednodušené formě shoduje s obecnou rovnicí přímky: [26]

$$y = kx + q \quad (\text{rovnice č.11})$$

Vytvoříme-li tedy závislost $(1/\Phi_{DPBF})$ na $(1/[DPBF])$ získáme rovnici přímky, kde platí následující vztah: [26]

$$\frac{1}{q} = \Phi_{\Delta} \quad (\text{rovnice č.12})$$

Z takto získané grafické závislosti (*viz. Obrázek 9*) lze rovněž určit poměr rychlostních konstant proběhlých chemických reakcí k_r/k_d . Průsečíkem s osou x závislosti je hodnota $(-k_r/k_d)$. [26]



Obrázek 9: Grafické vyjádření absolutní metody

Hodnotu $1/\Phi_{DPBF}$ je možno vypočítat dle rovnice : [26]

$$\Phi_{DPBF} = \frac{(c_0 - c_t) \cdot V}{I_{ap} \cdot t} \quad (\text{rovnice č.13})$$

kde c_0 a c_t jsou koncentrace DPBF před a po osvětlovací periodě t , V je objem vzorku, I_{ap} je intenzita absorbovaná roztokem za čas vyjádřená jako počet fotonů v jednotce [mol] a lze ji získat z následujícího vztahu: [26]

$$I_{ap} = [P_0 / (E_p N_A)] (1 - e^{-2.3Abs}) \quad (\text{rovnice č.14})$$

kde E_p je energie fotonu ($E_p = hc/\lambda$), c je rychlost světla a h je Planckova konstanta. Avogadrova konstanta N_A se používá k převodu počtu fotonů na molární jednotky, P_0 je energie světelného zdroje. [26]

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro měření UV/VIS spekter byl použit přístroj SHIMADZU UV 2600 PC: UV-VIS recording spectrophotometer (Shimadzu Europa, GmbH, Duisburg, Germany).

Fluorescenční spektra (emisní i excitační) byla měřena na přístroji AMINCO-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer a FS5 Spectrofluorometer (Edinburg Instruments).

Φ_{Δ} byl měřen na zařízení, jehož sestavení a optimalizace, stejně jako stanovení vhodných měřicích podmínek, bylo předmětem této diplomové práce. Ozařovací lampa a použité filtry, jakožto součásti daného zařízení, byly zakoupeny od firmy Newport. Laser (vlnová délka 633 nm) byl rovněž zakoupen od firmy Newport.

Nesubstituovaný ZnPc byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich, použítá rozpouštědla od firmy Sigma-Aldrich případně Acros Organics. Chlornaftalen byl vždy předem čerstvě predestilován.

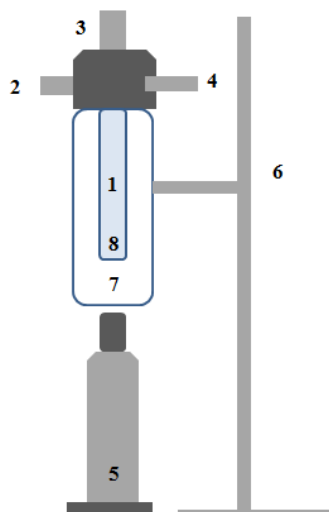
7.1 Přečištění ZnPc

Pro tvorbu roztoku ZnPc, bylo nutno látku optimálním způsobem přečistit. ZnPc byl přečišťován sublimací přes chladicí prst (*viz. Obrázek 10*). Teplota nutná pro přečištění ZnPc byla zjištěna experimentálně a výsledky shrnuje *Tabulka 1*. ZnPc byl sublimován při teplotě 550°C.

Tabulka 1: Experimentální poznatky ze sublimace ZnPc

| Teplota | Zařízení | Pozorování |
|---------|----------------------|--------------------------------------|
| 300°C | magnetická míchačka | - |
| 500°C | horkovzdušná pistole | sublimace, tvorba drobných krystalků |
| 550°C | horkovzdušná pistole | sublimace, tvorba větších krystalků |
| 600°C | horkovzdušná pistole | tání uchycených krystalů |

Přesublimovaný ZnPc byl pro další měření rozpouštěn pomocí ultrazvuku v jednotlivých rozpouštědlech, přefiltrován a následně naředěn na cílovou koncentraci na základě proměřené hodnoty absorbance.



Obrázek 10: Model aparatury pro sublimaci ZnPc. č.1-chladící prst, 2-odvod vody, 3-přívod vody, 4-přívod vakua, 5-horkovzdušná pistole, 6-stojan, 7-vzorek ZnPc, 8-uchycené krystaly ZnPc

7.2 Fluorescence

7.2.1 Měření absorpčního spektra ZnPc v různých rozpouštědlech

Pro měření absorpčních spekter byl připraven základní roztok ZnPc tak, aby jeho hodnota absorbance v maximu Q pásu odpovídala po přibližně 100× naředění hodnotě 0,1.

Absorpční spektra byla měřena v různých rozpouštědlech v rozsahu 900 – 300 nm. Do kyvet bylo vždy pipetováno 2,5 ml daného rozpouštědla. Nejprve byla proměřena čistého rozpouštědla proti porovnávacímu roztoku stejného rozpouštědla získána základní linie. Poté byl do kyvety přidán základní roztok ZnPc (obvykle 20-80 μ l) tak, aby absorbance v maximu Q pásu odpovídala hodnotě 0,1. Následovalo proměření absorpčního spektra proti porovnávacímu roztoku čistého rozpouštědla.

Tyto roztoky v kyvetách byly rovnou použity pro měření fluorescenčních emisních spekter popsaných v následující podkapitole. Absorpční spektra byla

proměřována s cílem získání hodnoty A při λ excitačního maxima a mimo jiné také z důvodu možnosti porovnání s fluorescenčními excitačními spektry a sledování některých nežádoucích aspektů (agregace) (viz Diskuze).

7.2.2 Měření fluorescenčního emisního spektra ZnPc v rozpouštědlech

Po proměření příslušných absorpčních spekter byly tyto vzorky v kyvetách rovnou použity na měření spekter emisních. Měření probíhalo vždy při excitační λ 365 nm a 598 nm, odpovídající B- a Q-pásmu ZnPc. Pro měření $\lambda_{365\text{nm}}$ bylo nutné vždy použít oranžový filtr typu OG 530. Experiment byl prováděn v triplicátu pro obě excitační vlnové délky.

Zásadním bodem měření bylo nastavení přístroje, tedy šířka štěrbin 2 nm, rychlosti skenování 2,5 nm/s a správné λ (365 nm/598 nm). Parametry nastavení spektrofluorimetru shrnuje *Tabulka 2*.

Tabulka 2 : Nastavení fluorimetru při měření fluorescenčních spekter

| Parametr | Nastavení přístroje |
|--------------------|---------------------|
| Šířka štěrbin | 2 nm |
| Rychlost skenování | 2,5 nm/s |
| λ | 365 / 598 nm |

Z naměřených spekter bylo odečítáno emisní maximum a plocha pod křivkou (AUC), jejíž hodnota byla získána matematickou integrací. Pomocí AUC a hodnoty absorbance při dané excitační vlnové délce byly následně vypočítány Φ_F pro ZnPc s ohledem na index lomu (n) konkrétního rozpouštědla (viz rovnice č.7). Jako referenční hodnota byla použita hodnota Φ_F ZnPc v chlornaftalenu, která je známá z literatury ($\Phi_F = 0,30$). [29]

7.2.3 Měření excitačního spektra ZnPc v rozpouštědlech

V každém rozpouštědle bylo navíc proměřeno excitační spektrum zkoumané látky, jež by se mělo shodovat se spektrem absorpčním (viz Diskuze). Pro měření excitačního spektra byl rovněž používán oranžový filtr OG 530. Excitace byla měřena v rozsahu absorpce látky, tedy od 350 – 670 nm při vlnových délkách volených pro

každé rozpouštědlo v místě klesající části daného emisního spektra (obvykle kolem 690-710 nm). Volba vlnové délky probíhala tak, aby při její hodnotě byla zachována dostatečná emise, a zároveň daná vlnová délka ležela za Q-pásem ZnPc, tak aby rozptyl světla během měření neovlivňoval tvar získaného excitačního spektra.

7.2.4 Měření kvantových výtěžků fluorescence u série derivátů připravených naší výzkumnou skupinou

Pro stanovení Φ_F u dvou sérií derivátů ftalocyaninů připravených naší výzkumnou skupinou byla použita stejná metoda popsaná v kapitolách 7.2.1-7.2.3. Jako referenční látka byl použit ZnPc v THF, který má za těchto podmínek $\Phi_F = 0,32$. [30]

7.3 Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku relativní metodou

Tato metoda byla použita pro stanovení Φ_Δ dvou sérií derivátů ftalocyaninů připravených naší výzkumnou skupinou (viz Diskuze). Nesubstituovaný ZnPc byl použit jak referenční látka ($\Phi_{\Delta(\text{DMF})} = 0,56$, $\Phi_{\Delta(\text{THF})} = 0,53$ a $\Phi_{\Delta(\text{PYR})} = 0,61$) a DPBF jako zhášec singletového kyslíku. Metoda je důkladně popsána v literatuře [31] [30] a je rutinně používána naší výzkumnou skupinou.

