



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Veronika Laubrová

Spektroskopické studium verteporfinu v liposomech

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Učitelství fyziky pro střední školy

Studijní obor: Učitelství fyziky pro střední školy se sdruženým studiem
Učitelství matematiky pro střední školy

Praha 2023

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

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

V Praze dne 21. 4. 2023

podpis

Děkuji vedoucímu této diplomové práce doc. RNDr. Romanu Dědicovi, Ph.D. za jeho obětavé vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady a připomínky, bez kterých bych tuto práci nedokončila.

Název práce: Spektroskopické studium verteoporfinu v liposomech

Autor: Veronika Laubrová

Katedra / Ústav: Katedra chemické fyziky a optiky

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

Abstrakt: V diplomové práci byly zkoumány fotochemické vlastnosti verteoporfinu v liposomech. Bylo využito absorpční a fluorescenční spektroskopie a časově rozlišené detekce singletního kyslíku generovaného verteoporfinem. Kinetiky emise singletního kyslíku byly zkoumány v podmínkách různé koncentrace rozpuštěného kyslíku, přítomnosti těžké vody a specifického zhášedce azidu sodného. Bylo zjištěno, že v liposomech se verteoporfin nachází ve dvou odlišných skupinách. Dále bylo zjištěno, že verteoporfin v liposomech prochází fotochemickou změnou, tvorba fotoproduktu byla pozorována v absorpčních i fluorescenčních spektrech. Tvorba fotoproduktu se odráží i v dobách nárůstu a poklesu kinetik luminiscence singletního kyslíku. Bylo prokázáno, že fotoprodukt vzniká za přítomnosti kyslíku v základním stavu mechanismem přenosu elektronu z tripletu verteoporfinu a tvorbou a následnou reakcí superoxidového radikálu.

Klíčová slova: verteoporfin, singletní kyslík, fotodynamická terapie, fotosenzibilizace, fosforescence

Title: Spectroscopic study of verteoporphin in liposomes

Author: Veronika Laubrová

Department: Department of Chemical Physics and Optics

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

Abstract: The diploma thesis examined the photochemical properties of verteoporphin in liposomes. Absorption and fluorescence spectroscopy and time-resolved detection of singlet oxygen generated by verteoporphin were used. The kinetics of singlet oxygen emission were studied under conditions of varying concentrations of dissolved oxygen, the presence of heavy water, and a specific quencher – sodium azide. It was found that verteoporphin in liposomes is present in two distinct groups. It was also found that verteoporphin in liposomes undergoes a photochemical change, and the formation of a photoproduct was observed in absorption and fluorescence spectra. The formation of the photoproduct is reflected in the times of increase and decrease of the kinetics of singlet oxygen luminescence. It has been demonstrated that the photoproduct is formed in the presence of oxygen in the ground state by an electron transfer mechanism from the triplet state of verteoporphin and the formation and subsequent reaction of a superoxide radical.

Keywords: verteoporphin, singlet oxygen, photodynamic therapy, photosensitization, phosphorescence

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Fotodynamická terapie (PDT).....	2
2.1	Historie PDT.....	2
2.2	Využití PDT	2
2.2.1	Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD)	3
2.3	Výhody PDT oproti jiným léčebným metodám a její nevýhody.....	5
2.4	Kyslík v pozadí PDT	5
2.4.1	Energetické hladiny a orbitaly kyslíku.....	5
2.4.2	Vznik $^1\text{O}_2$ fotosenzibilizací	6
2.4.3	Reakce $^1\text{O}_2$	7
2.4.4	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	8
2.5	Princip PDT	9
2.6	Ideální PS	10
2.6.1	Typy PS.....	11
2.7	Liposomy.....	13
2.8	Verteporfin (VP).....	14
3	Experimentální metody	16
3.1	Absorpční spektroskopie	16
3.2	Fluorescenční spektroskopie	16
3.3	Časově rozlišená detekce fosforescence.....	17
4	Materiály a příprava vzorků	19
5	Experimentální uspořádání	21
5.1	Absorpční spektrometr	21
5.2	Fluorescenční spektrometr	21
5.3	Detekce infračervené luminiscence.....	21
6	Výsledky měření a diskuze	23

6.1	Absorpční spektra	23
6.2	Fluorescenční spektra	27
6.3	Kinetika infračervené luminiscence	32
6.3.1	Měření v PBS	32
6.3.2	Měření v D ₂ O	45
7	Závěr	59
	Seznam použité literatury	60
	Seznam obrázků	65
	Seznam tabulek	69
	Seznam použitých zkratk	70

1 Úvod

Verteoporfin je derivát porfyriu, který se pod obchodním názvem Visudyne používá ve fotodynamické terapii. Jelikož je lipofilní, v lékové formě je používán ve formě liposomů.

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci [1], kde byl verteoporfin zkoumán ve formě roztoku v dimethylformamidu. Již v roztocích byla pozorována závislost dob života tripletního stavu verteoporfinu a singletního kyslíku na expozici v důsledku tvorby fotoproduktu. Z hlediska využití pro fotodynamickou terapii je důležité vědět, zda k podobnému procesu dochází i při zabudování verteoporfinu do liposomů.

V disertační práci Alexandra Molnára [2] byly v liposomech zkoumány příbuzné porfyriinové deriváty – porfyriu IX a hematoporfyriu. U obou těchto látek bylo pomocí změn rozpouštědla v okolí liposomů prokázáno, že molekuly fotosenzibilizátoru tvoří v liposomech dvě odlišné skupiny. Jedním z cílů práce je ukázat, zda k tomu dochází i v případě verteoporfinu.

Pro studium těchto fotofyzikálních vlastností verteoporfinu v liposomech je využito metod absorpční a fluorescenční spektroskopie a časově rozlišené detekce infračervené luminiscence singletního kyslíku generovaného verteoporfinem.

2 Fotodynamická terapie (PDT)

2.1 Historie PDT

Ještě předtím, než se hlouběji podíváme na to, co si pod pojmem PDT představít, nahlédneme na malý okamžik do historie. Zjistíme tak, že ačkoli není tato forma léčby zatím veřejnosti příliš známá, nejedná se o úplnou novinku.

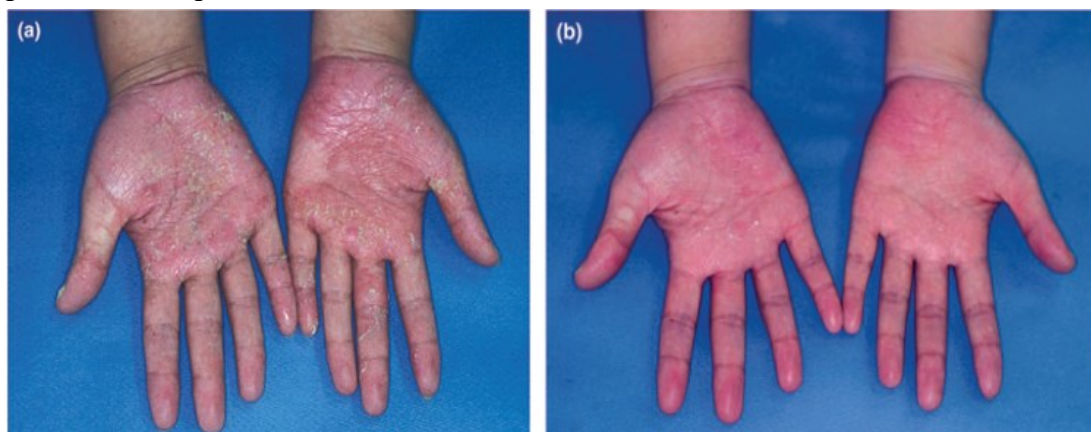
O skutečnosti, že pomocí světla lze léčit některé nemoci, ví lidstvo již několik tisíc let. Avšak teprve na konci předminulého a v minulém století můžeme mluvit o PDT – nejen co se způsobu léčby, ale i pojmenování týče: tento termín byl poprvé použit roku 1904 rakouským farmakologem von Tappeinerem a Jodlbauerem [3].

Roku 1900 bylo objeveno, že působení chemikálie a světla může způsobit buněčnou smrt. O tři roky později se von Tappeiner, tentokrát ve spolupráci s dermatologem Jesionekem, rozhodli léčit kožní tumor pomocí světla. V témže roce získal dánský lékař Finsen Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za objev léčby kožní formy tuberkulózy pomocí UV záření [4], [5]. Z řady dalších objevů, které přispěly k rozvoji PDT, jmenujme např. červenooranžovou fluorescenci některých nádorů při jejich stimulaci UV zářením, kterou jako první pozoroval Policard [3].

Na objevy muže, který je označován za „otce PDT“, si svět musel ještě trochu počkat, konkrétně do 70. let 20. století. Tehdy Dougherty realizoval první rozsáhlejší studii v oblasti PDT. Účastnilo se jí 25 pacientů s celkem 113 nádory kůže. Pouze 2 ložiska byla vůči léčbě rezistentní, 98 se jich podařilo vyléčit zcela.

2.2 Využití PDT

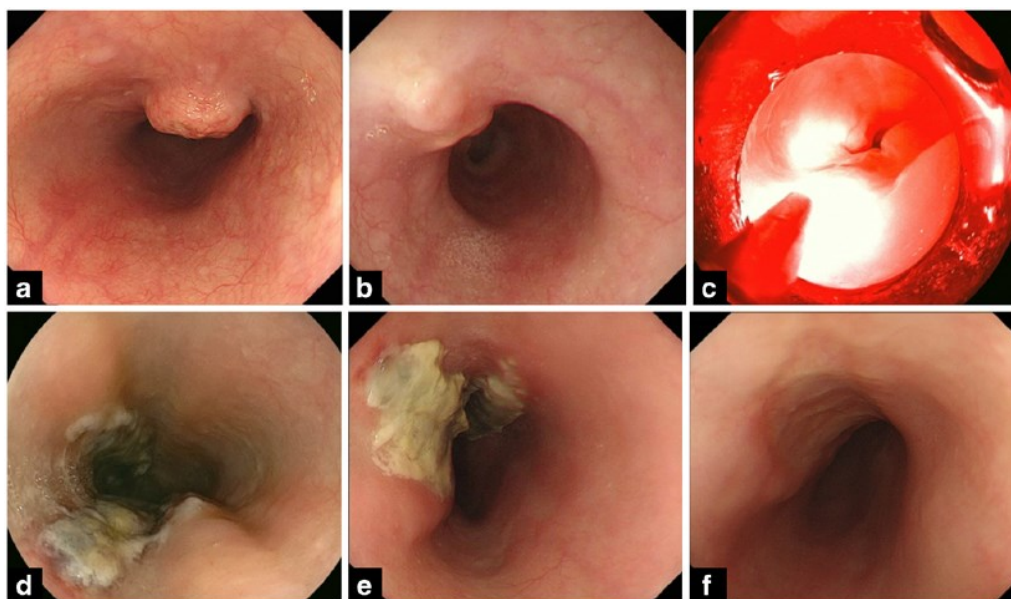
Množství oborů, kde lze PDT využít je překvapivě velmi široké, uvedeme tedy pouze několik příkladů.



Obr. 1: Vlevo stav pacienta s lupénkou před PDT, vpravo stav po léčbě (převzato z [53])

Oftalmologičtí pacienti mohou být pomocí PDT léčeni při choroidální neovaskularizaci či věkem podmíněné makulární degeneraci [3] (AMD – viz oddíl 2.2.1), ti dermatologičtí zase např. při lupénce [6], jak ukazuje obr. 1.

Nejvýznamnějším využitím PDT jakožto léčebné metody je dozajista léčba onkologických onemocnění. Konkrétní případ této léčby můžeme vidět na obr. 2. Část **a** ukazuje nádor před léčbou, část **b** zbytek nádoru po léčbě pomocí chemoradioterapie, **c** pak přímou aplikaci PDT. Na zbylých snímcích pak vidíme stav po aplikaci PDT a to s časovými odstupy 2 dny (**d**), 2 týdny (**e**) a 10 týdnů (**f**).



Obr. 2: Léčba nádoru pomocí chemoradioterapie a PDT (převzato z [49])

Probíhají také výzkumy, které mají za cíl zjistit, zda by v budoucnu nebylo možné používat PDT k léčbě infekcí jako je HIV nebo hepatitida (v současné době je tato metoda finančně nedostupná) či s ní léčit bakteriální kmeny rezistentní vůči antibiotikům [7].

PDT je také možné využít jako metodu diagnostickou – např. v gastroenterologii pro odhalení Barrettova jícnu [6].

Principy, na kterých PDT stojí, ale nalezneme i na místech s medicínou nesouvisejících – v pesticidech, detoxikačních činidlech či při čištění vody [8].

2.2.1 Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD)

AMD (z anglického Age-related macular degeneration) je progresivní oboustranné oční onemocnění, které je v rozvinutých zemích nejčastějším důvodem ztráty

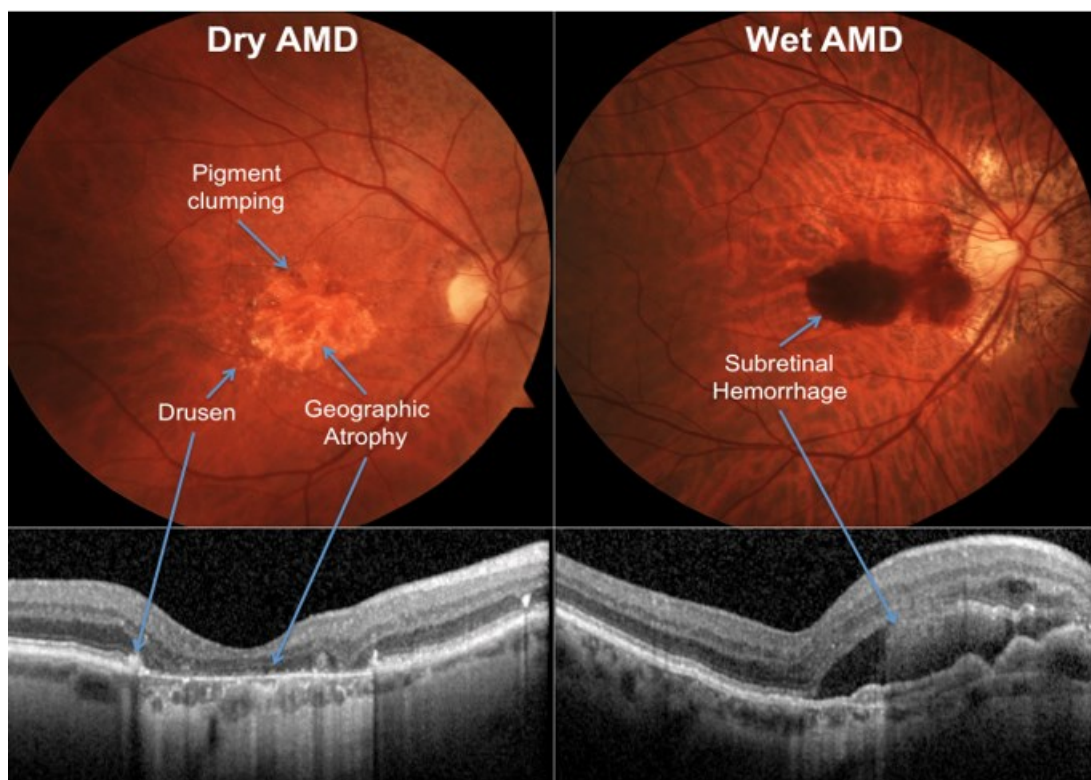
zraku u pacientů starších 55 let. Příčina tohoto onemocnění není dosud známá, rizikovými faktory však jsou kromě věku např. genetické predispozice, rasa, kouření, pohlaví či vysoký tlak [9].

AMD se vyskytuje ve dvou formách – *vlhké* (či *exsudativní a neovaskulární*) a *suché* (či *atrofické a neexsudativní*).

Suchá forma je výrazně obvyklejší – vyskytuje se až v 9 z 10 případů. Jen zřídka vede k závažné poruše zraku [9]. Pacienti s touto formou AMD postupně přichází o schopnost vidět ostře v centrální části zorného pole [3]. Příčinná léčba suché formy AMD není dosud známá. Úpravou životosprávy lze snížit riziko nástupu onemocnění. Probíhá vývoj léků, které by přinejmenším zpomalily již probíhající AMD [9].

Vlhká forma se projevuje rychlou a výraznou ztrátou ostrosti zraku. Průběh této formy AMD je velmi rychlý – od prvních příznaků k úplné ztrátě zraku často uběhnou pouhé měsíce. Důvodem těchto problémů je vznik nových cév v oblasti sítnice, jejichž stěny však nejsou dostatečně pevné. Dochází tak k odchlípení sítnice vlivem prosakování krve z těchto nových cév a vzniku jizev [10], [3]. Vlhké forma AMD je léčena anti-VEGF přípravky a u pacientů, kteří na tuto léčbu nereagují, se využívá PDT s verteporfinem. PDT v tomto případě způsobí okluzi nechtěných cév [9].