7.4 Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku absolutní metodou

7.4.1 Stanovení extinkčního koeficientu DPBF v DMF

Prvním krokem při vývoji absolutní metody bylo stanovení extinkčního koeficientu (ϵ) DPBF v DMF v jeho absorpčním maximu (415 nm). Pro toto stanovení byl připraven 3 mM základní roztok DPBF v DMF. Pro měření bylo pipetováno 25 μl tohoto základního roztoku do 2,5 ml DMF. U tří takto připravených vzorků bylo změřeno absorpční spektrum. Příslušný extinkční koeficient byl poté vypočítán dle rovnice 3 (viz výše), kde A je absorbance při 415 nm, c koncentrace (tedy 0.03 mmol/l), ϵ hledaný extinkční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a l objem kvivety (1 cm).

7.4.2 Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku v DMF

Experiment byl prováděn za pomoci dvou ozařovacích zařízení – lampy a laseru. Metodika pokusu se pak lišila v zásadě pouze změnou ozařovací periody, dle typu použitého zařízení, ostatní parametry byly shodné a postup je tedy popsán společně:

Rozpuštěním DPBF v DMF byl připraven 100 μM základní roztok. Dále byl připraven základní roztok ZnPc v DMF, u kterého bylo experimentálně zjištěno, že při pipetování 80 μl tohoto roztoku do 2,5 ml DMF získáme roztok ZnPc s absorbancí v maximu Q-pásu 0,1.

Do kyvety bylo pipetováno vždy 2,5 ml základního roztoku **100 μM DPBF**, který se nechal po dobu 60s probublávat kyslíkem ($^3\text{O}_2$) za pomoci kyslíkové bomby. Poté byla změřena základní linie absorpčního spektra roztoku DPBF proti 2,5 ml čistého DMF, jakožto porovnávacího roztoku. Do takto připravené kyvety, obsahující roztok DPBF, bylo připipetováno 80 μl základního roztoku ZnPc, tak aby A v maximu Q-pásu dosahovala přibližně hodnoty 0,1. Následovalo proměření absorpčního spektra v čase 0 (bez osvitu). Poté byl vzorek ozařován fokusovaným paprskem světelného zdroje po specifickou časovou periodu. Laser má fokusované světlo sám o sobě, při použití lampy bylo potřeba použít čočku.

Pro osvit lampou byl stanoven časový interval - 120s, 240s, 360s a 480s. Pro osvit laserem, který má vyšší intenzitu záření, intervaly 15s, 30s, 45s, 60s, 75s, 90s. V obou případech byly tyto intervaly voleny vždy tak, aby celkový pokles DPBF odpovídal přibližně 15%. Po ukončení každé jednotlivé ozařovací periody docházelo k proměření absorpčního spektra roztoku.

Stejným způsobem byla změřena i absorpční spektra pro **60 μM** , **40 μM** , **30 μM** , **20 μM** a **15 μM** roztoky DPBF v DMF.

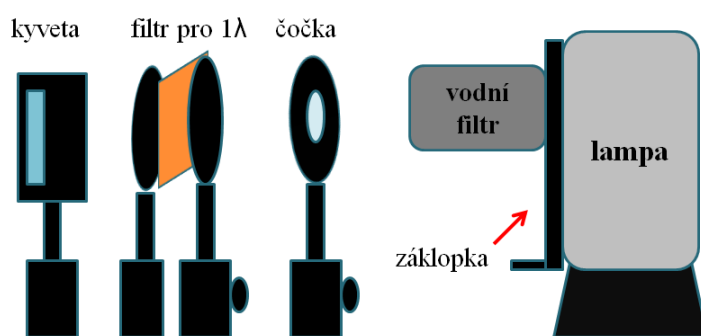
Celé měření s výjimkou cíleného ozařování vzorku lampou nebo laserem, probíhalo ve tmě (temná komora). Roztoky DPBF i ZnPc byly navíc chráněny před světlem hliníkovou folií. Kyvety byly během experimentu promíchávány za pomoci miniaturního magnetického míchadla.

Vyhodnocení pokusu bylo realizováno odečtem poklesu absorpance DPBF při 415 nm. Takto odečtené hodnoty A byly navíc korigovány hodnotou základní linie čistého roztoku DPBF.

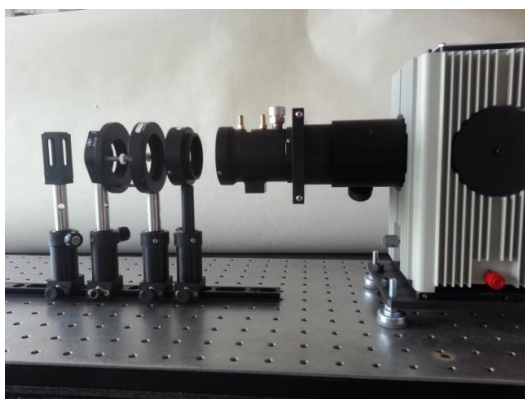
7.4.3 Model technického zařízení s ozařovací lampou

Před každým měřením byla přibližně 30 minut zahřívána ozařovací lampa (ozone-free xenonová lampa, 100W, Newport), u níž bylo nutné následně v pravidelných časových intervalech proměřovat energii při nastaveném výkonu 120 W. Energie ozařovací lampy, která se používá jako jeden z parametrů při výpočtech (viz dále), byla měřena před zahájením pokusu, v průběhu pokusu vždy po 3 vzorcích a také po jeho ukončení.

Při použití tohoto modelového zařízení (viz. **Obrázek 11**, **Obrázek 12**) byl start ozařování vzorku regulován záklopkou, nasedající na světelný zdroj lampy. Tepelné záření, které by mohlo způsobit nespecifický rozklad DPBF nebo ZnPc, bylo odstraněno pomocí vodního filtru. Čočka sloužila nejen k zacílení paprsku do kyvety, ale i k usměrnění průchodu světla filtrem, v tomto případě nezbytným, pro získání pouze jedné žádané λ , konkrétně 633,2 nm (± 3 nm).



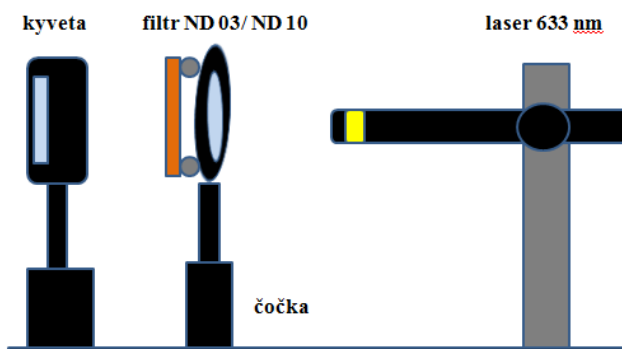
Obrázek 11 : Model technického zařízení s ozařovací lampou



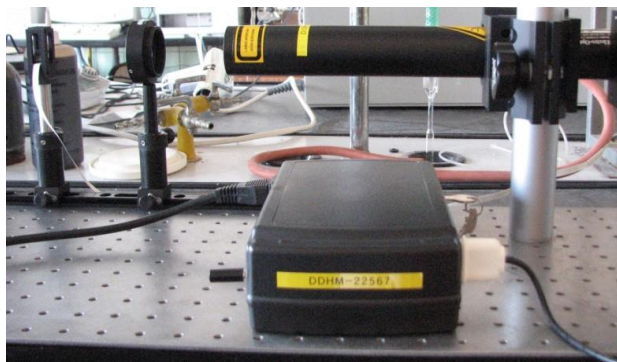
Obrázek 12 : Reálné zařízení s lampou

7.4.4 Model technického zařízení s laserem

Vzhledem k technickým nedostatkům ozařovací lampy (viz Diskuze), byl Katedrou farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy zakoupen ozařovací laser a došlo tak k obměně uskupení celého zařízení. Světelným zdrojem tohoto technického zařízení byl laser svítící světlem vlnové délky 633 nm. Zařízení bylo dále doplněno o filtr ND 03, později ND 10 (viz Diskuze). Následovala kyveta se vzorkem (*viz. Obrázek 13, Obrázek 14*)



Obrázek 13 : Model ozařovacího zařízení s laserem



Obrázek 14 : Reálné zařízení s laserem

7.5 Měření $\log P$ u série derivátů ftalocyaninů

Do ependorfy bylo napipetováno přesně 400 μl vody a 400 μl oktanolu. Následně bylo přidáno 30 μl vzorku (jehož $A=0,1$). Takto připravené vzorky byly důkladně protřepány s použitím vortexu (5 minut), následně centrifugovány (10 min, 10 000 otáček/minutu, 21 °C), aby se dostatečně oddělily jednotlivé vrstvy. Organická a vodná vrstva byly od sebe odděleny pomocí Pasteurovy pipety, část na styku obou fází byla odstraněna. Vyhodnocení probíhalo pomocí spektrofotometrického stanovení koncentrace, kdy bylo odebráno vždy 20 μl vzorku z dané fáze do 2 ml DMF v kyvetě. Měření bylo pro kontrolu opakováno za použití PYR jako rozpouštědla v absorpční kyvetě. Z naměřených maxim Q pásu byly stanoveny koncentrace vzorků v jednotlivých fázích podle Lambert-Beerova zákona a vypočteny příslušné rozdělovací koeficienty $P = c_o/c_v$, respektive $\log P$. Hodnoty uvedené v **Tabulka 5** v diskuzi představují průměrné hodnoty získané z obou měření.