Porovnání změn na sítnici při suché a vlhké formě AMD je znázorněné na obr. 3.



Obr. 3: Porovnání změn na sítnici při suché (vlevo) a vlhké (vpravo) formě AMD (převzato z [51])

2.3 Výhody PDT oproti jiným léčebným metodám a její nevýhody

Onemocnění, k jejichž léčbě se PDT může používat, lze léčit i jinými způsoby. Proč se tedy využívá i PDT? Protože PDT postrádá některé nevýhody těchto jiných metod.

Budeme-li se zabývat uplatněním v onkologii, je PDT možné oproti chemoterapii či radioterapii zacílit pouze na poškozenou tkáň a neovlivňovat negativním způsobem i zbytek organismu [4], [11] (způsoby, jak toho lze docílit jsou popsány v části 2.5). PDT rovněž postrádá jejich nežádoucí účinky, jako jsou vznik nádorů, osteoporóza či genetické mutace [12], [13], [14]. Naopak, nežádoucími účinky PDT bývají dočasná fotosenzitivita kůže a bolest při aplikaci.

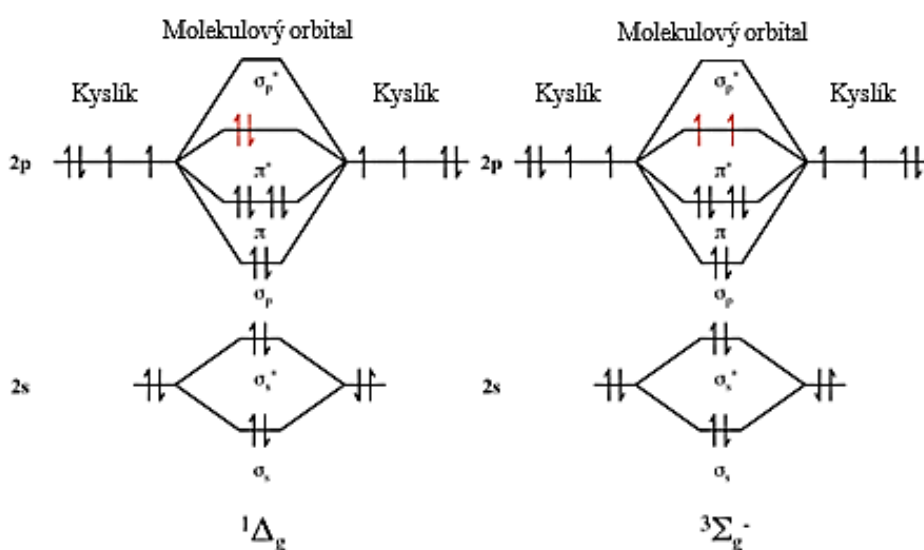
Dále je možné kombinovat PDT i s jinými léčebnými postupy a používat ji i preventivně [11].

Jako vše má ale i PDT své nevýhody. Patří mezi ně zejména vysoká cena léků, speciální přístrojové vybavení a časová náročnost [11].

2.4 Kyslík v pozadí PDT

2.4.1 Energetické hladiny a orbitály kyslíku

Cílem této práce není podrobně popsat fyzikální a chemický základ PDT. Přesto, chceme-li alespoň naznačit, o jaké základy se opírá, nevyhneme se pojům *singletní* (v některých zdrojích též *singletový*) a *tripletní* (či *tripletový*) stav. O obou těchto stavech můžeme hovořit v případě, že má atom či molekula alespoň dva elektrony [15].



Obr. 4: Schematické znázornění molekulových orbitalů kyslíku (upraveno z [50])

Abychom tento děj popsali, pomůžeme si jeho schematickým znázorněním na obr. 5.

Na začátku máme látku specificky citlivou vůči světlu, takzvaný fotosenzibilizátor (v některých zdrojích též fotosenzitizér), pro který budeme nadále používat zkratku PS. Tato látka je v základním singletním stavu S_0 .

Dopadne-li na PS světlo, PS toto světlo absorbuje – jeden z elektronů opustí nejvyšší obsazený molekulový orbital a přejde do orbitalu s vyšší energií. PS se pak nachází v singletním excitovaném stavu S_1 [17].

Pro PS však není možné v tomto stavu setrvat. Buď tak vyzáří přebytečnou energii ve formě světla a vrátí se do stavu S_0 (tento jev se nazývá fluorescence), nebo se do původního stavu vrátí nezářivě. Kromě těchto dvou možností může ještě nastat třetí. PS přejde do prvního tripletního stavu T_1 převrácením spinu excitovaného elektronu [10].

Ale i z tohoto stavu se PS snaží dostat zpět na stav S_0 . Dochází k tomu opět vyzářením energie ve formě světla (tentokrát nazývaným fosforescence), nezářivě či prostřednictvím reakce s okolními molekulami. Tyto reakce se nazývají fotoreakce I. a II. typu.

Typ I se vyznačuje přenosem elektronu nebo protonu z tripletního stavu PS na okolní biomolekuly. Vzniká tak superoxidový anion, který se dále přetváří na další reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty jsou již schopné oxidativně poškozovat buněčnou tkáň, míra tohoto poškození se zvyšuje s koncentrací PS, tedy též s koncentrací vznikajících ROS [17], [18], [19], [20].

Druhou možností je, že přebytečnou energii tripletního stavu PS přijme 3O_2 a jejím působením přejde do stavu 1O_2 . Tato velmi reaktivní forma kyslíku následně prostřednictvím oxidační reakce rychle poničí okolní biomolekuly [18], [19], [20]. S největší pravděpodobností je to právě tento II. typ fotoreakce, který se podílí na ničení tkání při PDT větší měrou [21].

2.4.3 Reakce 1O_2

Nyní máme k dispozici 1O_2 . Ten je ovšem mnohem reaktivnější než 3O_2 , bude tedy reagovat se svým okolím. V dalších řádcích uvádíme velmi stručný přehled nejvýznamnějších reakcí 1O_2 v závislosti na dalších přítomných reaktantech.

$^1\text{O}_2$ oxiduje některé aminokyseliny a z nich tvořené proteiny. Sám je oxidován při reakcích s prvky s volným elektronovým párem (dusík, síra, fosfor...), nebo při reakcích s nimi přechází do tripletního stavu [15].

Při reakcích $^1\text{O}_2$ s alkeny se přeruší dvojná vazba, odtrhává se vodík, dvojná vazba se posune a vznikne hydroperoxid [15].

$^1\text{O}_2$ se též zúčastňuje cykloadičních reakcí, kdy ze dvou π -vazeb vzniknou dvě σ -vazby. Reaguje též s komponenty tuků a fosfolipidů, z nukleových kyselin především s guaninem [15].

2.4.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Do této chvíle jsme stále mluvili o $^1\text{O}_2$. Nyní je načase přiznat, že patří do skupiny tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS z anglického Reactive Oxygen Species) a rozhodně tam nepatří sám.

Na základě původu zvýšené reaktivity můžeme ROS rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny řadíme molekulové radikály, jejichž reaktivita pramení z nespárovaného elektronu. Do této skupiny řadíme např. (tečkou ve vzorcích označujeme radikálový elektron):

- hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$. Ten je dle některých zdrojů ve formě volné částice jednou z nejjedovatějších látek vůbec [22]. To je způsobeno jeho schopností narušit při reakcích s biomolekulami dvojnou vazbu a odtrhnout vodík [8], [22].
- superoxidový anion $\cdot\text{O}_2^-$. Ten může v těle vzniknout i přirozenými procesy, při kterých kyslík přejme elektron. V porovnání s jinými ROS není příliš reaktivní. Jeho reakcemi však vznikají jiné ROS [15], [22].
- peroxylový radikál $\text{R-OO}\cdot$ a další.

Druhou skupinou jsou pak neradikálové ROS. Tato skupina zahrnuje látky jako ozon O_3 , peroxid vodíku H_2O_2 či organické peroxidy R-OOH .

Reakce H_2O_2 s biomolekulami neprobíhají příliš rychle, významný je však pro svou reakci, při které vzniká $\cdot\text{OH}$. Tato reakce se nazývá Fentonova a schematicky ji můžeme zapsat takto:

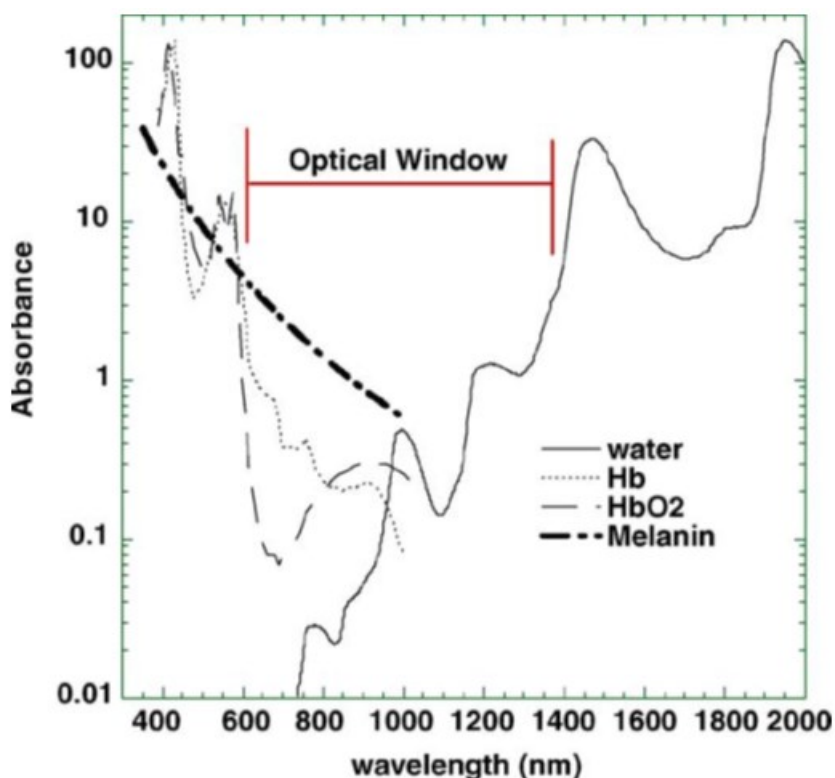


2.5 Princip PDT

Když nyní víme, k čemu se PDT používá, a máme přehled o ROS, asi nás napadá přirozená otázka. Jak léčba pomocí PDT funguje?

Pacientovi, kterému je tato léčba indikována, je nejprve podáno léčivo s PS (vlastnosti a konkrétní příklady těchto látek jsou rozebírány v části 2.6). Způsob podání PS se liší dle charakteru léčeného onemocnění. Je možné jej podat systémově, tedy intravenózně či perorálně, čímž se PS rychle roznese do celého organismu. Systémové podání však vystavuje pacienta většímu riziku nežádoucích účinků. Druhou možností je pak aplikovat PS lokálně, tzv. topicky. Tento způsob si můžeme představit např. tak, že je pacientovi potřena kůže léčivem s obsahem PS [3], [4], [17]. Tento způsob se ovšem nedá použít vždy.

PS se postupně akumuluje v postižených tkáních a jeho koncentrace v tkáních zdravých klesá. K tomuto jevu dochází přirozenými procesy v organismu. V případě nádorových onemocnění, velmi zjednodušeně řečeno, buňky rychle rostoucího nádoru vychytávají z krevního oběhu více stavebních látek než zdravé buňky, vychytají tak i více PS [3]. Aby tato akumulace proběhla, je potřeba po podání PS vyčkat. Délka čekání se odvíjí od použitého PS a způsobu podání a onemocnění, např. je-li jako PS



Obr. 6: Optické okno a absorpční spektra důležitých chromoforů (převzato z [17])

použit verteporfin, je třeba po intravenózním podání počkat zhruba 15 minut [21]. Dalším faktorem vysvětlujícím zvýšenou koncentraci v nádorových tkáních je tzv. EPR efekt, tj. skutečnost, že jejich cévy jsou více propustné než v tkáních zdravých a chybí lymfatická drenáž, která by přebytečné látky vylučovala ven z nádoru [23].

Další fází PDT je ozáření nemocné tkáně světlem. Oproti radioterapii se ale v PDT využívá světlo s vyššími vlnovými délkami, které samo o sobě nemá dostatečnou energii na ničení tkání. Avšak pro fotosenzibilizaci je jeho energie dostatečná. Konkrétní použitá vlnová délka závisí na hlavním absorpčním pásu použitého PS, ale je třeba mít na paměti dvě věci. Zaprvé, vlnová délka použitého světla se nachází v intervalu tzv. optického okna, tj. mezi zhruba 600 nm a 1300 nm [12], [17]. Světlo vlnové délky pod tímto intervalem pohlcuje hemoglobin, oxyhemoglobin či melanin a světlo s vlnovou délkou nad intervalem voda [4]. Optické okno, spolu s absorpčními spektry důležitých chromoforů jsou znázorněny na obr. 6. Zadržte, světlo vlnové délky při horní hranici optického okna již nemá dostatečnou energii, aby jeho působením mohl vznikat $^1\text{O}_2$ [12]. Z těchto důvodů je v PDT nejpoužívanější červené světlo.

Jak bylo řečeno výše, koncentrace PS ve zdravých buňkách je menší než v nádorových, ale není nulová. Při ozařování tak jsou do určité míry poškozovány i zdravé tkáně. Z toho důvodu je nutné světelný zdroj zacílit do požadovaného místa. Nejvýhodnějšími zdroji světla (a také nejvyužívanějšími) jsou tak lasery [24].

Při ozáření tkáně s PS se spouští proces popsáný v části 2.4.2. Dochází k ničení nemocné tkáně, při němž se pravděpodobně více uplatňuje fotoreakce II. typu [25]. Cílem PDT je dosáhnout buněčné smrti, apoptózy či nekrózy. Ačkoli by se mohlo zdát, že řízená buněčná smrt je pro organismus výhodnější, nese s sebou riziko, že zvolené dávky PS a světla nebudou dostatečné a bude tak nutné PDT opakovat. Často se proto raději dávky zvýší, aby došlo k nekróze [7]. Z pohledu dnešní medicíny je její léčba snazší, než léčba onkologického onemocnění.

2.6 Ideální PS

Do této chvíle jsme definovali PS jen jako látku vyznačující se specifickou citlivostí vůči světlu. Vzhledem k tomu, že PS využíváme pro medicínské účely, je stěží překvapující, že toto není jediná podmínka, kterou budeme na PS klást. Abychom odlišili látky, které splňují pouze první podmínku, budeme PS využívané v medicíně označovat přívlastkem ideální.

Ideální PS a jejich degradační produkty v první řadě nesmí být pro organismus jako takové za tmy toxické. Naopak by měly dobře produkovat $^1\text{O}_2$ a další ROS, aby bylo možné je využívat při PDT [12], [14], [26].

Další důležitou vlastností pro ideální PS je dobrá akumulace v požadovaných tkáňích a následné rychlé vyloučení jeho zbytků z organismu. Dále je požadováno, aby se absorpční maximum PS nacházelo ve vlnových délkách 600 nm (resp. dle [21] 680 nm) až 800 nm (resp. dle [26] 850 nm), neboť – jak již bylo zmíněno výše – v tomto rozmezí pronikne světlo do tkání nejhluběji a navíc má dostatečnou energii pro spuštění produkce $^1\text{O}_2$ [12], [14].

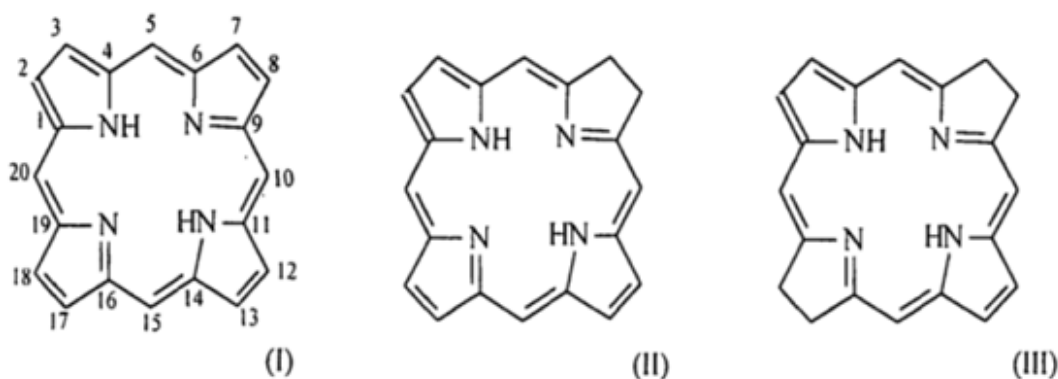
V neposlední řadě musí být ideální PS chemicky čistá, stabilní a snadno syntetizovatelná látka známého složení, u níž se snadno provádí kontrola kvality [12], [14], [21], [26].