7.6 Studium vazby fotosenzitizérů na bílkoviny v buněčném médiu

Vazba na bílkoviny byla studována u dvou fotosenzitizérů (300Zn-Me a Photosens, viz Diskuze) za použití spektrofotometrických metod a stanovení kvantových výtěžků fluorescence. Do kyvety bylo napipetováno buněčné médium (2 ml) obsahující všechny standardní látky kromě bílkovin, stejně tak do porovnávací kyvety. Byla proměřena základní linie pro „čistá rozpouštědla“. Následně bylo přidáno 20 μl fotosenzitizéru ve vodě ze zásobního roztoku o koncentraci 100 μM (finální koncentrace fotosenzitizéru v kyvetě byla tedy 1 μM). Bylo proměřeno příslušné

absorpční a emisní spektrum (excitační vlnová délka 606 nm pro Photosens a 638 nm pro 300Zn-Me). Následně bylo do kyvety postupně přidáváno definované množství bílkovin (obvykle 10-100 μ l), po každém přidání bylo proměřeno absorpční a emisní spektrum. Bílkoviny byly přidávány i do porovnávací kyvety ve spektrofotometru, aby nedocházelo k ovlivnění absorpčního spektra. Za stejných podmínek excitace byl proměřen ZnPc v THF (pouze základní roztok bez titrace bílkoviny) a použit jako referenční látka pro výpočet Φ_F podle metody popsané výše (kap. 7.2.) a popsané rovnicí 7.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

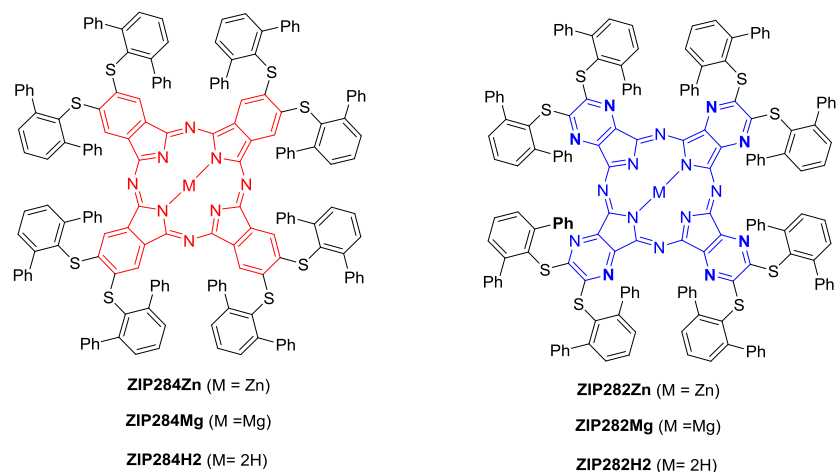
Experimentální část mé diplomové práce by se dala rozdělit na tři hlavní podčásti – studium fotofyzikálních vlastností dvou sérií derivátů ftalocyaninů připravených naší výzkumnou skupinou, studium Φ_F ZnPc v různých rozpouštědlech a optimalizace metody stanovení Φ_Δ . Důvodem první části bylo detailní seznámení s fotofyzikálními vlastnostmi derivátů ftalocyaninů a seznámení se s metodami zaběhnutými v naší pracovní skupině. Druhá a třetí část pak již sloužila k hledání nových možností v oblasti fotofyzikálního hodnocení derivátů ftalocyaninů. Nejvíce do detailu se budu věnovat části zabývající se vývoji absolutní metody měření 1O_2 , která tvořila hlavní náplň mé diplomové práce.

8.1 Studium fotofyzikálních vlastností derivátů ftalocyaninů připravených Azaphthalocyanine group

Jak bylo zmíněno výše, seznámení se se zaběhnutými možnostmi sledování fotofyzikálních parametrů Pcs bylo nezbytné pro další části plánované v rámci mé diplomové práce. Pro tyto experimenty byly vybrány dvě rozdílné série derivátů ftalocyaninů.

a) Porovnání vlastností arylsulfanylových Pcs s jejich aza-analogy

První skupina sloužila mimo jiné k porovnání Φ_F a Φ_Δ ftalocyaninů a jejich aza-analogů ze skupiny tetrapyrazinoporfyrazinů (AzaPc) nesoucích arylsulfanylové substituenty (*viz Obrázek 15*). Sloučeniny byly připraveny Annou Málkovou v rámci její diplomové práce vypracované pod vedením doc. Zimčíka.



Obrázek 15: Struktury AzaPc a Pc studované v rámci této diplomové práce

Ze změřených absorpčních spekter roztoků o koncentraci 1 μM v tetrahydrofuranu (THF), za použití metodiky zmíněné u stanovení extinkčních koeficientů DPBF, byly zjištěny a porovnány příslušné extinkční koeficienty celé studované série. Zjištěná data shrnuje **Tabulka 3**. Tetrahydrofuran byl zvolen jako rozpouštědlo, neboť díky svému koordinujícímu charakteru zabraňuje tvorbě nežádoucích agregátů, které by znemožnily správnou interpretaci získaných výsledků. Φ_F byl změřen pomocí referenční metody se ZnPc jako referenční látkou ($\Phi_{F(\text{ZnPc})} = 0,32$ v THF). Metodika experimentu odpovídá metodice popsané v části 7.2 a je výstižně popsána i v předchozích publikacích naší výzkumné skupiny. [32] [31]

Tabulka 3: Spektrální a fotofyzikální data Pc a AzaPc měřená v THF za pokojové teploty

| Slouč. | | $\lambda_{\text{Amax}} (\epsilon) / \text{nm} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ | λ_{Fmax} | Φ_F^* | τ_F / ns | Φ_A |
|--------------|-------|--|-------------------------|------------|----------------------|----------|
| 284Zn | Pc | 720 (301 000) | 725 | 0,26 | 2,64 | 0,56 |
| 284Mg | Pc | 720 (332 000) | 725 | 0,51 | 5,01 | 0,25 |
| 284H2 | Pc | 747 (217 000) a 717 (173 000) | 751 | 0,35 | 4,62 | 0,21 |
| 282Zn | AzaPc | 661 (270 000) | 668 | 0,21 | 1,85 | 0,72 |
| 282Mg | AzaPc | 663 (300 000) | 670 | 0,40 | 3,58 | 0,49 |
| 282H2 | AzaPc | 682 (143 000) a 657 (107 000) | 688 | 0,018 | 0,27 / 2,01 | 0,20 |

* $\lambda_{\text{exc}} = 646 \text{ nm}$ (pro Pc) a 602 nm (pro AzaPc)

Ze získaných dat je patrné, že Pc mají výrazně posunutý Q-pás k delším vlnovým délkám (tj. k červené části spektra), což je výhodné pro PDT jak bylo zmíněno v Teoretické části. Z hlediska extinkčních koeficientů dosahují Pc i AzaPc srovnatelných hodnot okolo $300\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, takto vysoké hodnoty jsou velice výhodné pro použití v PDT. Ze série je patrné, že zinečnaté komplexy mají vyšší

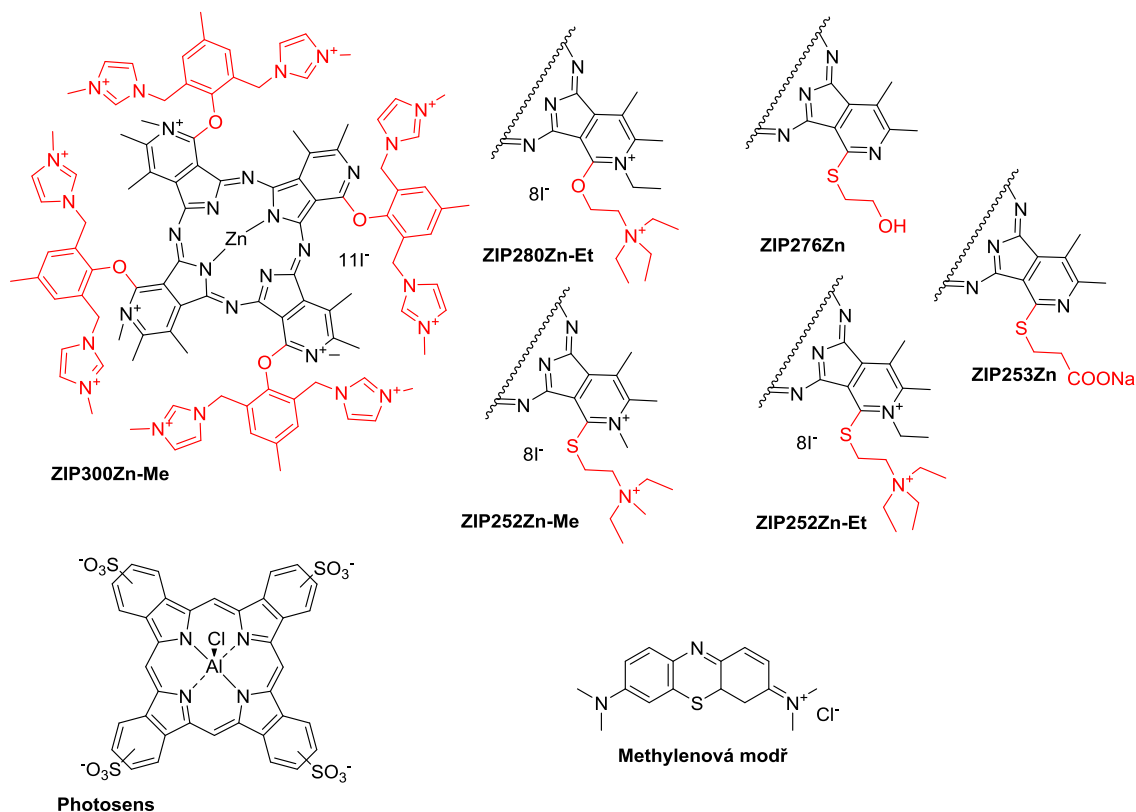
kvantové výtěžky singletového kyslíku, zatímco hořečnaté komplexy relaxují s větší pravděpodobností cestou fluorescence. Tyto výsledky jsou v souladu s tzv. efektem těžkého atomu, podle kterého zavedení atomu s vyšší molekulovou hmotností zvýší pravděpodobnost mezisystémového přechodu dané molekuly, a tím se následně zvýší i produkce singletového kyslíku. Jelikož součet všech relaxačních procesů je nejvýše 100%, dojde u takovýchto sloučenin k poklesu relaxace cestou fluorescence. Dalším parametrem fluorescence je tzv. doba života fluorescence (τ_F), která se pohybovala u studované série sloučenin v řádech nanosekund. Hodnoty byly přímo úměrné naměřeným kvantovým výtěžkům fluorescence.

Je zajímavé, že součet obou kvantových výtěžků u zinečnatých a hořečnatých Pc i AzaPc je vždy blízký hodnotě 1, tedy že produkce singletového kyslíku společně s emisí fluorescence představuje dvě hlavní cesty relaxace těchto sloučenin. Zaměříme-li se však na bezkovové deriváty ZIP282H2 a ZIP284H2, můžeme si všimnout, že obě sloučeniny nedosahují v součtu $\Phi_F + \Phi_\Delta$ hodnoty 1. Tento fakt je výrazně prohlouben u AzaPc 282H2. Podle tvaru absorpčních spekter je možné vyloučit agregaci jako příčinu nižších kvantových výtěžků. I když příčina tohoto jevu nebyla zatím jednoznačně potvrzena, domníváme se, že u bezkovových derivátů probíhá intramolekulární přenos náboje, který způsobuje zhášení excitovaných stavů a působí tak jako kompetitivní děj k fluorescenci a produkci singletového kyslíku.

b) Studování fotofyzikálních vlastností tetrapyridoporfyrinů

Druhou sérii sloučenin tvořily strukturně odlišné aza-analogy ftalocyaninů, konkrétně se v tomto případě jedná o izosterní záměnu benzenových jader za pyridinová, čímž získáme tzv. tetrapyridoporfyriny (TPyPz). Sloučeniny byly připraveny Jirkou Demuthem, Pavlem Čermákem a Magdou Vavrečkovou v rámci jejich diplomových prací. Struktury studovaných sloučenin shrnuje **Obrázek 16**. Na rozdíl od předchozí série sloučenin se jedná o výrazně hydrofilnější sloučeniny díky kvartérním amino- substituentům (**ZIP252Zn-Et**, **ZIP252Zn-Me**, **ZIP280Zn-Et**, **ZIP300Zn-Me**), karboxylovým (**ZIP253Zn**), respektive hydroxy skupinám (**ZIP276Zn**) na periférii makrocycly. Sloučeniny **ZIP252Zn-Me** a **ZIP252Zn-Et** se liší pouze alkylem použitým ke kvarternizaci, který tak sloužil k porovnání jeho vlivu na fotofyzikální vlastnosti a především pak pro studium fotodynamické aktivity na úrovni *in vitro*. Kromě těchto sloučenin nasyntetizovaných naší výzkumnou skupinou, byly do

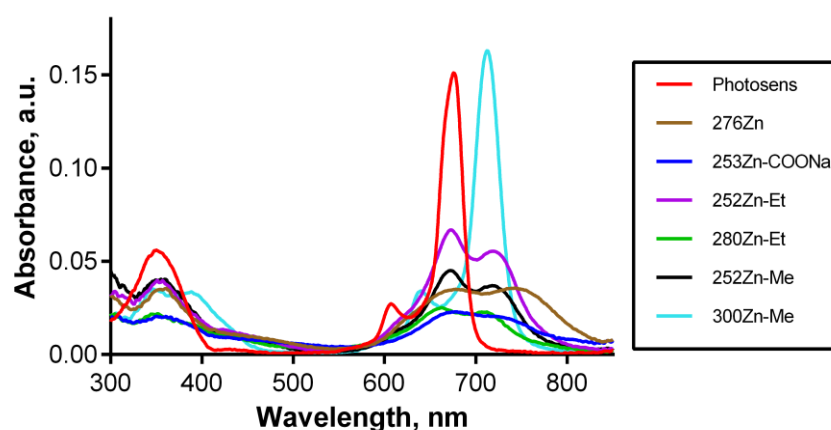
série zařazeny další dvě sloučeniny, které sloužily jako srovnávací standardy používané v praxi v oblasti fotodynamické terapie (Photosens a methylenová modř).



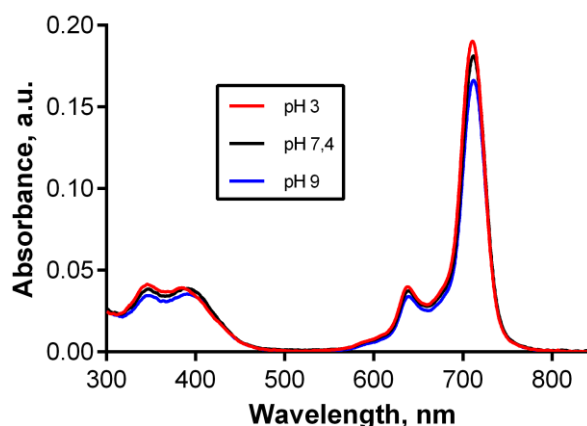
Obrázek 16: Struktury TPyPz studované v rámci této diplomové práce

Spektrální vlastnosti celé série byly studovány ve třech různých rozpouštědlech – DMF, voda a pyridin. Většina sloučenin vykazovala monomerní spektrum v pyridinu (PYR), který silně koordinuje centrální zinečnatý kation a zamezuje možnost přiblížení dvou planárních makrocyclů k sobě a tím i možnost tvorby agregátů. DMF má také zachovanou koordinační schopnost, nicméně slabší než PYR. Ve všech těchto rozpouštědlech byly stanoveny extinkční koeficienty studovaných sloučenin. **Tabulka 4** uvádí některá z těchto dat. Zaměříme-li se tedy nejprve na spektrální vlastnosti TPyPz série, zjistíme, že tyto sloučeniny mají oproti Pc (a tedy i Photosensu) silně posunutý Q-pás do červené části spektra. Pro fotodynamickou terapii se tyto sloučeniny proto zdají tedy být velice výhodné. Z naměřených extinkčních koeficientů je patrné, že TPyPz vykazují hodnoty podobné ftalocyaninům a jejich derivátům, konkrétně se pohybují okolo $200\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Výjimku tvoří sloučenina **253Zn**, která má Q-pás tvaru typického pro agregované deriváty (tj. pokles maximu Q-pásu, tvorba nových

maxim při kratších i delších vlnových délkách než je Q-pás, celkově „široký“ charakter Q-pásu) s extinkčními koeficienty v řádech pouze $30\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Nižší hodnotu extinkčního koeficientu vykazuje i **280Zn**, pravděpodobně je tedy také částečně agregovaný. Spektrální vlastnosti jsme studovali také v buněčném médiu, abychom mohli porovnat náchylnost k agregaci u jednotlivých derivátů v biologicky relevantním prostředí. V buněčném médiu (*viz. Graf 1*) byly všechny sloučeniny kromě **ZIP300Zn** a **Photosensu** silně agregované. Lze tedy předpokládat, že tato sloučenina bude mít nejvýhodnější fotofyzikální vlastnosti a následně i fotodynamickou *in vitro* aktivitu. Pomocí spektrálních měření jsem dále potvrdila, že pH nemá vliv na agregační chování této sloučeniny (*viz. Graf 2*).



Graf 1: Absorpční spektra studované série TPyPz v buněčném médiu



Graf 2: Absorpční spektra 300Zn-Me v pufrch o různém pH

Fotofyzikální vlastnosti (Φ_F , Φ_Δ) byly i v tomto případě studovány za použití ZnPc jako referenční látky, díky svému hydrofilnímu charakteru byly vlastnosti některých derivátů popsány nejen v organickém rozpouštědle (DMF), ale i ve vodě. Sloučenina **276Zn** vykazovala částečnou agregaci, a proto byla přeměřena i v PYR. Naměřené fotofyzikální parametry shrnuje **Tabulka 4**. Já jsem v tomto případě měřila všechna spektrální a fluorescenční data. Φ_Δ byly naměřeny RNDr. Pavlem Kubátem, CSc. (Heyrovského institut fyzikální chemie, AV ČR Praha) a jsou zde uvedeny pro úplnost.