2.6.1 Typy PS

PS je na základě různých kritérií možné dělit do několika skupin. V následujících řádcích uvádíme stručný přehled těchto dělení.

- Dělení na základě generace

S vývojem PDT se přirozeně vyvíjí i PS. Na začátku tak stála první generace PS, do níž patří hematoporfyrin a jeho deriváty [25]. Tato generace PS však nesplňovala některé požadavky, které klademe na ideální PS. Jsou to složité látky, které se navíc špatně akumulují v určených tkáňích a jejichž absorpční maximum se nachází ve vlnových délkách, které jsou pohlcovány tkáněmi. Z těchto důvodů bylo při PDT s použitím PS první generace nutné využívat velké dávky PS a světla, což vedlo ke zvýšenému riziku nežádoucích účinků [27].



Obr. 7: Strukturální typy porfyrinů (I), chlorinů (II) a bakteriochlorinů (III) (převzato z [4])

Kvůli výše zmíněným nedostatkům generace první začala být vyvíjena generace druhá. Tato skupina, do níž patří porfyriny, ftalocyaniny, texapyriny, chloriny či bakteriochloriny, již splňuje kritéria kladená na ideální PS [25], [27].

Přestože PDT s druhou generací PS funguje, vyvíjí se generace třetí. Tato generace obsahuje PS první a druhé generace, kterou jsou ovšem konjugované [25] nebo zabalené v nosičích (protilátky, polymery či liposomy). Důvodem těchto úprav je snazší transport PS do cílové tkáně [28].

- Dělení podle syntetické čistoty

V tomto kritériu rozlišujeme PS na chemicky čisté a složené z více složek. Ačkoli to tak může znít, nejsou vícesložkové PS pro využití v PDT horší [25].

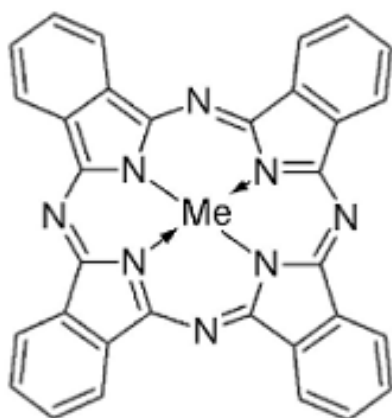
- Dělení podle cílení

Toto dělení odlišuje PS podle toho, zda zůstávají v cévním systému nebo se akumulují v tkáních [25].

- Dělení podle chemické struktury

Toto kritérium je často používáno pro charakterizaci PS, pro PDT má však jen malý význam. Většinu PS můžeme zařadit mezi cyklické tetrapyroly (což jsou deriváty porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů – jejich struktura je znázorněna na obr. 7) [25].

Druhou skupinou tohoto dělení jsou pak ftalocyaniny (jejich struktura je k nahlédnutí na obr. 8) a naftalocyaniny. Pro tyto látky je charakteristická špatná rozpustnost a agregace [17].

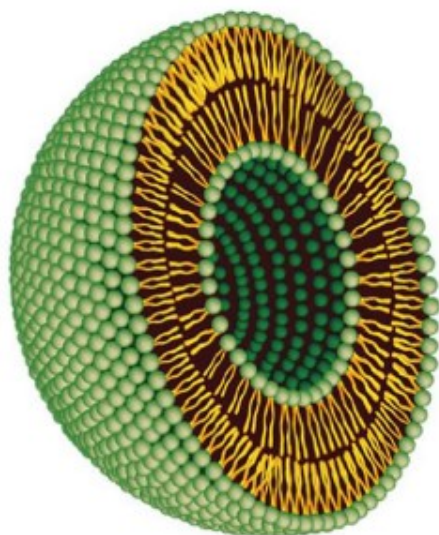


Obr. 8: Chemická struktura ftalocyaninů (převzato z [4])

2.7 Liposomy

Liposomy jsou kulovité vezikuly s průměrem od desítek nanometrů do několika mikrometrů připravované většinou z fosfolipidů, konkrétně fosfatidylcholinů (PC) [29]. Pro PDT a medicínu obecně jsou fosfolipidy významné z důvodu svého amfipatického charakteru – jsou hydrofilní i hydrofobní zároveň. Skládají se totiž z hydrofilní hlavičky a hydrofobního ocasu [30].

Ve vodném prostředí vytvoří fosfolipidy sférické dvojvrstvy, jak je znázorněné na obr. 9 – hydrofilní hlavičky (na obr. 9 zelené) směřují do okolního prostředí a do vnitřní dutiny a hydrofobní ocase (na obr. 9 žluté) naopak směřují k sobě [30]. Do takového liposomu je možné a výhodné uzavřít léčivo.



Obr. 9: Stavba liposomu (převzato z [52])

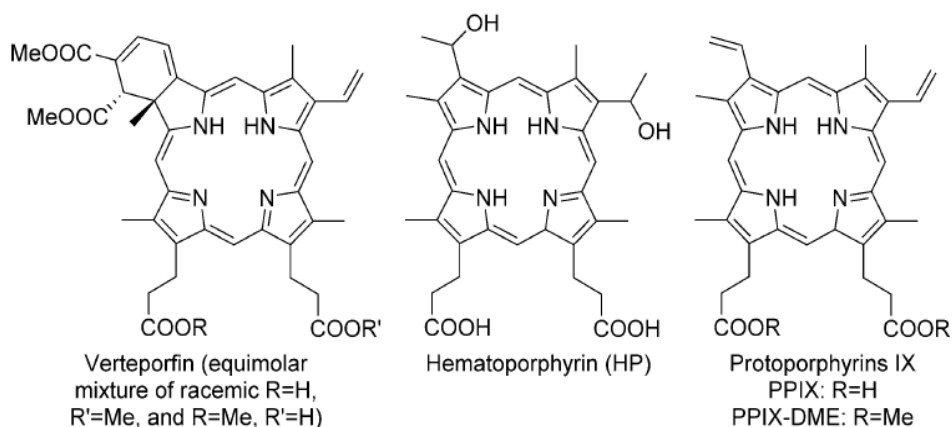
Výhody využití liposomů v PDT spočívají v tom, že PS uzavřený v liposomu se snadněji akumuluje v určených tkáních, především u hydrofobních léků dochází ke zvýšení jejich rozpustnosti a tedy snazšímu transportu po organismu v krevním řečišti a možnosti rozšířit léčbu pomocí PDT i na další typy onkologických onemocnění [31].

Liposomy je možné vyrábět mnoha způsoby, zmíníme pouze ty, které jsou pro tuto práci s ohledem na praktickou část důležité.

První takovou metodou je hydratace lipidového filmu. Lipidy (a léčivo) se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, kterým je nejčastěji chloroform. Ten se následně nechá odpařit, např. pomocí rotační odparky. Na stěnách použité nádoby tak vznikne tenký lipidový film. Ten následně hydratujeme vodným roztokem [32], [33].

Touto metodou ovšem vzniknou liposomy různých a tedy i větších rozměrů, než by mohlo být potřeba. Je tak zapotřebí sáhnout po další metodě, v našem případě

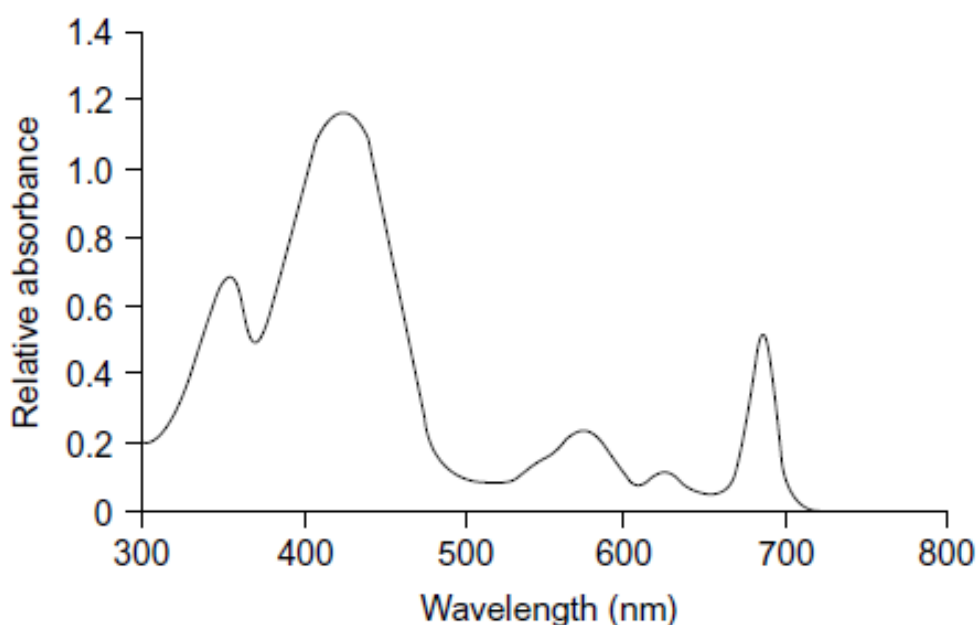
k membránové extruzi, pomocí které velikosti liposomů zmenšíme. Při této metodě je roztok vzniklý hydratací lipidového filmu opakovaně protlačován přes membránu o známé velikosti pórů. Vznikají tak liposomy, které mají požadovanou velikost [32], [33].



Obr. 10: Struktura verteporfinu, hematoporphyrinu a protoporphyrinu IX (převzato z [57])

2.8 Verteporfin (VP)

V PDT se používá mnoho různých PS, které bychom si zde mohli představit, pro tuto práci by to však nemělo přílišný význam. Přiblížíme si tedy pouze verteporfin (VP), který byl využíván k měření v praktické části této práce. Jeho chemickou strukturu a porovnání se strukturami hematoporphyrinu a protoporphyrinu IX ukazuje obr. 10.



Obr. 11: Absorpční spektrum verteporfinu (převzato z [54])

Tento PS druhé generace je v medicíně využíván jako léčivo s názvem Visudyne®. Tento derivát porfyriu byl poprvé vyvinut v 80. letech 20. století na Univerzitě Britské Kolumbie v kanadském Vancouveru [24]. Ze strukturního hlediska jej řadíme mezi chloriny [21].

VP má vlastnosti, které od ideálního PS očekáváme. Jeho absorpční maxima leží i v oblasti 680 nm až 695 nm (jak ukazuje obr. 11), produkuje velké množství $^1\text{O}_2$, a má tak velké cytotoxické účinky.

Z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě je VP podáván intravenózně ve formě liposomů. V krvi se spojuje do komplexu s nízkodenzitním lipoproteinem, který je následně rychle absorbován proliferujícími buňkami [10].

Po absolvování terapie se VP z těla pacienta vyloučí během jednoho až dvou dnů [21], [26].

Původně se zamýšlelo používat VP k léčbě onkologických onemocnění, v dnešních dnech je však používán především při léčbě AMD pomocí PDT [24]. Dalšími indikacemi pro léčbu PDT s VP jsou nemelanomové nádory kůže a nevus flammeus (tzv. oheň) [21].

3 Experimentální metody

3.1 Absorpční spektroskopie

Je-li energie světla pohlcena látkou, mluvíme o absorpci. Použitím absorpce můžeme určit, z jakých látek se vzorek skládá, pomocí zkoumání dvou faktorů: jaké vlnové délky vzorek absorboval a jak moc je absorboval. Metodu, která takto zkoumá látky, nazýváme absorpční spektroskopie [34].

Abychom mohli říci, kolik světla vzorek pohltí, je třeba zavést novou veličinu. Nazývá se absorbance a je definována vztahem [35], [36]

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

ve kterém symbol Φ_0 zastupuje tok světla dopadajícího na vzorek a Φ tok světla, které vzorkem prošlo.

Ovšem pomocí absorbance dokážeme nejenom odpovědět na otázku, jaká látka se ve vzorku nachází. Můžeme též určit, v jaké látkové koncentraci c se v něm nachází. Jestliže totiž světlo vlnové délky λ prochází látkou o molárním absorpčním koeficientu ε_λ a šířce absorpční vrstvy b , pak platí [36]

$$A = \varepsilon_\lambda bc. \quad (2)$$

Tento vztah nazýváme Lambertovým-Beerovým zákonem.

3.2 Fluorescenční spektroskopie

V některých případech potřebujeme určit složení vzorku, avšak není možné tak učinit pomocí absorpční spektroskopie. Může se tak stát kvůli příliš vysoké koncentraci. V takovém případě můžeme sáhnout po spektroskopii fluorescenční [37].

Pro tuto metodu je vzorek vybuzen světlem (v případě širokospektrálního excitačního zdroje používáme pro výběr vhodné vlnové délky excitujícího světla monochromátor či filtr, nebo volíme přímo spektrálně úzký zdroj světla, např. laser či LED) do excitovaného stavu. V tomto stavu však vzorek nemůže zůstat dlouho a vrací se do původního fluorescencí (či jinými cestami, které nás v tuto chvíli nezajímají). Podobně jako u absorpční spektroskopie pak i zde určíme složení vzorku podle vlnové délky světla, které je ale v tomto případě nikoli pohlcováno, nýbrž vyzářeno. Aby bylo možné vykreslit fluorescenční spektrum, prochází i emitované světlo emisním monochromátorem [38].

3.3 Časově rozlišená detekce fosforescence

V části 2.4.2 jsme popsali, jakými způsoby se PS v prvním excitovaném singletním stavu může zbavovat přebytečné energie. Pro každou z cest, které byly v části 2.4.2 popsány, ale i ty které ve zmiňované části zůstaly opominuté (a které zde pro pořádek alespoň vyjmenujeme), můžeme pomocí vztahu [15]

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

v němž R_i značí počet přechodů za jednotku času po dané cestě a N počet molekul, zavést rychlostní konstantu k_i .

Při snaze PS zbavit se přebytečné energie vzniká singletní kyslík. Ten následně zaniká procesy, jež také můžeme popsat pomocí konstant k_i .

Když máme zavedené rychlostní konstanty jednotlivých relaxačních procesů k_i , rádi bychom s jejich pomocí popsali časový vývoj koncentrace tripletního stavu PS (^3PS) ve vzorku, [^3PS], a časový vývoj koncentrace $^1\text{O}_2$ ve vzorku, [$^1\text{O}_2$]. Můžeme tak učinit s pomocí vztahů (4) a (5) [15]

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [^3\text{PS}] = & k_{\Delta T_1} [^1\text{O}_2] [^1\text{PS}] - \\ & (k_{T_1\Delta} [^3\text{O}_2] + k_{T_1 S_0} [^1\text{PS}] + k_{T_1 O_2} [^3\text{O}_2] + k_{T_1} + k_{T_1^*} + k_{T_1 Q} [Q] \\ & + k_{TT} [^3\text{PS}] + k_{SOSDF} [^1\text{O}_2]) [^3\text{PS}] \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [^1\text{O}_2] = & k_{T_1\Delta} [^3\text{PS}] [^3\text{O}_2] - \\ & (k_{\Delta T_1} [^1\text{PS}] + k_{\Delta S_0} [^1\text{PS}] + k_{\Delta O_2} [^3\text{O}_2] + k_{\Delta} + k_{\Delta^*} + k_{\Delta Q} [Q] \\ & + k_{SOFDF} [^3\text{PS}]) [^1\text{O}_2] \end{aligned} \quad (5)$$

Ve vztazích (4) a (5) přisuzujeme rychlostní konstanty těmto přechodům:

- $k_{T_1\Delta}$ nezářivé interakci ^3PS s $^3\text{O}_2$ za vzniku $^1\text{O}_2$
- $k_{T_1 S_0}$ nezářivé interakci ^3PS s PS
- $k_{T_1 O_2}$ nezářivé interakci ^3PS s $^3\text{O}_2$ bez vzniku $^1\text{O}_2$
- k_{T_1} nezářivé interakci ^3PS s rozpouštědlem
- $k_{T_1^*}$ fosforescenci
- $k_{T_1 Q}$ nezářivé interakci ^3PS se zhášečem Q
- k_{TT} interakci ^3PS s ^3PS za vzniku ^1PS a $^1\text{PS}^*$ (tzv. triplet-tripletní anihilace)
- k_{SOSDF} singletním kyslíkem senzitivované zpožděné fluorescenci
- $k_{\Delta T_1}$ nezářivé interakci $^1\text{O}_2$ s PS za vzniku ^3PS

- $k_{\Delta S_0}$ nezářivé interakci 1O_2 s PS
- $k_{\Delta O_2}$ nezářivé interakci 1O_2 s 3O_2
- k_{Δ} nezářivé interakci 1O_2 s rozpouštědlem
- k_{Δ^*} fosforescenci
- $k_{\Delta Q}$ nezářivé interakci 1O_2 se zhášecem Q

Singletním kyslíkem senzitivovanou zpožděnou fluorescenci nebudeme dále uvažovat.

Zanedbáme-li $k_{\Delta T_1}$, můžeme pro koncentraci 1O_2 uvažovat vztah [15]

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

$[{}^3PS]_0$ je koncentrace 3PS v ihned po excitaci, K_{T_1} je převrácená doba života 3PS a

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

je převrácená doba života 1O_2 . $[PS]$ zde označuje počáteční koncentraci PS, $[O_2]$ počáteční koncentraci kyslíku.

4 Materiály a příprava vzorků

Pro měření jsme připravili vzorek prázdných liposomů a vzorek VP v liposomech.

Při přípravě prázdných liposomů jsme nejprve 39,0 mg PC od firmy Avanti rozpustili ve 2 ml chloroformu p. a. od firmy Lachema. Pro vzorek VP v liposomech bylo rozpuštěno 1,5 mg VP od firmy Sigma a 38,7 mg PC ve 2 ml chloroformu. Číselné hodnoty byly volené tak, aby na 1 molekulu VP připadalo 50 molekul PC.

Dále se při přípravě obou vzorků postupovalo stejně.

Chloroform byl ze vzorků odpařen během 10 minut na rotační odparce při tlaku 300 mPa, teplotě lázně 40°C a frekvenci 200 otáček za minutu. Na stěnách baněk se vytvořil rovnoměrný film, ten byl dále 10 minut vyfoukáván dusíkem, aby se odpařily i poslední případné zbytky chloroformu. Filmy byly následně rozpuštěny ve 3 ml fosfátového pufru (PBS) od firmy Biosera.

Aby měly liposomy potřebnou jednotnou velikost, byly ohřáty nad teplotu fázového přechodu 75°C a 11x protlačeny přes membránu o velikosti pórů 100 nm pomocí extruderu od firmy Avanti (na obr. 12).

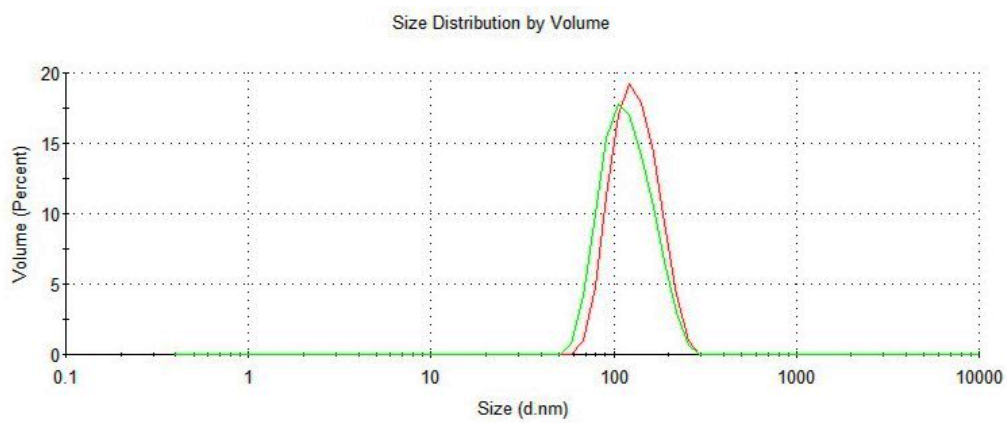
Takto vyrobené vzorky byly podrobeny měření na zeta-sizeru, aby se potvrdilo, že liposomy v nich mají požadovanou a jednotnou velikost, výsledky tohoto měření ukazuje obr. 13. U vzorku s čistými liposomy byla naměřena distribuce velikostí s jediným maximem kolem 134 nm. U vzorku s přidaným VP byla naměřena distribuce s jediným maximem okolo 120 nm.

Pro potřeby jednotlivých měření byly zásobní roztoky liposomů dále ředěny PBS či těžkou vodou od firmy Aldrich Chemistry, syceny dusíkem či kyslíkem.

Dále jsme připravili roztok z 18,7 mg NaN_3 , azidu sodného, od firmy Sigma a 288 ml PBS. Pro některá měření jsme 20 μl tohoto roztoku přilili do 2 ml roztoku VP v PC o koncentraci desetinné oproti zásobnímu roztoku.



Obr. 12: Extruder pro tvorbu liposomů požadované velikosti (převzato z [55])



Obr. 13: Výsledek měření na zeta-sizeru. Zelená barva odpovídá vzorku liposomů s VP, červená vzorku čistých liposomů

5 Experimentální uspořádání

5.1 Absorpční spektrometr

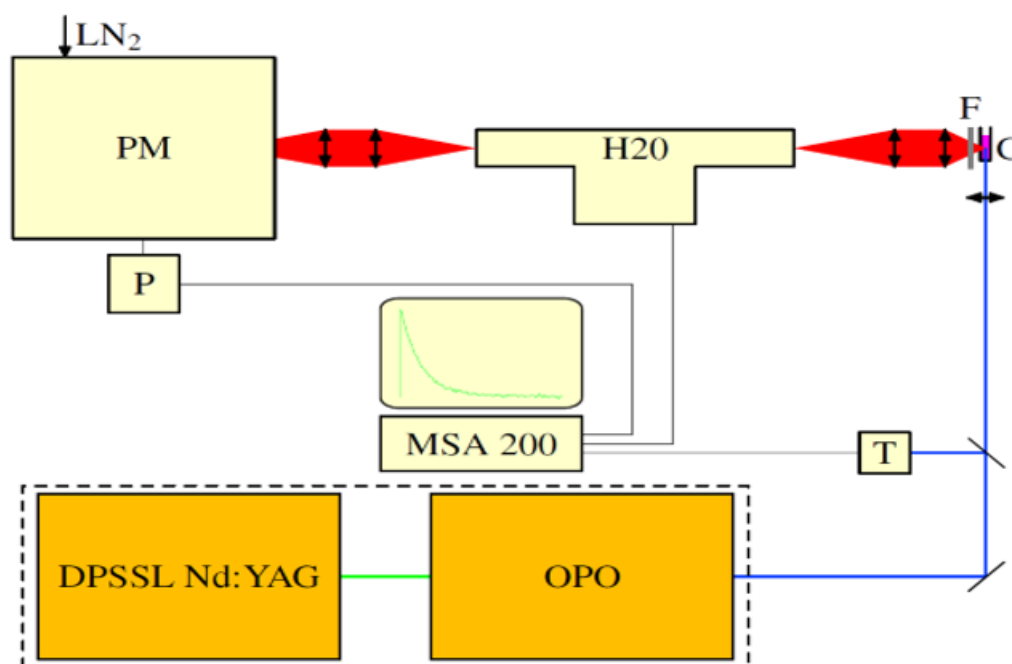
Absorpční spektra byla měřena na dvoupráskovém absorpčním spektrometru Specord 250 od firmy Analytik Jena.

5.2 Fluorescenční spektrometr

Fluorescenční spektra byla měřena vláknovým spektrometrem AvaSpec-2048 vyrobeným firmou Avantes. Vzorek byl pro měření excitován modrým polovodičovým laserem s vlnovou délkou 405 nm RLDE405M-20-5 firmy Roithner Lasertechnik GmbH.

5.3 Detekce infračervené luminiscence

Infračervená luminiscence byla naměřena pomocí uspořádání, jež je schematicky znázorněné na obr. 14.



Obr. 14: Uspořádání pro měření infračervené luminiscence singletního kyslíku (převzato z [56])

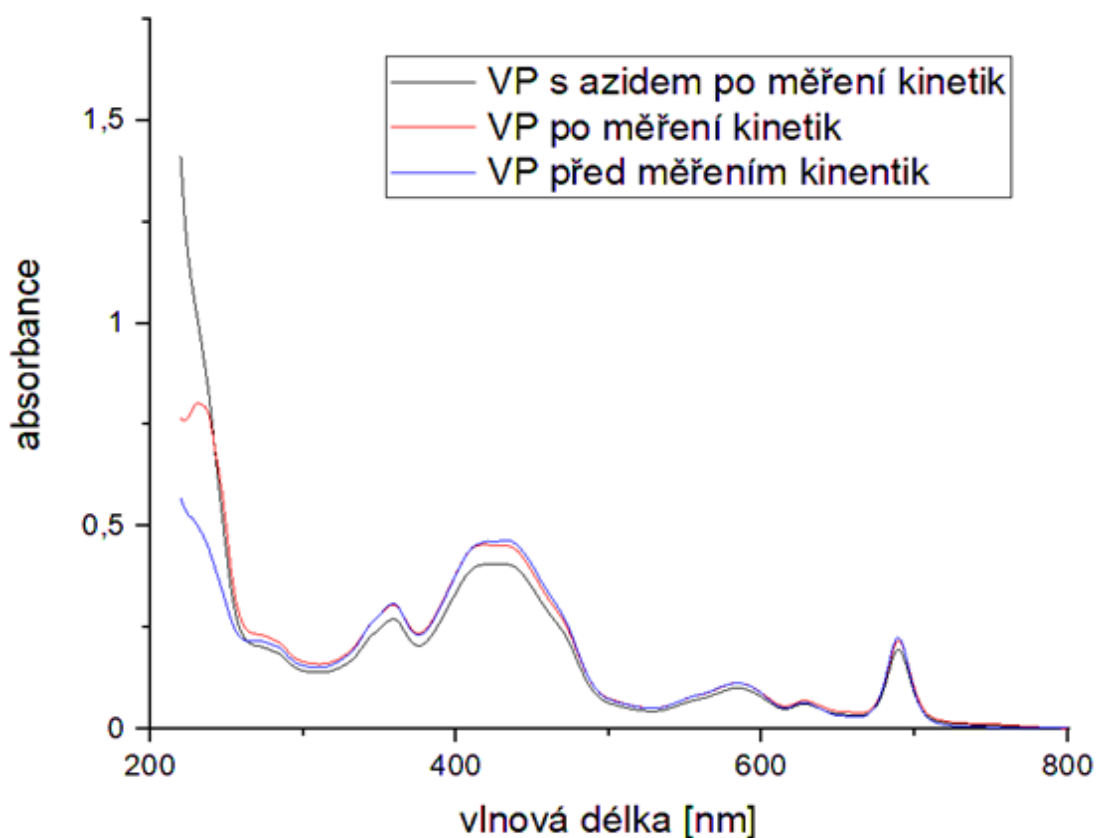
Přerušovanou čarou ohraničené části na obr. 14 představují laser EKSPLA NT242, který je složen z pulzního diodami čerpaného pevnolátkového Nd:YAG laseru (DPSSL) s Q-switchem a optického parametrického oscilátoru pro změnu výstupní vlnové délky laserového záření. Pro měření byl tento laser nastaven na vlnovou délku 433 nm a energii pulzu zhruba 5 μ J.

Paprsek z laseru pokračuje na spouštěcí diodu T a kyvetu C se vzorkem, který excituje. Vzorek tak začne luminiskovat a jeho záření se následně přes F – dva dlouhovlnné filtry Schott RG7 – a vysoce světelný monochromátor Jobin Yvon H20IR – H20, který byl pro potřeby měření nastaven na 1274 nm, dostává do PM fotonásobiče Hamamatsu R5509 citlivého do 1400 nm. Pulzy z fotonásobiče jsou po zesílení předzesilovačem P detekovány časově rozlišeným čítačem Becker&Hickl MSA200.

6 Výsledky měření a diskuze

6.1 Absorpční spektra

Aby bylo možné zhodnotit vybělování a tvorbu fotoproduktu ve vzorcích s VP během měření kinetik luminiscence, změřili jsme před měřením kinetik i po něm absorpční spektra. Tato spektra jsme měřili na vzorcích, jejichž koncentrace byla desetinová oproti koncentraci zásobních roztoků. Důvodem tohoto nařazení byla potřeba dostatečné průsvitnosti vzorků. Výjimku tvořilo měření absorpčního spektra vzorku s VP před měřením kinetik a vzorku čistých liposomů, kdy použitá koncentrace byla poloviční oproti zásobnímu roztoku. S ohledem na snazší interpretaci výsledků měření byly naměřené hodnoty přepočítány (pomocí vztahu (2)) na koncentraci shodnou s ostatními měřeními.



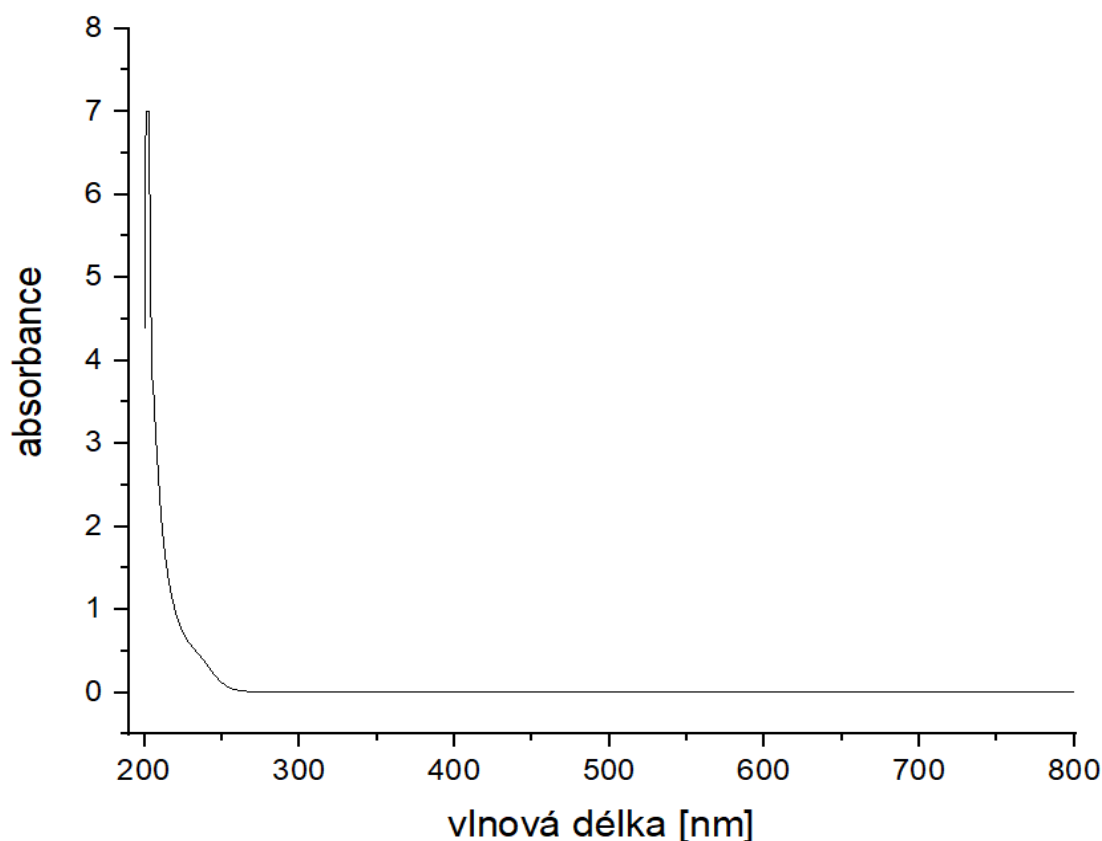
Obr. 15: Absorpční spektrum vzorku s VP v PBS před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v PBS s azidem po měření kinetik luminiscence

Obr. 15 ukazuje porovnání absorbance vzorku s VP v PBS před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP s azidem v PBS po měření kinetik luminiscence. Jak můžeme vidět, jednotlivá spektra se od sebe liší jen drobně. Největší rozdíly jsou, že ve vzorku VP po měření kinetik se objevil pás na 238 nm a pás mezi 415 nm a