Tabulka 4: Fotofyzikální parametry TPyPz a srovnávacích standardů

| Sloučenina | Rozp. | $\lambda_{Amax} (\epsilon) / \text{nm}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ_{Fmax} | $\Phi_F^{[a]}$ | τ_F / ns | $\Phi_\Delta^{[b]}$ |
|------------------|---------|--|------------------|----------------|----------------------------|-------------------------------|
| 252Zn-Me | DMF | 722 (211 400) | 734 | 0,10 | 1,56 | 0,72 |
| 252Zn-Et | DMF | 722 (257 400) | 734 | 0,10 | 1,51 | 0,72 / 0,61 ^[b] |
| 253Zn | DMF | 718 (31 000) 678 (31 500)* | 741 | 0,008 | 1,84 (96%), 4,15 (4%) | ~ 0,09 |
| 280Zn-Et | DMF | 711 (76 000) * | 722 | 0,087 | 1,92 | 0,43 |
| 300Zn-Me | DMF | 710 (190 000) | 721 | 0,13 | 1,97 | 0,69 / 0,50 ^[c] |
| 300Zn-Me | voda | 711 (162 700) | 724 | 0,17 | 2,19 | 0,58 |
| 276Zn | DMF | 729 (145 000) | 744 | 0,089 | 1,75 | 0,42 |
| 276Zn | pyridin | 739 (165 100) | 754 | 0,094 | 1,81 | 0,52 |
| Photosens | DMF | 681 (178 800) | 687 | 0,54 | 5,98 | - |
| Photosens | voda | 679 (149 600) | 684 | 0,58 | 5,08 | 0,37 |
| MM | voda | - | 685 | 0,048 | 0,40 (86%) a 4,99 (14%) | 0,52 |

^[a] λ_{exc} = 645 nm, s výjimkou Photosensu a MM, u kterých byla λ_{exc} = 606 nm; ^[b] data naměřená fyzikální luminiscenční metodou (viz kap. 6.1) RNDr. Pavlem Kubátem, CSc. (Heyrovského institut fyzikální chemie, AV ČR Praha); ^[c] data naměřená fotochemickou metodou v naší laboratoři za použití DPBF; * agregace

Z výsledků je patrné, že kromě **253Zn**, která silně agreguje, mají všechny sloučeniny poměrně vysoké Φ_Δ v rozmezí 0,43-0,72. Hodnoty jsou srovnatelné s methylenovou modří (MM) nebo dokonce částečně vyšší než u sloučenin používaných v praxi. Z hlediska fluorescenčních parametrů platí stejné závislosti jako u předchozí série sloučenin, tedy, vyšší hodnoty Φ_Δ díky efektu těžkého atomu vedou k nižším hodnotám Φ_F . Doby života fluorescence jsou i v tomto případě přímo-úměrné

naměřeným Φ_F . Z dat je patrné, že sloučenina **276Zn** agreguje v DMF pouze nepatrně, neboť rozdíly oproti PYR nejsou příliš vysoké, dají se považovat za srovnatelné. Alkyl použitý na kvarternizaci periferních diethylaminových substituentů nemá vliv na fotofyzikální vlastnosti, protože výsledky pro deriváty **252Zn-Et** a **252Zn-Me** jsou srovnatelné.

Kromě zmíněných spektrálních a fotofyzikálních parametrů jsem se u této série sloučenin věnovala ještě dalším dvěma parametrům předurčujícím potenciální fotodynamickou účinnost, a to jejich lipofilitě a interakci s bílkoviny v buněčném médiu. I když se nejedná o fotofyzikální vlastnosti a netýká se tedy přímo tématu zadání diplomové práce, chtěla bych velice krátce tyto výsledky zmínit.

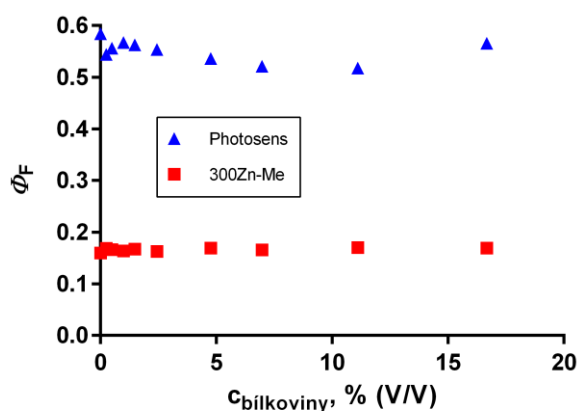
Stanovení lipofility/hydrofility bylo provedeno na základě stanovení logP pomocí extrakční metody a vyhodnocení pomocí absorpční spektroskopie (viz Experimentální část). Výsledky shrnuje **Tabulka 5**. Sloučenina **253Zn** se během měření vysrážela a nemohla být správně vyhodnocena. Sloučenina **280Zn-Et** vykazuje částečně agregované spektrum, což mohlo částečně negativně ovlivnit výsledky měření. Podle očekávání, kvartérní sloučeniny i Photosens se rozdělují především do vodné fáze, naopak hydroxy-substituovaný **276Zn** spíše do organické. Nenabitě substituenty nejsou tedy dostatečně účinné k zajištění hydrofility TPyPz.

Tabulka 5: Vyhodnocení lipofility/hydrofility a logP TPyPz

| Sloučenina | c_o/c_v | LogP |
|------------------|-----------|-------|
| 300Zn-Me | 0,010 | -1,99 |
| 276Zn | 8,01 | 0,90 |
| 252Zn-Me | 0,16 | -0,81 |
| 252Zn-Et | 0,20 | -0,71 |
| Photosens | 0,0082 | -2,12 |
| 280Zn-Et | 8,09 | 0,91 |

Interakce s bílkoviny může být na jednu stranu výhodná, neboť v některých případech může monomerizovat případné agregáty makrocyclů, na druhou stranu může však výrazně snížit fotodynamickou aktivitu fotosenzitizérů. [33] Z předchozích výsledků bylo patrné, že **300Zn-Me** je nejslibnější sloučenina z celé série, a proto byla použita pro tento experiment. Ze získaných dat (viz **Graf 3**) je patrné, že ani **300Zn-Me** ani v praxi používaný Photosens nejeví známky interakce s bílkoviny, která by se

případně projevila silným poklesem kvantových výtěžků fluorescence po přidání bílkoviny.



Graf 3: Titrace 300Zn-Me a Photosensu bílkovinami v prostředí buněčného média

8.2 Fluorescence

Jak bylo zmíněno výše, v další části práce jsem se zaměřila na studování vlivu rozpouštědla na kvantové výtěžky ZnPc.

8.2.1 Měření absorpčního spektra a excitačního spektra ZnPc

Po naměření absorpčních spekter ZnPc v různých rozpouštědlech byla zhodnocována jejich správnost na základě „nasedání“ spektra na základní linii čistého rozpouštědla. Nesprávné „nasedání“ spektra na základní linii bylo způsobeno agregací ZnPc v daném rozpouštědle. V těchto případech jsme se snažili eliminovat agregaci v rozpouštědle přidáním 25 μl PYR (tj. finálně 1% PYR v/v). Pokud vzorek stále vykazoval agregaci, bylo nutné navíc jeho zahřátí na magnetické míchače.

Absorpční spektra ZnPc byla proměřována v ethanolu (EtOH), chlornaftalenu (CHNF), benzenu, tetrahydrofuranu (THF), pyridinu (PYR), toluenu (TOL), acetonu (ACE), *N,N*-dimethylformamidu (DMF), dimethylsulfoxidu (DMSO), dichlormethanu (DCM) a acetonitrilu (ACN).

Tabulka 6: Přehled agregace ZnPc a jejího řešení v různých typech rozpouštědel

| Agregace pozorována v: | Způsob řešení agregace |
|------------------------|-------------------------------|
| TOLUEN | 25 μ l PYRIDINU + zahřátí |
| ETHANOL | 25 μ l PYRIDINU + zahřátí |
| BENZEN | 25 μ l PYRIDINU + zahřátí |
| DICHLORMETHAN | zahřátí |
| ACETONITRIL | vyřazen z měření |

Postup k eliminaci agregace (*viz. Tabulka 6*) byl nutný použit u TOL, EtOH a benzenu. Absorpční spektrum v DCM se podařilo přes silnou agregaci proměřit bez PYR, čehož bylo dosaženo pouhým zahřátím. ACN byl z důvodu silné agregace ZnPc v rozpouštědle z měření úplně vyřazen. U ostatních rozpouštědel se agregace neprojevila.

Tvar a polohy B- a Q-pásu absorpčních spekter ZnPc v rozpouštědlech byly dále porovnávány se spektry excitačními. Vzájemná shoda tvaru spekter je důkazem monomerního charakteru ZnPc v rozpouštědle. Tato vlastnost je zcela zásadní pro změření správných hodnot Φ_F i Φ_Δ . Všechna námi naměřená absorpční spektra a spektra u kterých byla eliminována agregace, vykazovala shodu se spektry excitačními.

8.2.2 Měření emisních spekter a stanovení Φ_F

Emisní fluorescenční spektra ZnPc byla primárně měřena za účelem získání Φ_F . Mimoto byly na spektrech sledovány posuny emisních maxim v závislosti na typu rozpouštědla (*viz. Tabulka 7*) Rozpouštědla, ve kterých ZnPc podléhal agregaci byla proměřována dvakrát. Poprvé v čistém stavu, poté s 1% PYR (v/v) a po zahřátí.