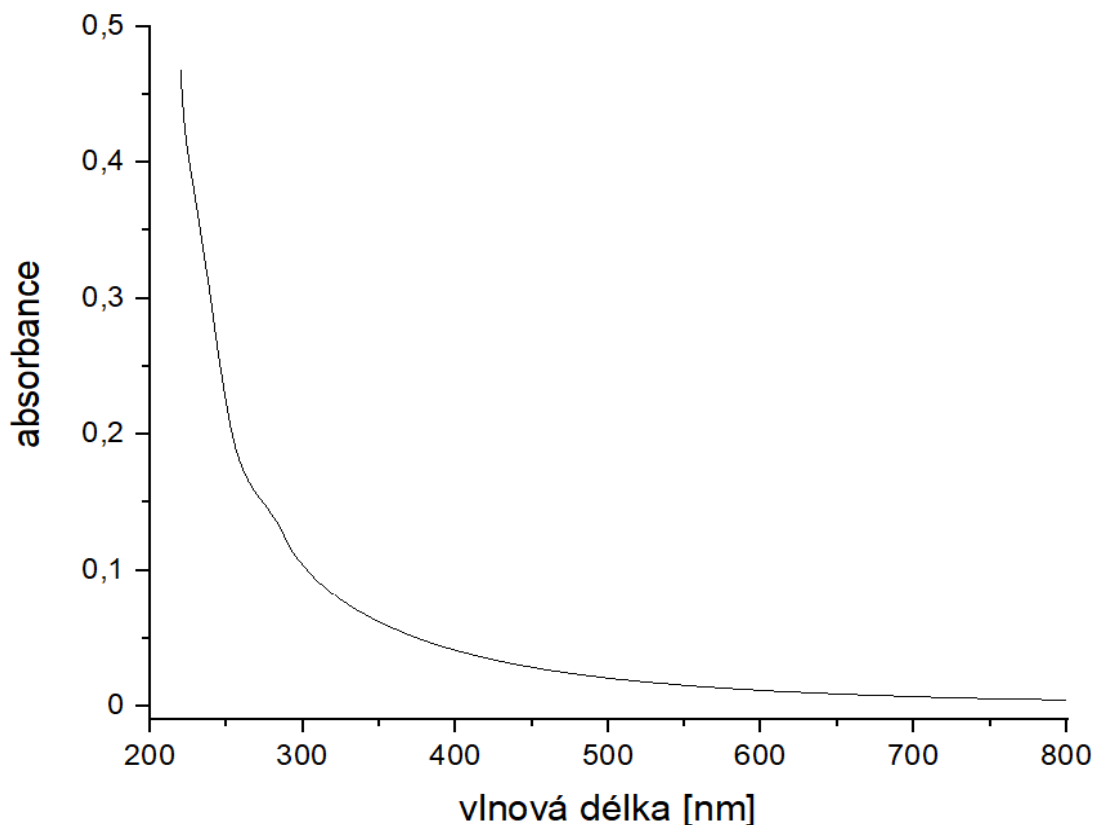
435 nm mírně klesá, na rozdíl od vzorku před měřením kinetik, kde byl konstantní. U vzorku s azidem je absorbance v pásu mezi 415 nm a 435 nm konstantní. Důvodem může být výrazně nižší počet měření kinetik, kterému byl daný vzorek podroben. U azidového vzorku také pozorujeme odchylku od ostatních vzorků v chování ve vlnových délkách od 200 nm do 238 nm. Tato odchylka je ovšem očekávaná vzhledem k naměřenému spektru čistého NaN_3 , které je vyneseno na obr. 16. Absorpční spektrum azidového vzorku je celkově mírně slabší než ostatní spektra, což může být způsobené chybou při míchání vzorku.

S ohledem na to, že měříme VP v liposomech, nikoli čistý VP, bylo naměřeno také absorpční spektrum prázdných liposomů v PBS, abychom věděli, nakolik liposomy ovlivňují výsledky znázorněné na obr. 15. Z obr. 17, kde je toto spektrum vyneseno lze usuzovat, že by liposomy do absorpčního spektra VP v liposomech měli promlouvat především v oblasti od 200 nm do 300 nm. Tato úvaha je v souladu s tím, že v oblastech nad 300 nm se naše naměřená spektra shodují s udávaným tvarem absorpčního spektra verteporfinu (obr. 11).

Podobné srovnání jako na obr. 15 můžeme vidět i na obr 18 s tím rozdílem, že obr. 18 ukazuje absorpční spektra pro vzorky naředěné D_2O . Spektra VP před měřením



Obr. 16: Absorpční spektrum NaN_3



Obr. 17: Absorpční spektrum prázdných liposomů v PBS

kinetik a po něm se shodují lépe než v předchozím případě, největší rozdíly můžeme opět pozorovat v okolí vlnových délek 238 nm a 440 nm (u níž dochází ke snížení na 96 %). Spektrum vzorku s NaN_3 (měřené až po kinetikách) dobře kopíruje spektrum vzorku VP před měřením kinetik.

Absorpční spektrum vzorku prázdných liposomů naředěného D_2O , znázorněné na obr. 19, nevykazuje oproti vzorku liposomů v PBS výrazné rozdíly.

Drobné rozdíly ve tvarech absorpčních spekter, které jsou zmiňovány v předchozích odstavcích, ukazují na tvorbu fotoproduktu při expozici, a to i v přítomnosti NaN_3 , který zhasí $^1\text{O}_2$. To naznačuje, že tvorba fotoproduktu bude probíhat jiným mechanismem než reakcí VP s $^1\text{O}_2$.

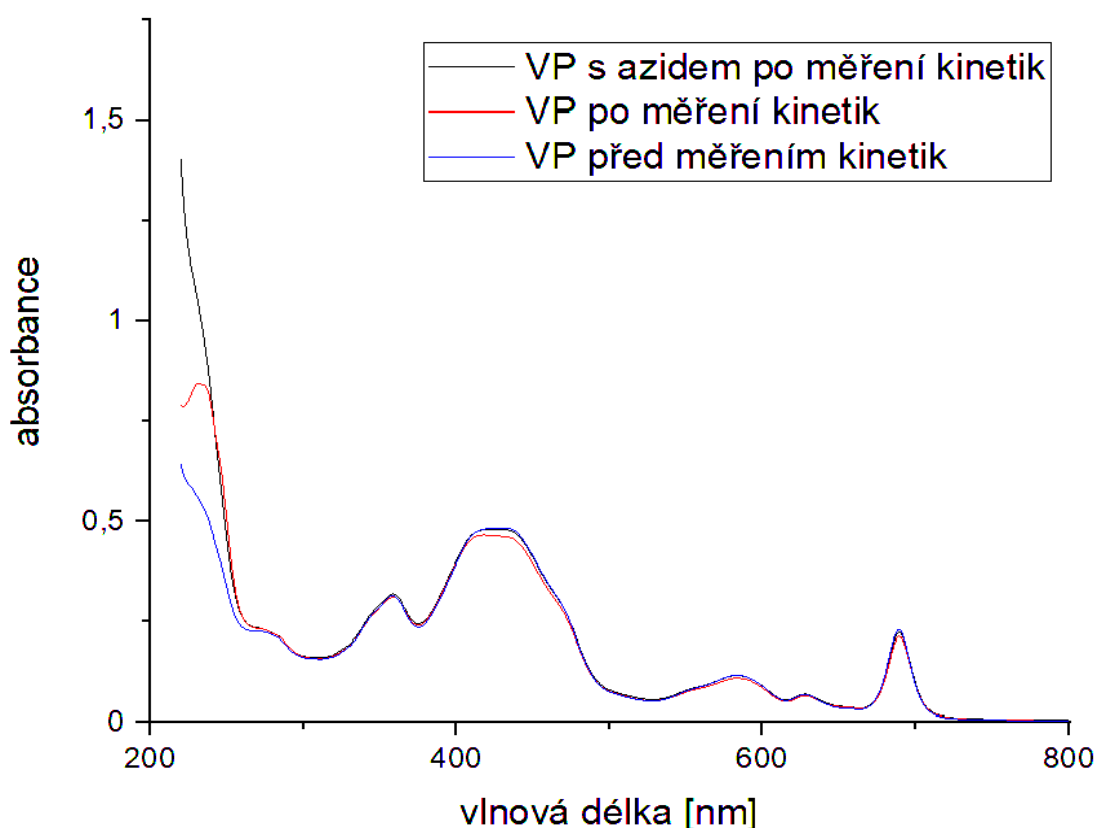
Dle [39] byl v 10% roztocích fetálního telecího séra (a žádných jiných zkoumaných) při ozařování VP pozorován pokles absorpčních pásů na 400 nm až 450 nm a 688 nm. Dále se objevily nové pásy na 320 nm a 688 nm. Fotoprodukt nebyl s jistotou identifikován, získané výsledky ale dle autorů [39] ukazují, že by se mohlo jednat o formylový fotoprodukt (vznikající reakcí volných radikálů). Ten se ovšem nedá odlišit od hydroxyaldehydového fotoproduktu (vznikajícího cykloadicí $^1\text{O}_2$).

V [40] nebyla naopak tvorba fotoproduktu pozorována v žádném ze zkoumaných rozpouštědel. Jako důvod rozdílů ve spektrech uvádí autoři vybělování (tj. PS v důsledku sebedestrukce po osvětlení ztrácí schopnost absorpce [21]).

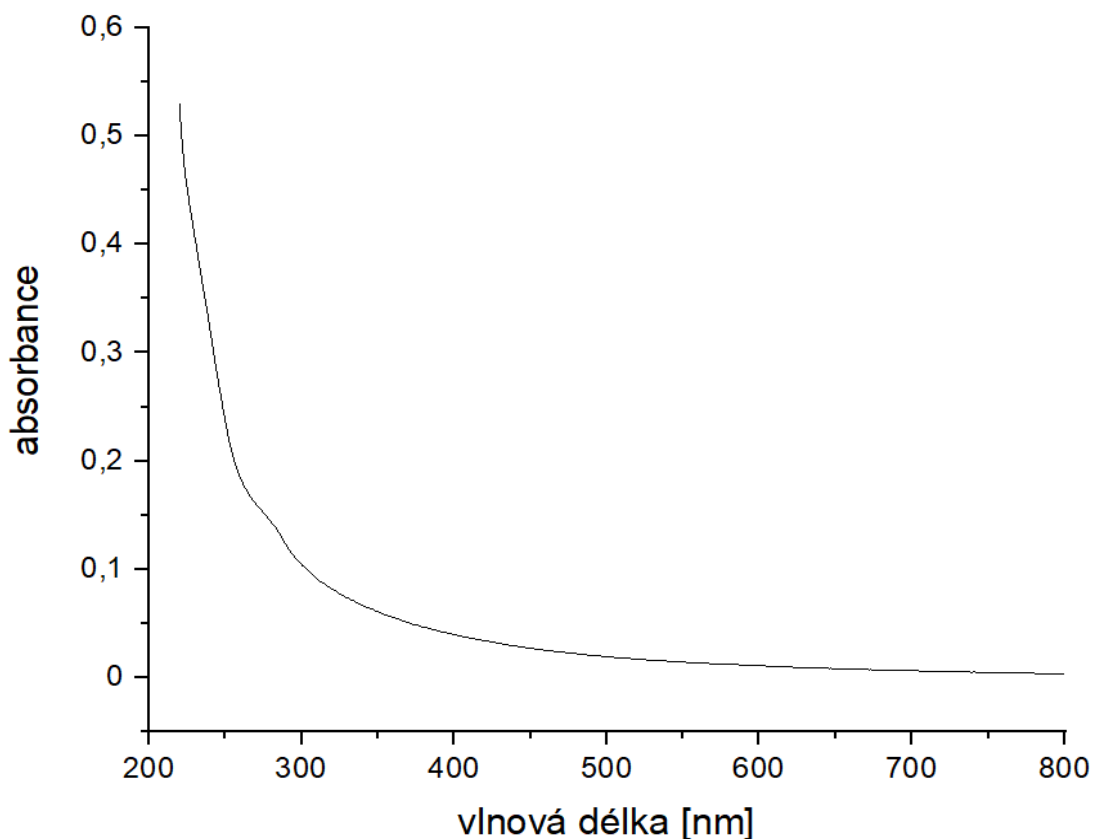
Při srovnání zde naměřených absorpčních spekter s obr. 11 v [1], který ukazuje absorpční spektra VP v dimethylformamidu (DMF), lze konstatovat, že spektra vypa-
dají kvalitativně stejně, většina pásů se nachází na stejných vlnových délkách, pouze pásy na 554 nm a 583 nm jsou pro VP v liposomech posunuty o zhruba 5 nm do čer-
vena oproti VP v DMF. Malé rozdíly lze pozorovat i u nejsilnějšího pásu. Ten se
v DMF skládá nejméně ze dvou, na 436 nm je trochu vyšší než na 414 nm a navíc
přibyl křídlo na červené straně dlouhovlnnějšího pásu.

Ze skutečnosti, že získaná spektra mají stejný tvar jako spektra změřená v orga-
nickém rozpouštědle, lze usuzovat, že VP je v liposomech v neagregované, mono-
merní formě. Podobný výsledek je publikován v [41].

Získaná spektra se též tvarem shodují se spektrem Visudynu publikovaným v [42].



Obr. 18: Absorpční spektrum vzorku s VP v D₂O před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v D₂O s azidem po měření kinetik luminiscence



Obr. 19: Absorpční spektrum prázdných liposomů v D₂O

6.2 Fluorescenční spektra

Dalším způsobem, kterým jsme ověřovali, že v průběhu měření kinetik luminescence nedochází k degradaci vzorků, je měření fluorescenčních spekter. Stejně jako při měření spekter absorpčních nás zajímá, zda a o kolik se liší spektrum před měřením kinetik a po něm.

Fluorescenční spektra VP v liposomech před měřením kinetik a po něm a s azidem v PBS, vynesena na obr. 20, byla měřena při poloviční koncentraci ve srovnání se zásobním roztokem. Tatož spektra v D₂O, vynesena na obr. 21, měla koncentraci desetinou oproti zásobnímu roztoku.

Na obr. 20 můžeme pozorovat, že pro vzorky ředěné PBS hlavní maximum před měřením kinetik a po něm zůstává na stejné vlnové délce, tj. 694 nm, pás se ovšem sníží zhruba na 80 %. Křídlo se mírně posouvá ze 769 nm na 764 nm, ale nesnižuje se. I v azidovém vzorku zůstává hlavní maximum na 694 nm. V obou vzorcích po měření kinetik se objevuje nový pás v okolí vlnové délky 655 nm, pro azidový vzorek je tento efekt slabší než pro vzorek bez azidu.

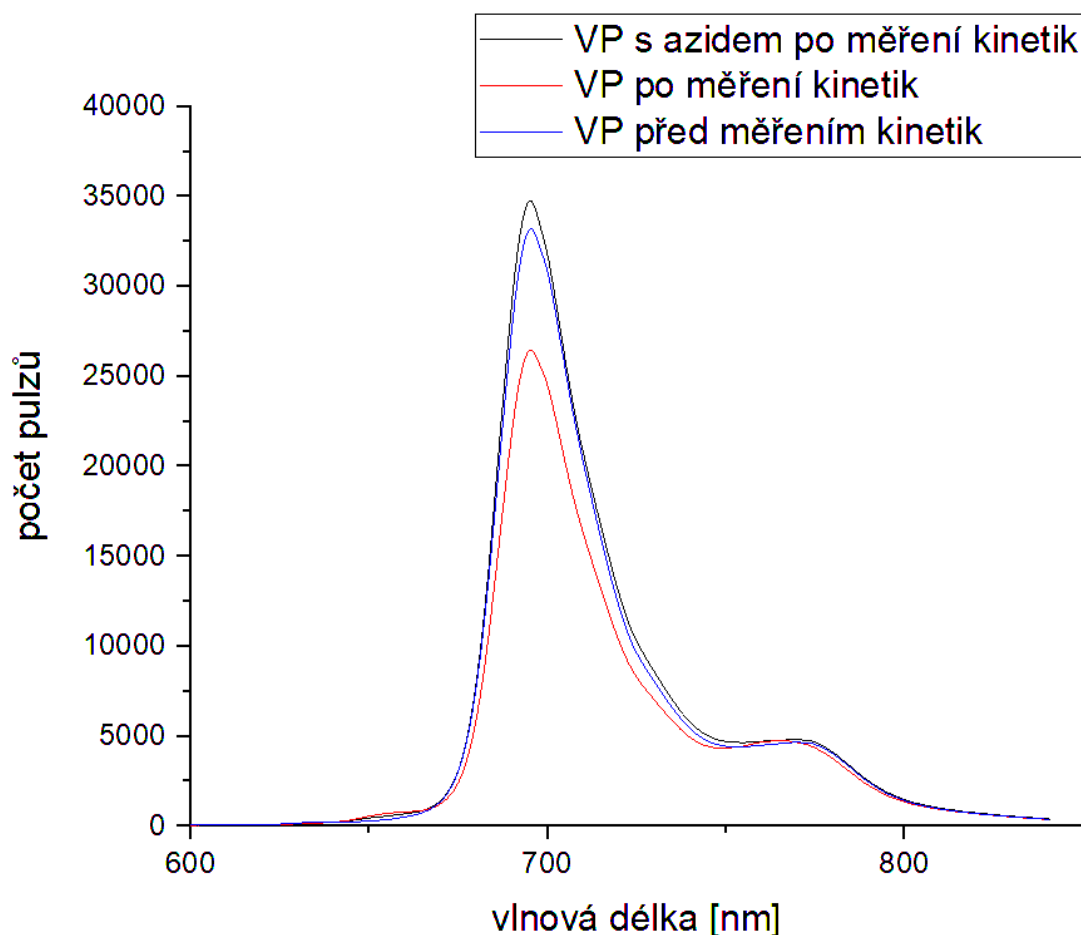
Výsledky pro vzorky ředěné D₂O na obr. 21 se od předchozích příliš neliší. Hlavní maximum na 694 nm se po měření kinetik snížilo na zhruba 77 %, křídlo se posunulo

ze 769 nm na 765 nm a snížilo se na 89 %. I zde pozorujeme nový pás okolo 655 nm, tento efekt je navíc silnější než v případě PBS.

Pro lepší představu, jak se spektra změnila, jsme je rozdělili do 4 až 5 pásů (tak, jak je to znázorněné na obr. 22) a zkoumali změnu těchto pásů, konkrétně pozice jejich maxim a šířky. Výsledky těchto rozkladů shrnují tabulka 1 (pro vzorky v PBS) a tabulka 2 (pro vzorky v D₂O).

Nyní můžeme pro vzorek v PBS konstatovat, že hlavní pás se skládá ze dvou, jejichž maxima na 693 nm a 703 nm se v podstatě neposouvají ani nemění šířku. Totéž lze tvrdit pro křídlo s maximy na 731 nm a 764 nm. V obou vzorcích po měření kinetik se skutečně objevuje nový pás: u vlnové délky 663 nm se šířkou 30 nm v bezazidovém vzorku, u azidového vzorku na 675 nm se šířkou 45 nm. U azidového je tento efekt slabší než pro vzorek bez azidu, což zvyšuje chybu určení polohy maxima (ta je u azidového vzorku 8 nm, zatímco u bezazidového pouze 2 nm).

U vzorku v D₂O se poloha pásů tvořících hlavní pás a křídlo od výsledků v PBS neliší. Opět zde pozorujeme nový pás: na 660 nm (s chybou určení 0,6 nm) se šířkou



Obr. 20: Fluorescenční spektrum vzorku s VP v PBS před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v PBS s azidem po měření kinetik luminiscence

26 nm u vzorku bez azidu a na 666 nm (s chybou určení 3 nm) se šířkou 38 nm ve vzorku s azidem.

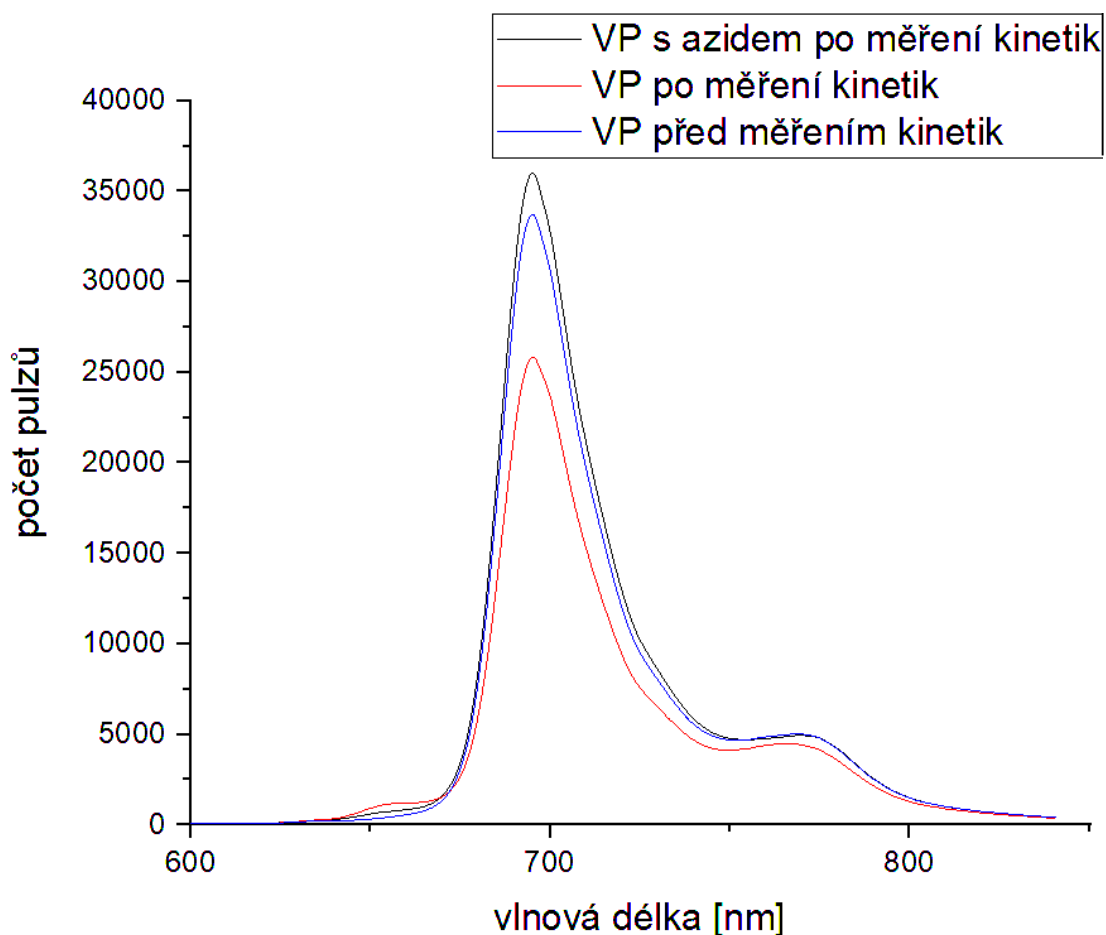
Není-li uvedeno jinak, chyba určení polohy maxim nepřesahuje 0,5 nm.

V souladu s absorpčními spektry ukazují tedy i spektra fluorescenční objevením nového pásu na vznik fotoproduktu. U azidového vzorku je tento efekt slabší, což má stejnou příčinu jako u absorpčních spekter: tento vzorek byl vystaven menšímu počtu měření, tj. nižší expozici. Pás fotoproduktu je v rámci chyb na stejné vlnové délce v PBS i D₂O, ale ve vzorcích s azidem je systematicky posunut k delším vlnovým délkám.

Fluorescenční pás okolo 650 nm byl pozorován při ozařování VP v 10% roztocích fetálního telecího séra a buňkách lidského karcinomu močového měchýře [39].

Fotoprodukt s maximem fluorescenčního spektra u 660 nm byl pozorován i v in vitro buněčné kultuře MAT-LyLu buněk [43]. V anoxickém prostředí klesla rychlost tvorby fotoproduktu přinejmenším 17x.

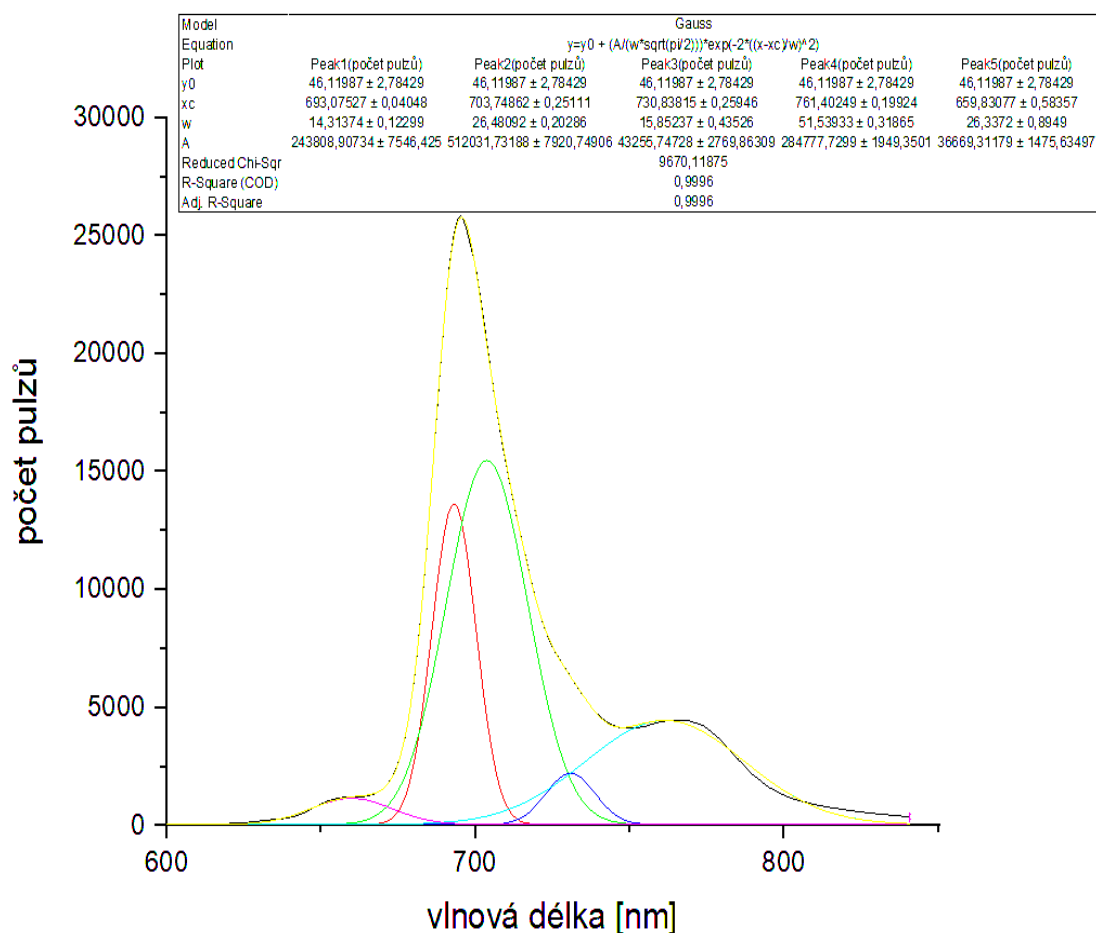
Srovnáme-li získaná spektra s fluorescenčními spektry VP v DMF (obr. 13 v [1]), zjistíme, že ani zde se tvarově a polohou pásů od sebe neliší.



Obr. 21: Fluorescenční spektrum vzorku s VP v D₂O před měřením kinetik luminescence a po něm a vzorku VP v D₂O s azidem po měření kinetik luminescence

Pozice maxima před měřením kinetik [nm]	X	693	703	731	764
Šířka pásu před měřením kinetik [nm]	X	14	27	18	50
Pozice maxima po měření kinetik [nm]	663	693	702	731	761
Šířka pásu po měření kinetik [nm]	30	15	27	15	52
Pozice maxima po měření kinetik s azidem [nm]	675	693	705	731	762
Šířka pásu po měření kinetik s azidem [nm]	45	15	26	17	52
Závěr	Mění se	Nemění se	Nemění se	Nemění se	Nemění se

Tabulka 1: Pásky ve fluorescenčních spektrech vzorků ředěných PBS



Obr. 22: Příklad rozložení fluorescenčního spektra na pásy, zde konkrétně pro vzorek VP v liposomech ředěný D₂O po měření kinetik luminiscence

Pozice maxima před měřením kinetik [nm]	X	693	703	731	763
Šířka pásu před měřením kinetik [nm]	X	14	27	17	50
Pozice maxima po měření kinetik [nm]	660	693	704	731	761
Šířka pásu po měření kinetik [nm]	26	14	26	16	52
Pozice maxima po měření kinetik s azidem [nm]	666	693	704	731	763
Šířka pásu po měření kinetik s azidem [nm]	38	15	26	18	51
Závěr	Mění se	Nemění se	Nemění se	Nemění se	Nemění se

Tabulka 2: Pásky ve fluorescenčních spektrech vzorků ředěných D₂O

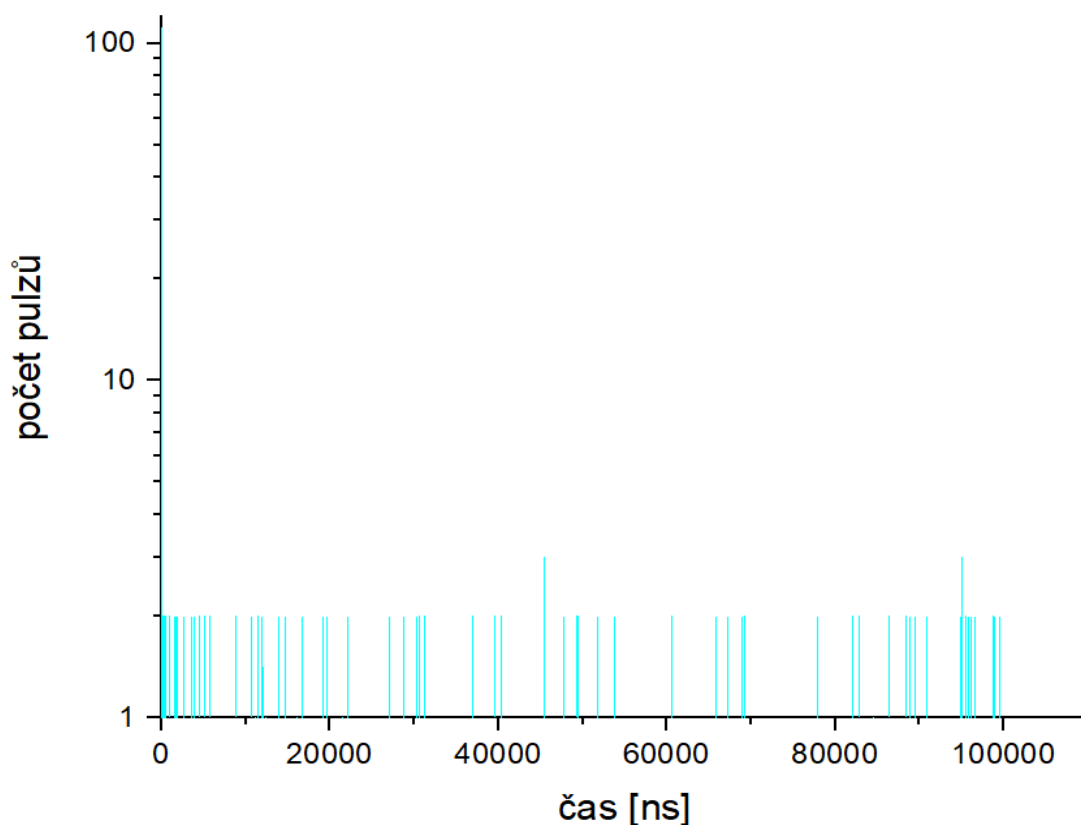
6.3 Kinetika infračervené luminiscence

Všechna měření kinetik luminiscence proběhla na vzorcích, jejichž koncentrace byla desetinová oproti zásobnímu roztoku. Kinetiky luminiscence jsou měřeny pro vlnovou délku 1274 nm, což je dle výsledků měření v [1] maximum emise $^1\text{O}_2$.

Konstanta pozadí a měla pro všechna měření stejnou pevnou hodnotu 0,14.

6.3.1 Měření v PBS

První měření, která jsme provedli, byla měření na vzorcích prázdných liposomů, aby se vyjasnilo, zda samotné lipidy tvořící liposomy neprodukují při osvětlení signál, který by zkresloval měření získaná na liposomech s VP. Příklad této kinetiky je uveden na obr. 23. Porovnáme-li tuto kinetiku s příkladem detailu kinetiky vzorku liposomál-



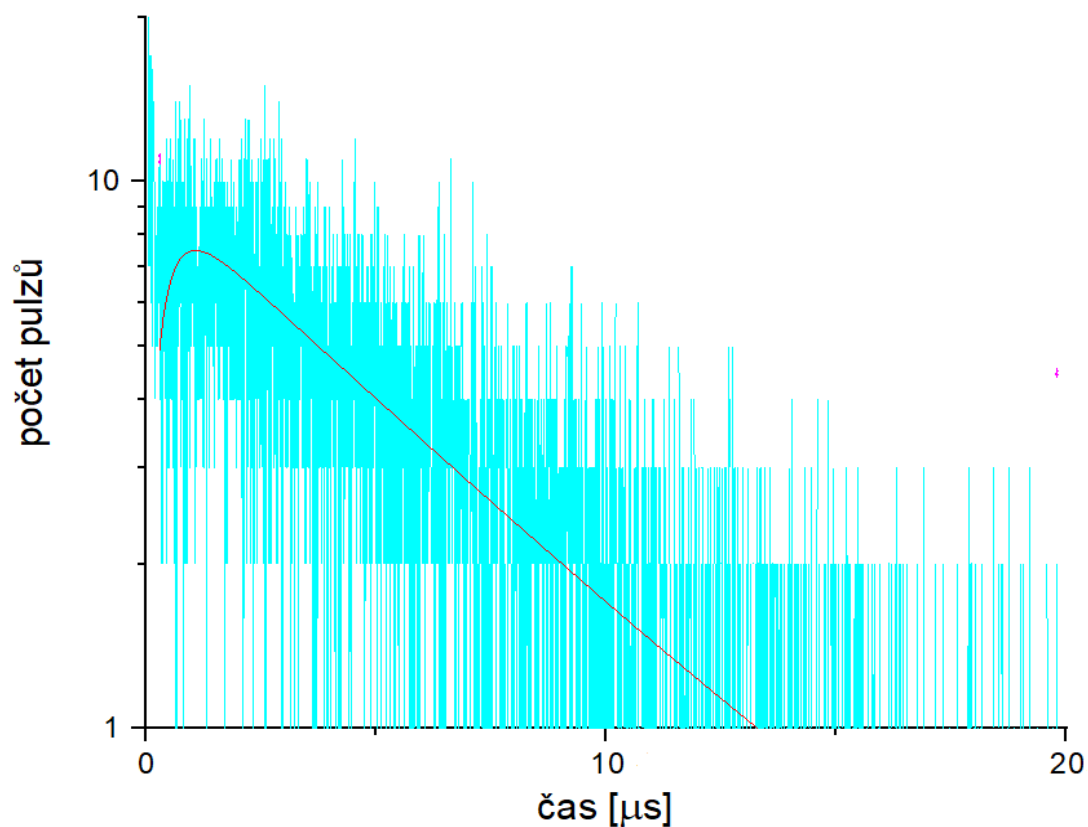
Obr. 23: Kinetika luminiscence na vzorku prázdných liposomů ředěných v PBS

ního VP vynesným na obr. 24, ukazuje se, že signál způsobený liposomy je velmi slabý. Nebudeme jej tedy dál uvažovat.