Tabulka 7: Emisní maxima ZnPc v jednotlivých rozpouštědlech

| Rozpouštědlo | Emisní max λ [nm] | Rozpouštědlo | Emisní max λ [nm] |
|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| EtOH | 672 | TOL | 675 |
| EtOH + PYR | 673 | TOL + PYR | 677 |
| CHNF | 683 | ACETON | 670 |
| BENZEN | 676 | DMF | 675 |
| BENZEN + PYR | 677 | DMSO | 678 |
| THF | 671 | DCM | 677 |
| PYR | 679 | | |

8.2.3 Stanovení Φ_F

Hodnoty Φ_F ZnPc v rozpouštědlech byly získány za použití obecného vzorce pro výpočet Φ_F (viz rovnice č.7). Vzorec byl upraven tak, aby nám umožnil lepší orientaci ve výsledcích a snadnější výpočet. Některé parametry výpočtu tak byly zahrnuty do tzv. korekčního faktoru standardu. Standardní hodnotou byl stanoven Φ_F ZnPc v CHNF, díky jeho tabelované hodnotě. Samotné vyhodnocení bylo rozděleno do dvou částí. V první části byl stanoven korekční faktor ZnPc v CHNF. V druhé části byly tímto faktorem korigovány jednotlivé Φ_F ZnPc v konkrétních rozpouštědlech.

8.2.4 Vyhodnocení korekčního faktoru chlornaftalenu

Korekční faktor ZnPc v CHNF byl vypočítán dle vzorce:

$$f_{ZnPc\ v\ CHNF} = \frac{\Phi_F^R \cdot 1 - 10^{-A^S}}{F^S} \quad (\text{rovnice č.15})$$

kde Φ_F^R je kvantový výtěžek fluorescence ZnPc v CHNF, A^S je absorbance ZnPc v CHNF při excitační λ , F^S plocha pod emisním spektrem standardu. Tento vztah vychází z rovnice pro Φ_F uvedené výše. (viz. rovnice č.7)

Korekční faktor byl vyhodnocován při excitační λ 365 a 598 nm vždy ze 3 měření pro každou z λ a byl stanoven jako $1,10 \cdot 10^{-6}$ (pro 365 nm) a $1,16 \cdot 10^{-6}$ (pro 598 nm).

8.2.5 Φ_F ZnPc v různých rozpouštědlech

Teoreticky by měla být hodnota Φ_F ZnPc nezávislá na λ , proto by se měla vždy v daném rozpouštědle shodovat (*viz. Tabulka 8*). Nicméně u některých rozpouštědel se hodnoty poměrně liší, což může být způsobeno nečistotami, které absorbují při kratších λ . Odečtená A pak nemusí odpovídat správné hodnotě. Z tohoto důvodu se obvykle preferenčně využívá excitace v Q-pásmu Pcs, která je charakteristická pouze pro studované sloučeniny. Z naměřených dat je patrné, že rozpouštědlo má poměrně velký vliv na Φ_F . Lze tedy říci, že volba rozpouštědla bude mít velký vliv při studování fluorescenčních vlastností případných fotosenzitizérů, a je proto vždy nutné důsledně zvážit volbu příslušného rozpouštědla. Stejně tak lze jednoznačně doporučit excitaci v Q-pásmu, neboť nebude ovlivněna případnými nečistotami absorbujícími při kratších vlnových délkách.

Tabulka 8: Kvantové výtěžky fluorescence ZnPc v rozpouštědlech

| Rozpouštědlo | Excitace při 598 nm | Excitace při 365 nm |
|----------------|---------------------|---------------------|
| THF | 0,43 | 0,60 |
| PYR | 0,37 | 0,40 |
| TOL | 0,32 | 0,42 |
| TOL + 1% PYR | 0,37 | 0,38 |
| ACETON | 0,40 | 0,46 |
| DMF | 0,44 | 0,50 |
| DMSO | 0,47 | 0,52 |
| DCM | 0,57 | 0,62 |
| EtOH | 0,81 | 0,82 |
| EtOH + 1% PYR | 0,50 | 0,50 |
| Benzen | 0,50 | 0,55 |
| Benzen + 1%PYR | 0,49 | 0,62 |

8.3 Kvantový výtěžek singletového kyslíku

Závěrečná část mé diplomové práce se týkala již hledání a optimalizace absolutní metody stanovení kvantového výtěžku singletového kyslíku. Prvním krokem bylo stanovení extinkčního koeficientu DPBF v DMF, poté následovala měření za pomoci ozařovací lampy (celé spektrum světelného záření) a laseru (jedna excitační vlnová délka).

8.3.1 Stanovení extinkčního koeficientu DPBF v DMF

Experimentálně zjištěná hodnota ε DPBF v DMF byla $\varepsilon = 22\,490\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tato hodnota byla dále používána v matematických operacích stanovení Φ_{Δ} . Hodnota sloužila ke korekci přesné koncentrace roztoku DPBF dle Lambert-Beerova zákona (viz rovnice 3) ($l = 1\text{ cm}$).

8.3.2 Optimalizace metody stanovení Φ_{Δ}

Námi hledaná a v literatuře deklarovaná hodnota Φ_{Δ} ZnPc v DMF byla:

$$\Phi_{\Delta} = 0,56 \text{ [34]}$$

V průběhu experimentu a vývoje absolutní metody měření Φ_{Δ} byly uvažovány následující faktory ovlivňující měření:

- a) typ technického zařízení
- b) vzdálenost a použití komponent technického zařízení
- c) ozařovací perioda vzorku
- d) časová perioda měření energie ozařovacího zdroje
- e) hodnota energie ozařovacího zdroje
- f) světelné spektrum ozařovacího zdroje a použití vhodných filtrů

Hodnota Φ_{Δ} byla získávána z rovnice lineární závislosti $1/\Phi_{DPBF}$ na $1/[DPBF]$. (viz. Teoretická část, kapitola 6.3)

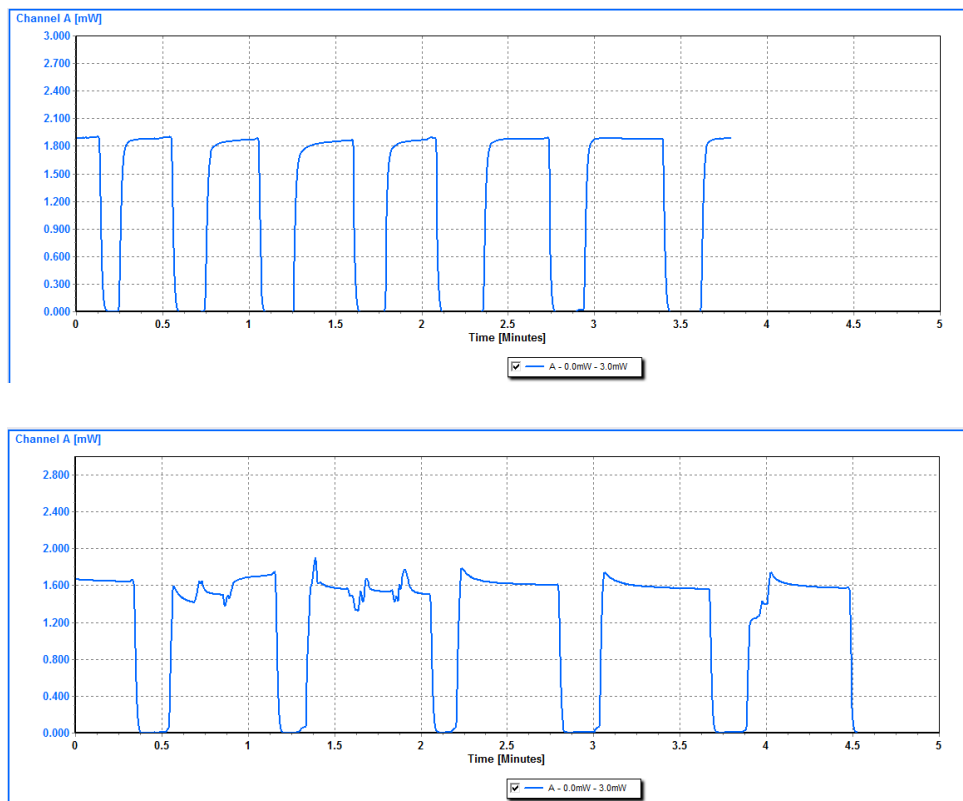
8.3.3 Stanovení Φ_{Δ} pomocí technického zařízení s ozařovací lampou

Průběžná měření výkonu P_0 ozařovací lampy ukázala nedostatky ve stanovení této veličiny. Při shodném nastavení výkonu lampy ($120 \mu\text{W}$), stanovené hodnoty v průběhu měření kolísaly (viz. *Tabulka 9*).

Příklad záznamu měření výkonu P_0 je uveden níže (viz. *Obrázek 17*).