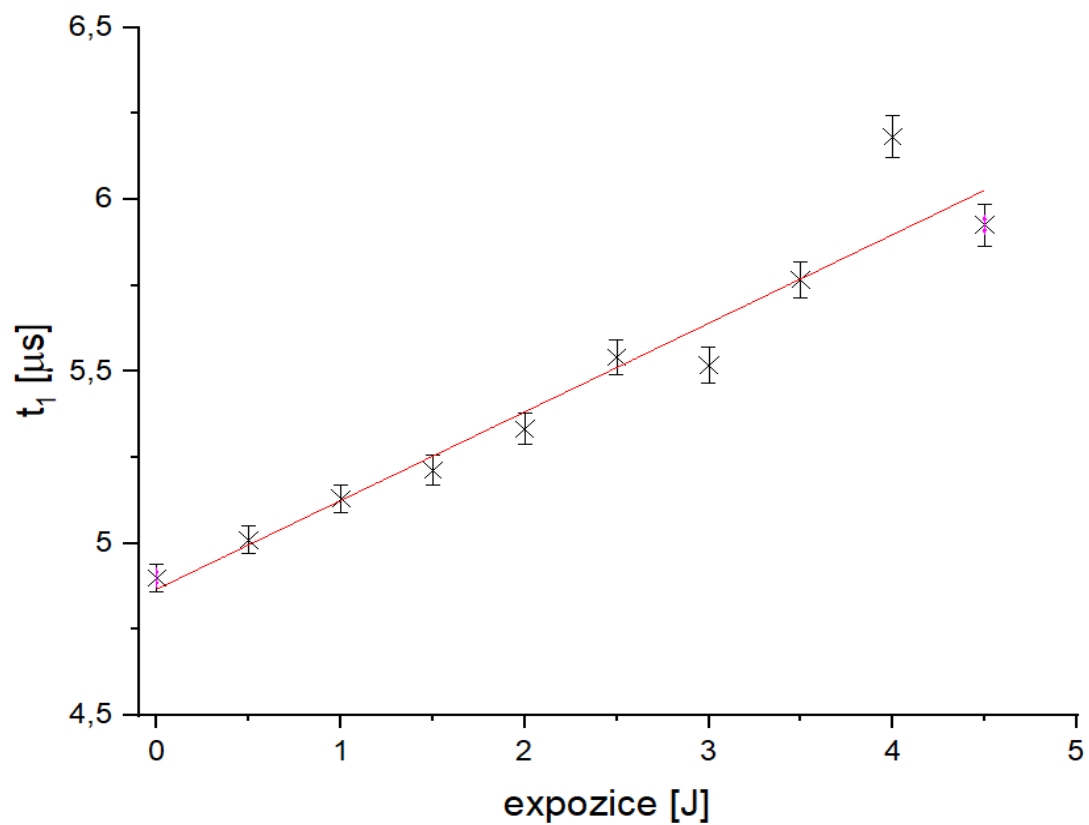
Kinetiky luminiscence $^1\text{O}_2$ na vzorcích liposomálního VP byly, tak jak je též vidět na obr. 24, fitovány funkcí, která je variantou vztahu (6):

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

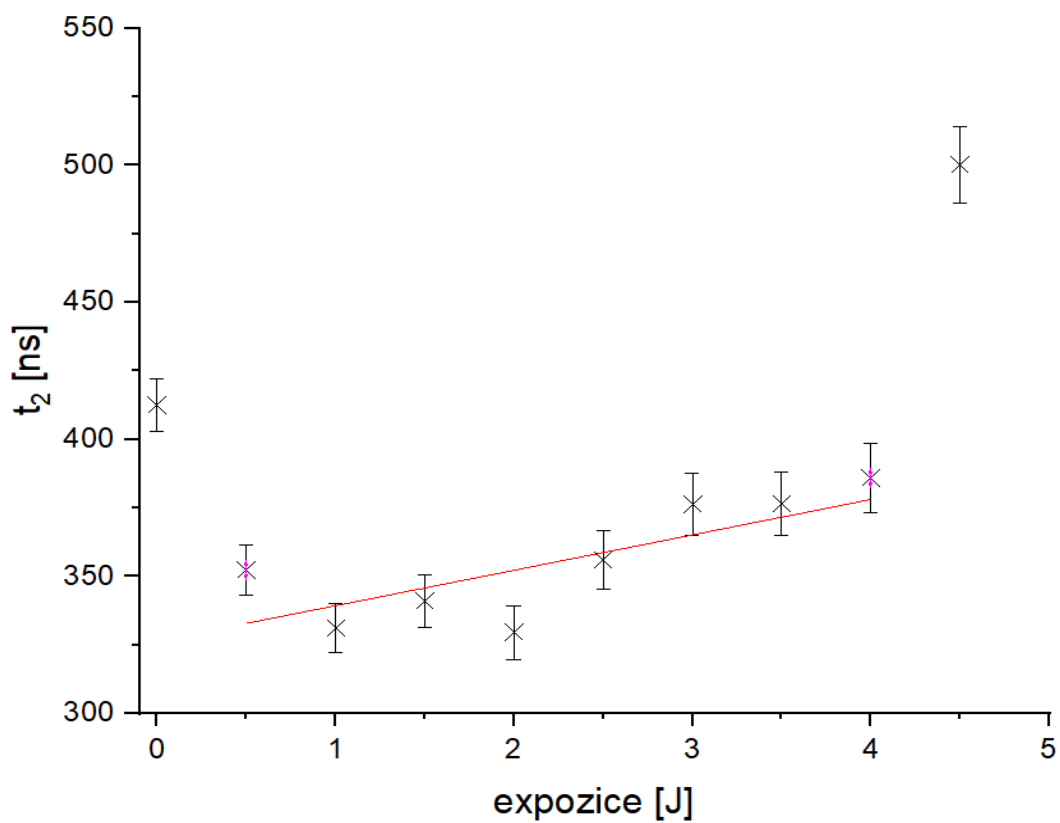
kde b je amplituda, t_1 je doba poklesu a t_2 doba nárůstu VP a a konstanta pozadí. Tento tvar kinetik neodpovídá tvaru kinetik pozorovaných v [44], kde byly dva nárůsty.



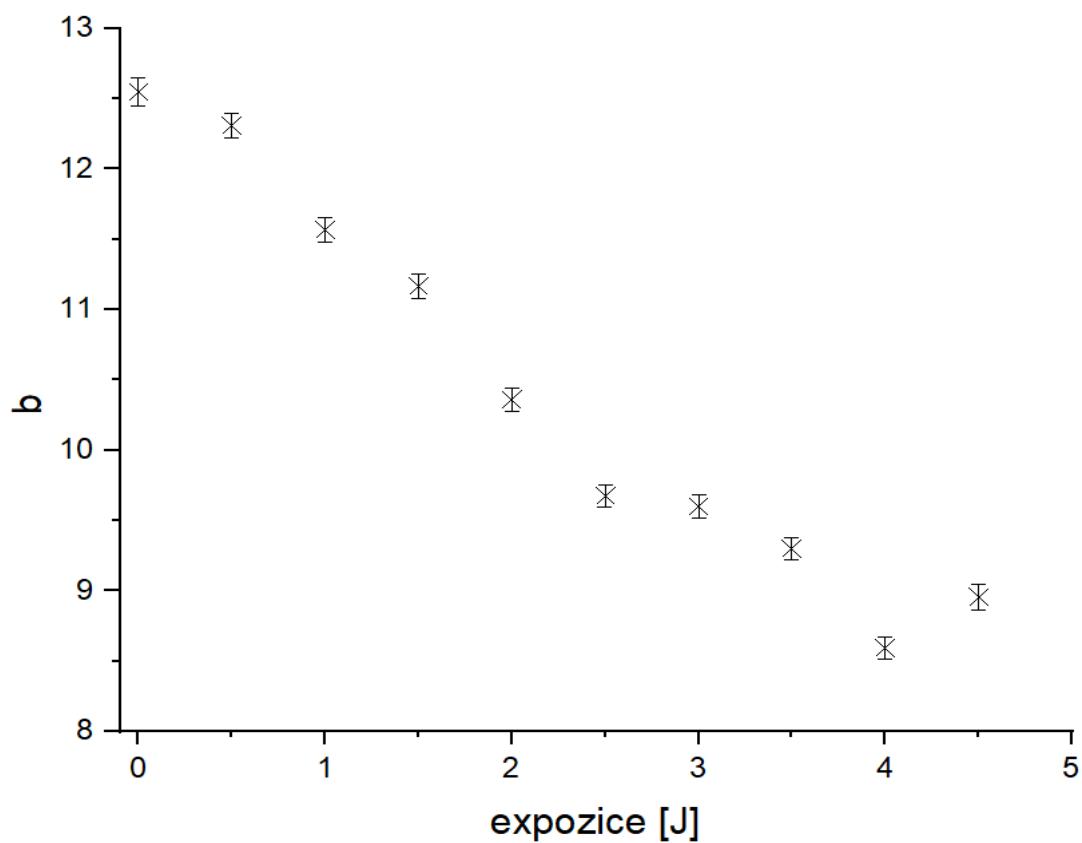
Obr. 24: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS



Obr. 25: Závislost doby t_1 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS



Obr. 26: Závislost doby t_2 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS

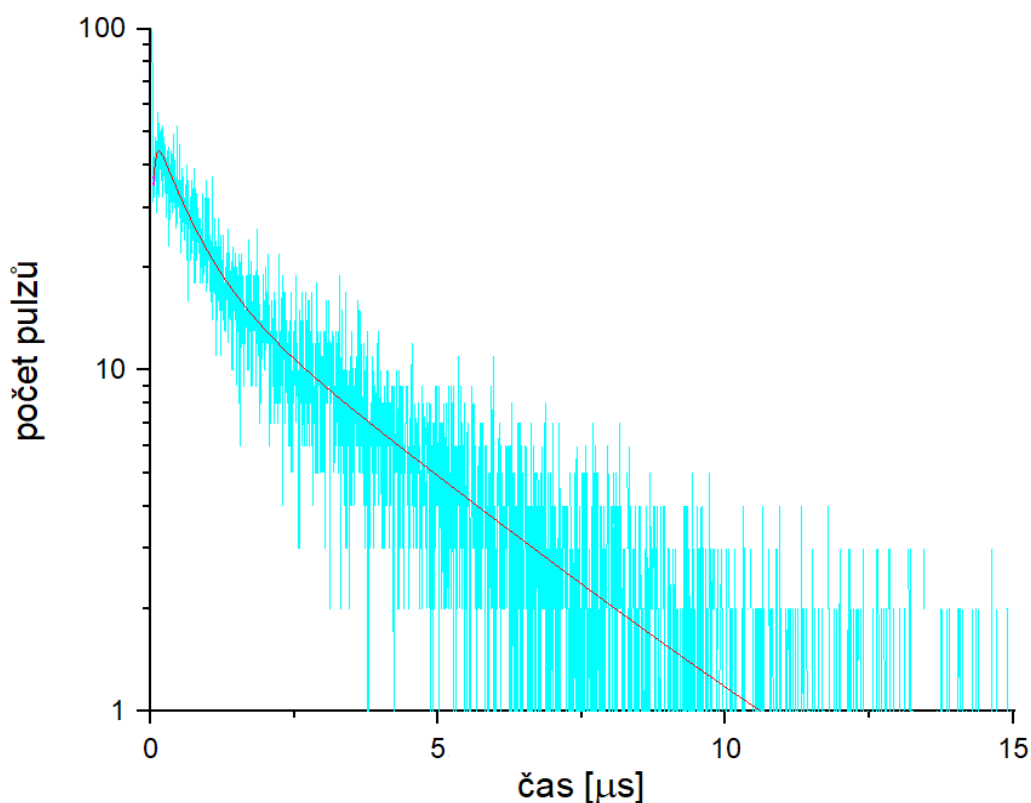


Obr. 27: Závislost amplitudy na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS

V průběhu měření se ukázalo, že parametry b , t_1 a t_2 se mění s expozicí. Obr. 25, 26 a 27 tuto závislost zobrazují.

Na obr. 25 pozorujeme, že doby t_1 narůstají v závislosti na expozici zhruba od $4,8 \mu\text{s}$ do $6,0 \mu\text{s}$. Po lineární extrapolaci k nulové expozici získáme dobu poklesu $(4,87 \pm 0,05) \mu\text{s}$. Tato hodnota zde představuje dobu života $^1\text{O}_2$ a vychází delší než ve vodě, kde je $3,7 \mu\text{s}$ [45]. Důvodem nárůstu je skutečnost, že $^1\text{O}_2$ se zháší pomaleji než v čerstvém vzorku. Podobné pozorování bylo provedeno i v [1], kde doby života $^1\text{O}_2$ také rostou, jen méně výrazně – od $18,4 \mu\text{s}$ do $18,75 \mu\text{s}$.

Na obr. 26 znázorňujícím závislost doby t_2 na expozici není na první pohled patrný monotónní nárůst nebo pokles. Pokud bychom ovšem odhlédli od prvního a posledního měření, mohli bychom zbylé hodnoty považovat za pomalu rostoucí od 320 ns do 380 ns . Doba t_2 zde značí dobu života VP, důvodem jejího nárůstu s expozicí tak mohou být změny na VP, v absorpčních a fluorescenčních spektrech však byla pozorována jen malá změna. Lineární extrapolace k nulové expozici pak dává čas $(326 \pm 11) \text{ ns}$. Podobné chování jsme opět pozorovali v [1], kde doby nárůstu rostly od 270 ns k 290 ns .



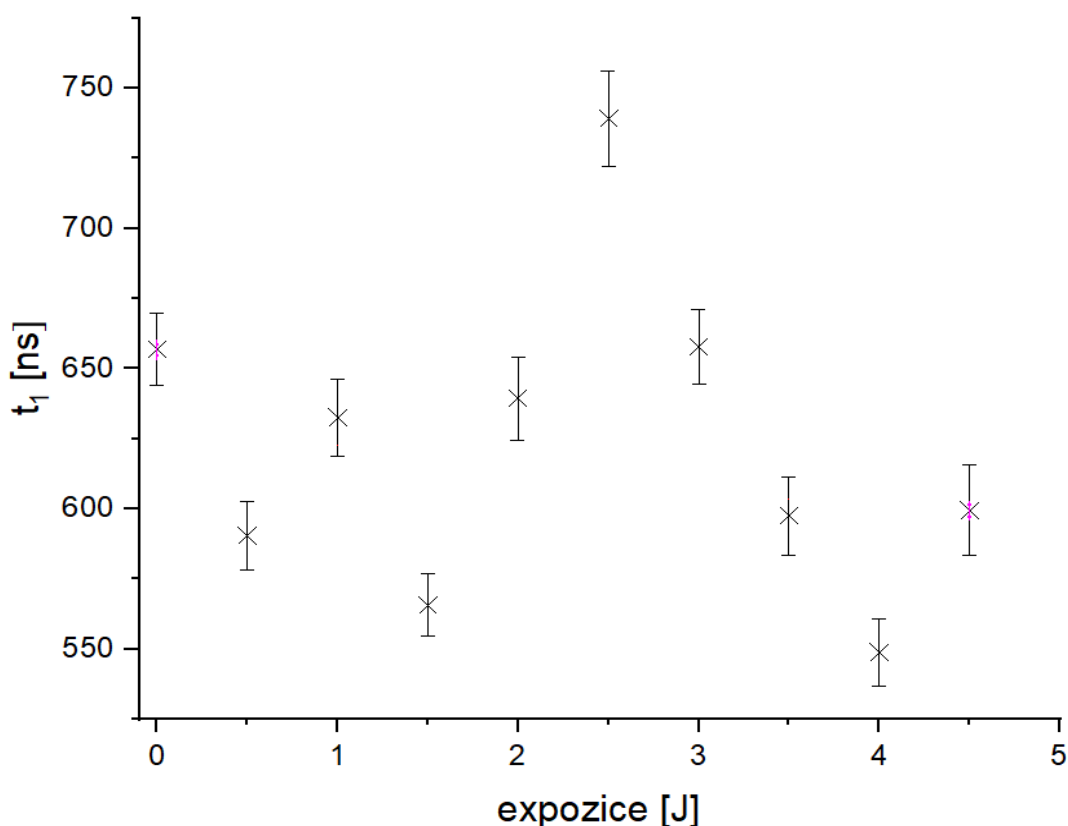
Obr. 28: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem

Amplituda s expozicí lineárně klesá od 12,5 do 8,5, tj. asi na 2/3 původní hodnoty, jak je zřejmé z obr. 27. Změna absorbance na příslušné vlnové délce je ale malá, foto-produkt tedy nejspíše generuje méně singletního kyslíku než čerstvý VP.