Tabulka 9: Přehled hodnot výkonu ozařovací lampy

| Měření P_0 ozařovací lampy [μW] | ráno | v poledne | večer |
|--|------|-----------|-------|
| 1. | 525 | 545 | 527 |
| 2. | 565 | 559 | 556 |
| 3. | 280 | 270 | 253 |

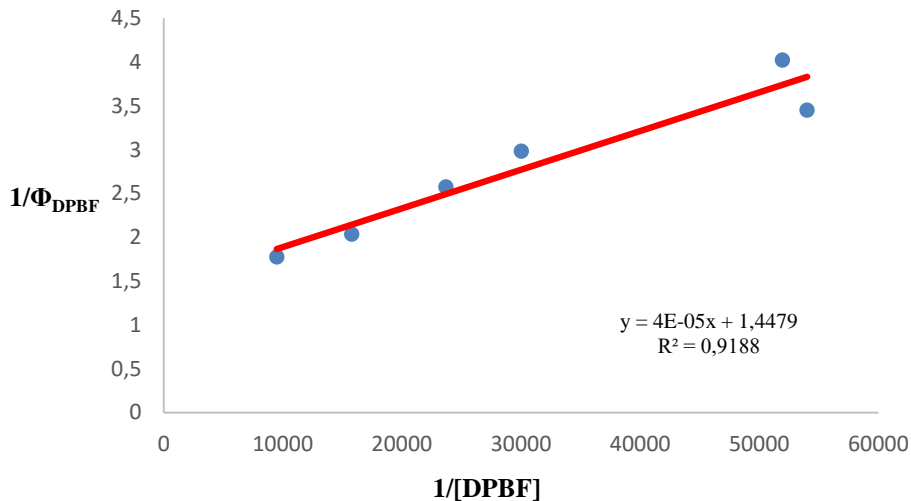


Obrázek 17: Příklad záznamu měření výkonu ozařovací lampy. Horní záznam naměřen na začátku měření, spodní záznam na konci stanovení Φ_{Δ} .

Z grafu závislosti $1/\Phi_{DPBF}$ na $1/[DPBF]$ (viz. **Obrázek 18**) je patrné, že vzhledem ke kolísání výkonu ozařovací lampy docházelo i k nerovnoměrnému snižování koncentrace DPBF. Jedním z negativních faktorů ovlivňujících měření byla i schopnost lampy zářit světlem celého spektra, tedy všech λ . Z tohoto důvodu muselo námi navržené technické zařízení obsahovat bandpass filtr, schopný odfiltrovat pouze 1 λ ozařující vzorek, konkrétně 633 nm. K dalším energetickým a světelným ztrátám mohlo docházet vlivem čočky, která sloužila k fokusaci paprsku lampy do měrné kyvety. Souhrn všech těchto negativních efektů měl pravděpodobně za následek nelineární průběh závislosti $1/\Phi_{DPBF}$ na $1/[DPBF]$ a tím i nepřesnou hodnotu Φ_{Δ} získanou za pomoci této metody:

$$\Phi_{\Delta} = 0,69$$

Srovnáním s definovanou hodnotou Φ_{Δ} ZnPc v DMF (0,56) je patrné, že měření bylo zatíženo velkou chybou a není vhodné pro použití pro nové fotosenzitizéry.



Obrázek 18: Závislost získaná pomocí ozařovacího zařízení s lampou

8.3.4 Stanovení Φ_{Δ} pomocí laseru

Hlavním impulsem pro změnu ozařovacího zařízení bylo zajištění světelného zdroje, který by byl schopen ozářit vzorek jedinou definovanou λ světla bez nutnosti použití bandpass filtru a fokusování pomocí čočky.

Při pilotním měření Φ_{Δ} pomocí laseru bylo zjištěno, že vlivem silného výkonu zařízení dochází k velmi rychlému úbytku koncentrace DPBF. Celkového 15% poklesu koncentrace DPBF bylo dosaženo již v průběhu první osvětlovací periody.

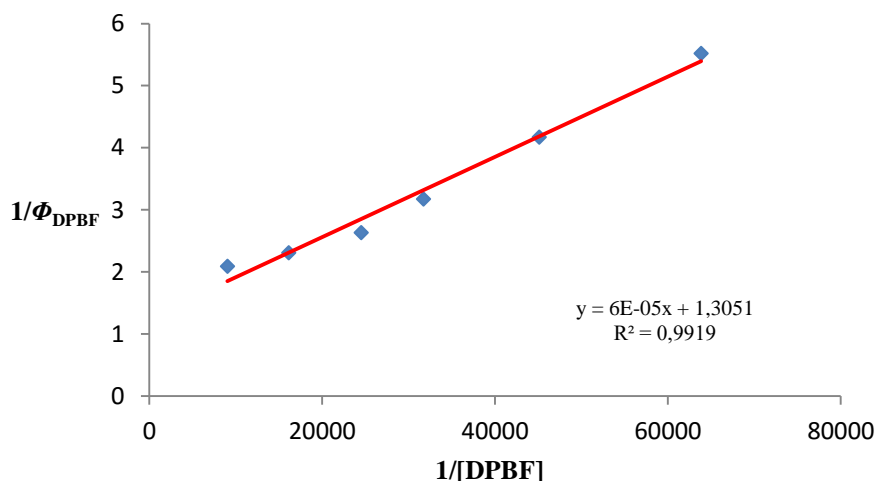
Z tohoto důvodu byl použit filtr typu ND03 (jeho optická hustota je 0,3 při vlnové délce 632,8 nm). Vzhledem k rychlému úbytku c_{DPBF} byla upravena i osvětlovací perioda tak, aby celkový pokles c_{DPBF} na konci měření stále odpovídal přibližně 15%. Vzorek byl osvětlován po 15s, tj. byla sbírána data v čase 15s, 30s, 45s, 60s, 75s, 90s.

Výkon laseru byl měřen před začátkem měření, vždy ráno po 30 min zahřívání přístroje. Poté znovu odpoledne po dokončení měření (*viz. Tabulka 10*)

Tabulka 10: Ukázka hodnot P_0 laseru za použití filtru ND03

| Měření P_0 laseru za použití ND03 filtru [μW] | ráno | odpoledne |
|--|------|-----------|
| | 533 | 570 |

I přes možnost přesnějšího měření výkonu laseru bylo zjištěno, že hodnoty stále kolísají. (*viz. Obrázek 19*). Pro výpočet kvantového výtěžku byla použita průměrná hodnota ze všech získaných měření P_0 .



Obrázek 19: Závislost získaná za použití laseru a filtru ND03

Ani tuto závislost nelze považovat za dostatečně lineární pro výpočet Φ_{Δ} . Hodnota Φ_{Δ} získaná pomocí technického zařízení s laserem a filtrem ND03 byla:

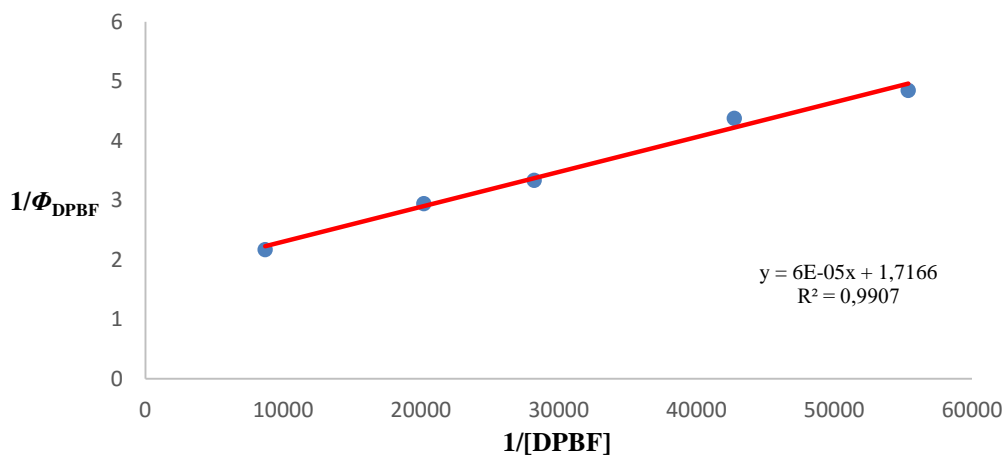
$$\Phi_{\Delta} = 0,76$$

Vzhledem k uvedeným výsledkům byl filtr ND03 obměněn za filtr ND10 (optická hustota ND10 je 1,0 při 632,8 nm) (viz. *Tabulka 11*)

Tabulka 11: Ukázka hodnot výkonu laseru za použití filtru ND10

| Měření P_0 laseru za použití ND10 filtru [mW] | ráno | odpoledne |
|---|------|-----------|
| | 1,88 | 1,61 |

Závislost $1/\Phi_{DPBF}$ na $1/[DPBF]$ vykazuje v tomto případě dostatečnou linearitu (viz. *Obrázek 20*).



Obrázek 20: Závislost získaná za použití laseru a filtru ND10

Hodnota získaná na základě této absolutní metody měření Φ_{Δ} se téměř shoduje s hodnotou deklarovanou v literatuře:

$$\Phi_{\Delta} = 0,58$$

Závěrem lze tedy říci, že použití laseru jako ozařovacího zdroje společně s filtrem ND10 se jeví jako optimální pro budoucí využití při stanovování Φ_{Δ} nových fotosenzitizérů připravovaných v rámci naší výzkumné skupiny.

9 ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce byly nejprve stanoveny fotofyzikální parametry dvou sérií různých derivátů ftalocyaninů a dosažené výsledky byly diskutovány ve vztahu k jejich struktuře. Cílem této části bylo seznámení se s metodami doposud používanými v naší výzkumné skupině.

Další část práce se zabývala porovnáním kvantových výtěžků fluorescence ZnPc v různých typech rozpouštědel. Bylo zjištěno, že hodnoty se v různých rozpouštědlech značně liší, a je proto vždy nutné důsledně zvažovat volbu vhodného rozpouštědla. Dále lze shrnout, že je vždy výhodnější excitovat ftalocyaniny v jejich Q-pásu, abychom se vyvarovali chybám vzniklým v důsledku přítomnosti nízkomolekulárních nečistot.

Ve stěžejní části práce byla vyvinuta a optimalizována absolutní metoda stanovení Φ_{Δ} využívající laser jako zdroj monochromatického světla. Metoda je plně funkční v našich laboratorních podmínkách a bude tak používána pro stanovení Φ_{Δ} dalších ftalocyaninů a jejich analogů, jakožto potenciálních fotosenzitizérů syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

10 CITOVANÁ LITERATURA A ZDROJE OBRÁZKŮ

1. **SPILLER, W., KLIESCH, H., WÖHRLE, D., HACKBARTH, S., RÖDER, B. a SCHNURPFEIL, G.** Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)* [online]. 1998, (02), 145-158 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1002/(sici)1099-1409(199803/04)2:2<145::aid-jpp60>3.0.co;2-2.
2. **AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K.A., et al.** Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. Published online 2011 May 26, 2011, 61(4), 250-281 [cit. 2015-11-05]. DOI: 10.3322/caac.20114. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20114>
3. **MACDONALD, I. J. a DOUGHERTY, T.J.** Basic principles of photodynamic therapy: Review. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)*. New York, USA: John Wiley and Sons, 2001, 05(02), 105-129. DOI: 10.1002/jpp.328. ISSN 1088-4246. Dostupné také z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1002/jpp.328>
4. **LANG, K., MOSINGER, J. a WAGNEROVÁ, D.M.** Singletový kyslík v praxi - současnost a perspektiva. *Chemické listy* [online]. 2006, **100**(3), 169-177 [cit. 2015-11-05]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_03_169-177.pdf
5. **HUANG., Y.Y., MROZ, P. a HAMBLIN, M.R.** PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES ONLINE. *Basic photomedicine*. [Online] 15. 05 2009. [Citace: 20. 11 2015.] <http://www.photobiology.info>.
6. **MANSOUR, M.S: a LOTFIA M., E.** *Laser Science and Applications : Proceedings of the Sixth International Conference*. Singapur : World Scientific Publishing Co., 2010. str. 294. ISBN:9789812814593.
7. **KESSEL, D.** *INTRODUCTION TO PHOTODYNAMIC THERAPY* [online]. Detroit, 2008, 2015-11-20 [cit. 2015-11-20]. Dostupné z: <http://www.photobiology.info/Kessel.html>. Wayne State University School of Medicine.
8. **WAINWRIGHT, M.** *Photosensitisers in biomedicine*. Hoboken, N.J. : John Wiley/Wiley-Blackwell, 2009. str. 298. ISBN :9780470744949.
9. **ZIMČÍK, P.** Azaftalocyaniny - od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chemické listy*. 2012, 106(4), 275 - 282. ISSN 0009-2770.

10. **KOSTKA, M., ZIMCIK, P., MILETIN, M., KLEMERA, P., KOPECKY, K. a MUSIL, Z.** Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2006, 178(1), 16-25. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2005.06.014. ISSN 10106030. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603005003059>
11. **VALEUR, B. a BERBERAN-SANTOS, M.N.** *Molecular fluorescence : principles and applications*. 2nd. Weinheim : Wiley-VCH, 2013. str. 593. ISSN :978-352-7328-468.
12. **TELFER, A.** Singlet Oxygen Production by PSII Under Light Stress: Mechanism, Detection and the Protective role of β -Carotene. *Plant and Cell Physiology*. 2014, 55(7), 1216-1223. DOI: 10.1093/pcp/pcu040. ISSN 0032-0781. Dostupné také z: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcu040>
13. **ALBANI, J.R.** *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. ISBN 9781405138918.
14. NPTEL. [Online] IIT Madras, 11 2013. [Citace: 22. 11 2015.] Dostupné z : <http://nptel.ac.in/courses/102103044/6>.
15. **MILETÍN, M. a ZIMČÍK, P.** Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. historie, základní princip. *Česká a slovenská farmacie*. Praha: ČLS JEP, 2004, 53(5), 219-224. ISSN RIV/00216208:11160/04:00007175.
16. **MIN, D. B. a BOFF, J.M.** Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002, 1(2), 58-72. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x. ISBN 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x. ISSN 1541-4337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x>
17. **NONELL, S. a VIAPPIANI, C.** *BASIC SPECTROSCOPY* [online]. Barcelona, 2008, 2015-11-20 [cit. 2015-11-20]. Dostupné z: http://www.photobiology.info/Nonell_Viappiani.html. Universitat Ramon Llull; Università degli Studi di Parma.
18. **LOCHMAN, L.** The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes and pigments* [online]. 2015, 121, 178-187 [cit. 2015-11-09]. DOI: 10.1016/j.dyepig.2015.05.020. ISSN 01437208.
19. **MANN, M.M.** *Optical bandpass filter*. č.p. 388026 United States, 13. 8 1973.
20. **LEI, Z., SHENG, S. a LI, R.** *Wiley Series in Microwave and Optical Engineering : Microwave Bandpass Filters for Wideband Communications*. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, 2011. str. 240. ISBN:9780470876619.

21. **CVIJETIC, M.** *Optical Transmission Systems Engineering*. Boston, London : Artech House, 2003. str. 302. ISBN:9781580536363.
22. **BRANCALEON, L. a MOSELEY, H.** Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci*. Springer-Verlag London Limited, 2002, 2002(17), 173 - 186. DOI: 10.1007/s101030200027. ISBN 10.1007/s101030200027. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s101030200027>
23. **MANG, T.S.** Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier, 2004, 2004(1), 43 - 48. DOI: 10.1016/S1572-1000(04)00012-2. ISBN 10.1016/S1572-1000(04)00012-2. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100004000122>
24. **GOMES, A., FERNANDES, E. a LIMA, L.** Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, 65(2-3), 45-80. DOI: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003. ISSN 0165022x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X05001454>
25. **KREITNER, M., EBERMANN, R. a ALTH, G.** Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996, 36(2), 109-111. DOI: 10.1016/S1011-1344(96)07356-3. ISSN 10111344. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134496073563>
26. **ZIMCIK, P., MILETIN, M., MUSIL, Z., KOPECKY, K., KUBZA, L. a BRAULT, D.** *Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents—Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies*. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2006.02.022. ISBN 10.1016/j.jphotochem.2006.02.022. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603006000906>
27. **PACKER, L. a SIES, H.** *Singlet oxygen, UV-A, and ozone*. San Diego : Academic Press, 2000. str. 682. Sv. 319. ISBN:01-218-2220-6.
28. **BRASLAVSKY, S. E.** Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*. 2007-01-1, 79(3), -. DOI: 10.1351/pac200779030293. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2007.79.issue-3/pac200779030293/pac200779030293.xml>
29. **SEYBOLD, P. a GOUTERMAN, M.** Porphyrins: XIII: Fluorescence spectra and quantum yields. *Journal of Molecular Spectroscopy*. 1969(31), 1-13. DOI: 10.1016/0022-2852(69)90335-X. ISBN 10.1016/0022-2852(69)90335-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002228526990335X>
30. **ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., MILETIN, M., USLU KOBAK, R.Z., SVANDRLIKOVA, E., VÁCHOVÁ, L. a LANG, K.** Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorganic Chemistry*. 2012, 51(7), 4215–4223. DOI:

10.1021/ic2027016. ISBN 10.1021/ic2027016. Dostupné také z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic2027016>

31. **NOVAKOVA, V., MILETIN, M., FILANDROVÁ, T., LENČO, J., RŮŽIČKA, A. a ZIMCIK, P.** Role of Steric Hindrance in the Newman-Kwart Rearrangement and in the Synthesis and Photophysical Properties of Arylsulfanyl Tetrapyrazinoporphyrazines. *The Journal of Organic Chemistry*. 2014, 79(5), 2082-2093.
32. **SVEC, J., ZIMCIK, P., NOVAKOVA, L., RAKITIN, O.A., AMELICHEV, S.A., STUZHIN, P.A. a NOVAKOVA, V.** 1,2,5-Chalcogenadiazole-Annulated Tripyrazinoporphyrazines: Synthesis, Spectral Characteristics, and Influence of the Heavy Atom Effect on Their Photophysical Properties. *European Journal of Organic Chemistry*. 2015, 2015(3), 596-604. DOI: 10.1002/ejoc.201403329.
33. **MACHACEK, M., KOLLÁR, J., MILETIN, M., KUČERA, R., KUBÁT, P., SIMUNEK, T., NOVAKOVA, V. a ZIMCIK, P.** Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Advances*. 2016, (6), 10064 - 10077. DOI: 10.1039/C5RA25881B. ISBN 10.1039/C5RA25881B.
34. **GÜMRÜKÇÜ, G., KARAOĞLAN, G.K., ERDOĞMUŞ, A., GÜL, A. a AVCIATA, U.** Photophysical, Photochemical, and BQ Quenching Properties of Zinc Phthalocyanines with Fused or Interrupted Extended Conjugation. *Journal of Chemistry*. Istanbul, Turkey, 2014, 2014(Article ID 435834), 11 pages. DOI: 10.1155/2014/435834. ISBN 10.1155/2014/435834. Dostupné také z:
<http://www.hindawi.com/journals/jchem/2014/435834/>
35. **PHOTOLITEC.org.** [Online] 2013. [Citace: 21. 11 2015.] Dostupné z
: http://www.photolitec.org/Tech_PDT.html.
36. **MICROSCOPY RESOURCE CENTER.** [Online] Olympus America Inc, 2012.
z : <http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluoroexcitation.html>