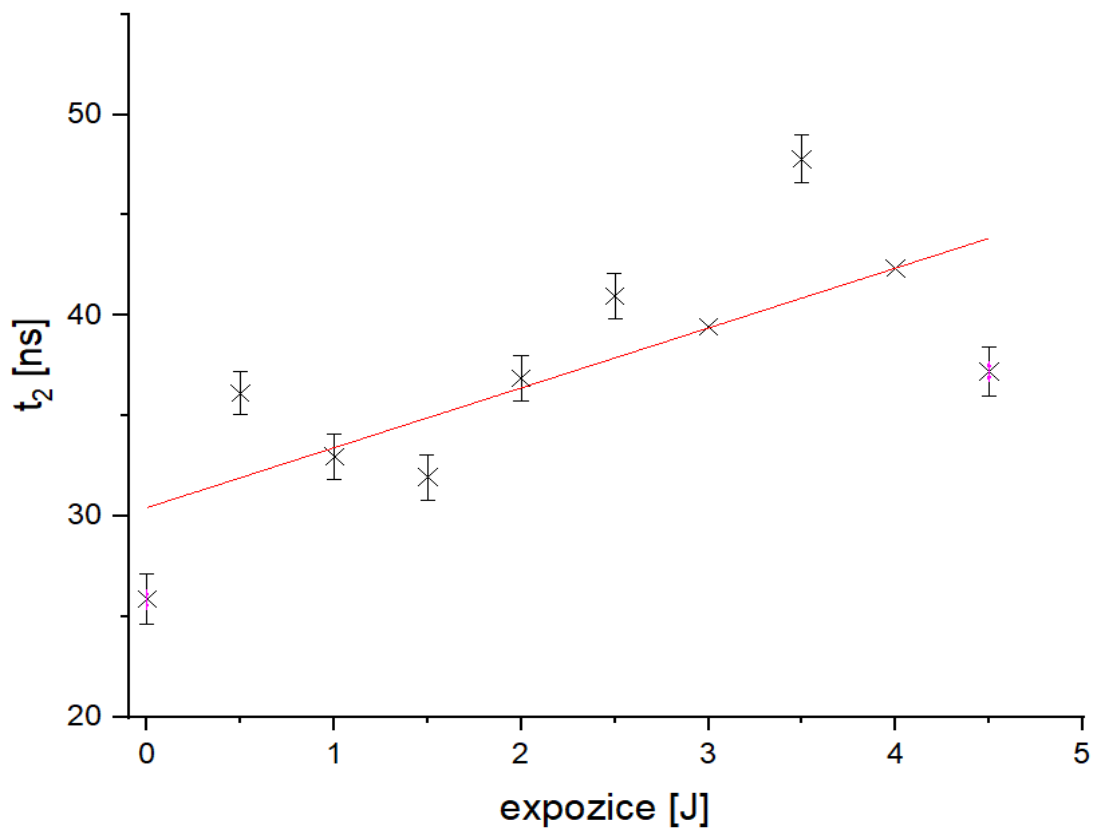
Dále byl vzorek liposomálního VP nasycen kyslíkem a byly na něm opět opakovaně měřeny kinetiky luminiscence. Detail prvních 15 μs jedné z těchto kinetik ukazuje obr. 28.

V případě protoporfyrinu IX a hematoporfyrinových derivátů byly pozorovány dva nárůsty a jeden pokles [44]. Proto byl očekáván vícesložkový průběh i pro VP. Ukazuje se ale, že kinetiky mají jeden nárůst a dva poklesy. Průběhy tak byly úspěšně fitovány lineární kombinací dvou funkcí tvaru (8), v níž t_2 značí shodnou dobu nárůstu, t_1 a t_3 dvě různé doby poklesu, b a c amplitudy a a konstantu pozadí:

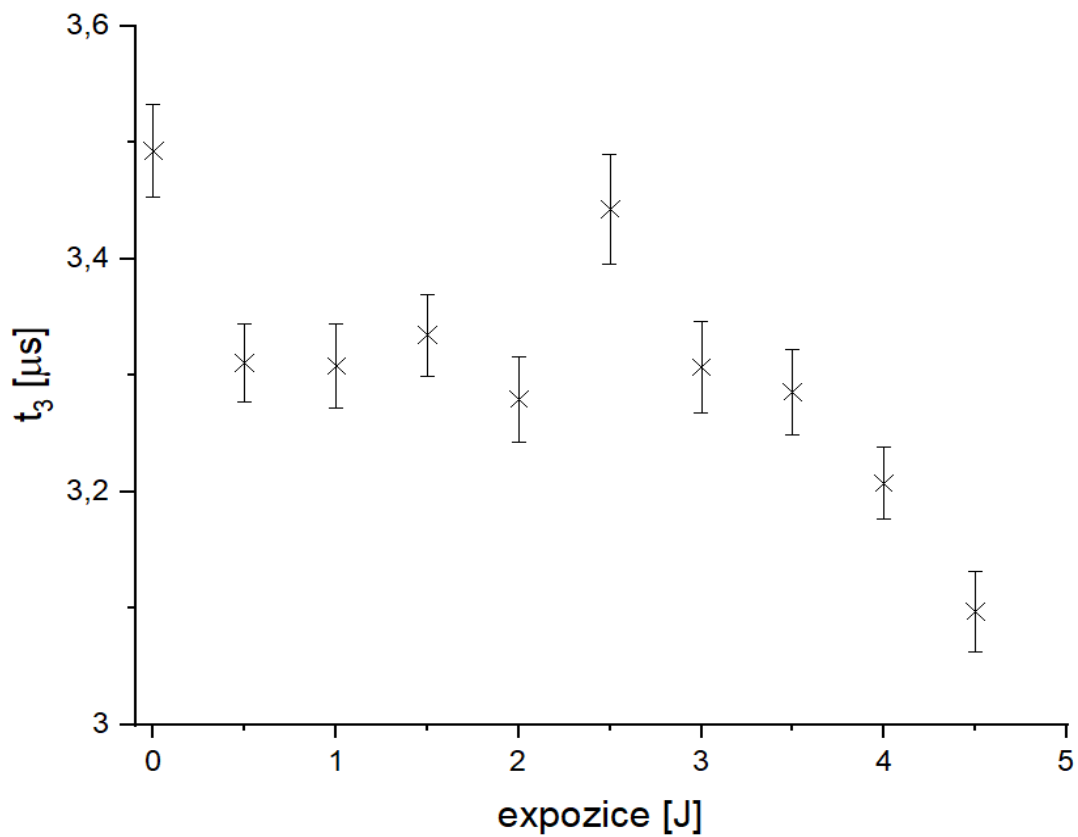
$$I(t) = b \cdot \left(\exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) - \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) \right) + c \cdot \left(\exp\left(-\frac{t}{t_3}\right) - \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) \right) + a. \quad (9)$$



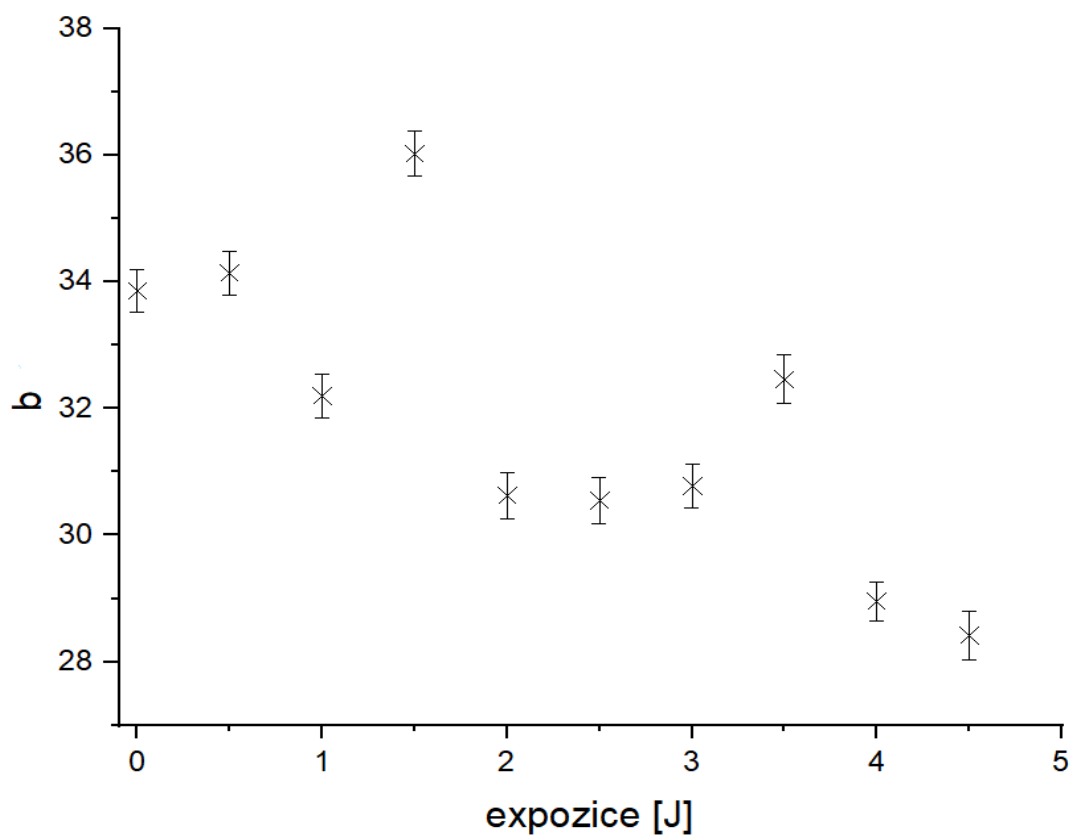
Obr. 29: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem



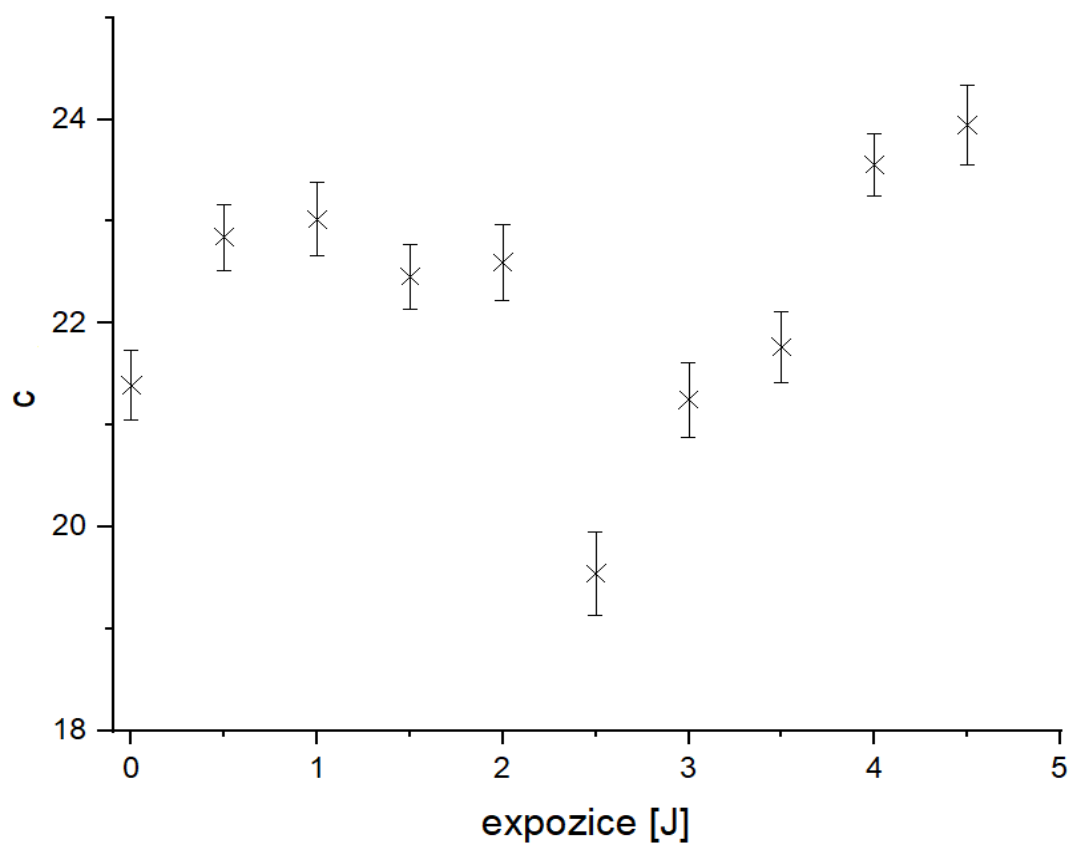
Obr. 30: Závislost doby t_2 na expozi v vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem



Obr. 31: Závislost doby t_3 na expozi v vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem



Obr. 32: Závislost amplitudy b na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem



Obr. 33: Závislost amplitudy c na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem

Důvodem vícesložkového průběhu může být přítomnost více forem VP. Předpoklad nehomogenního rozdělení VP v liposomu je podpořen i výsledky z [41], kde zhášení jodovými ionty ukazuje dvousložkový charakter, tj. dvě různé skupiny PS v lipidové dvojvrstvě. Část molekul VP by dle [41] mohla být ve formě J-agregátů.

Hodnoty t_2 získané tímto fitem z dvou měření (expozice 3 J a 4 J) se velmi výrazně (řádem) odlišovaly od ostatních, jejich odchylky měly šestinásobný řád oproti odchylkám ostatních hodnot. Tyto dvě hodnoty byly pro opakované fitování nahrazeny pevnými dobami lineárně interpolovanými ze zbylé závislosti.

Podobně jako výše jsme i zde do obr. 29 až 33 vynesli závislosti dob a amplitud na expozici.

Z obr. 29 lze odhadovat – odhlédneme-li od 6. hodnoty, že hodnota t_1 je v závislosti na expozici konstantní, její průměr je (623 ± 17) ns. To by mohlo být způsobeno zhášením $^1\text{O}_2$ molekulami VP, jehož schopnost zhášet $^1\text{O}_2$ byla prokázána v [1].

Doba t_2 se z obr. 30 zdá zhruba lineárně rostoucí, a to od přibližně 26 ns do 46 ns, extrapolace k nulové expozici dává dobu (30 ± 3) ns. Skutečnost, že je doba t_2 velmi krátká, odpovídá rychlejšímu zhášení tripletů VP při vyšší koncentraci kyslíku.

Doba t_3 se na obr. 31 jeví jako konstantní okolo 3,3 μs , v posledních dvou bodech mírně klesá od 3,5 μs do 3,1 μs . Průměr hodnot pro expozici od 0 J do 4 J dává dobu $(3,33 \pm 0,03)$ μs . Tato hodnota dobře odpovídá době života $^1\text{O}_2$ generovaného meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porfyrinem v kyslíkem nasyceném vodném roztoku [45]. Zkrácení této doby oproti odpovídající době života před nasycením kyslíkem dobře odpovídá zkrácení pozorovanému v [44], kde se doby zkrátily z 7,3 μs a 8,0 μs na 3,5 μs .

Amplituda b dle obr. 32 mírně klesá zhruba od 35 do 30, zatímco amplituda c z obr. 33 vykazuje zhruba konstantní průběh v okolí hodnoty 23, pouze u posledních dvou hodnot pozorujeme drobný nárůst korelující s odchylkou u posledních dvou hodnot t_3 .

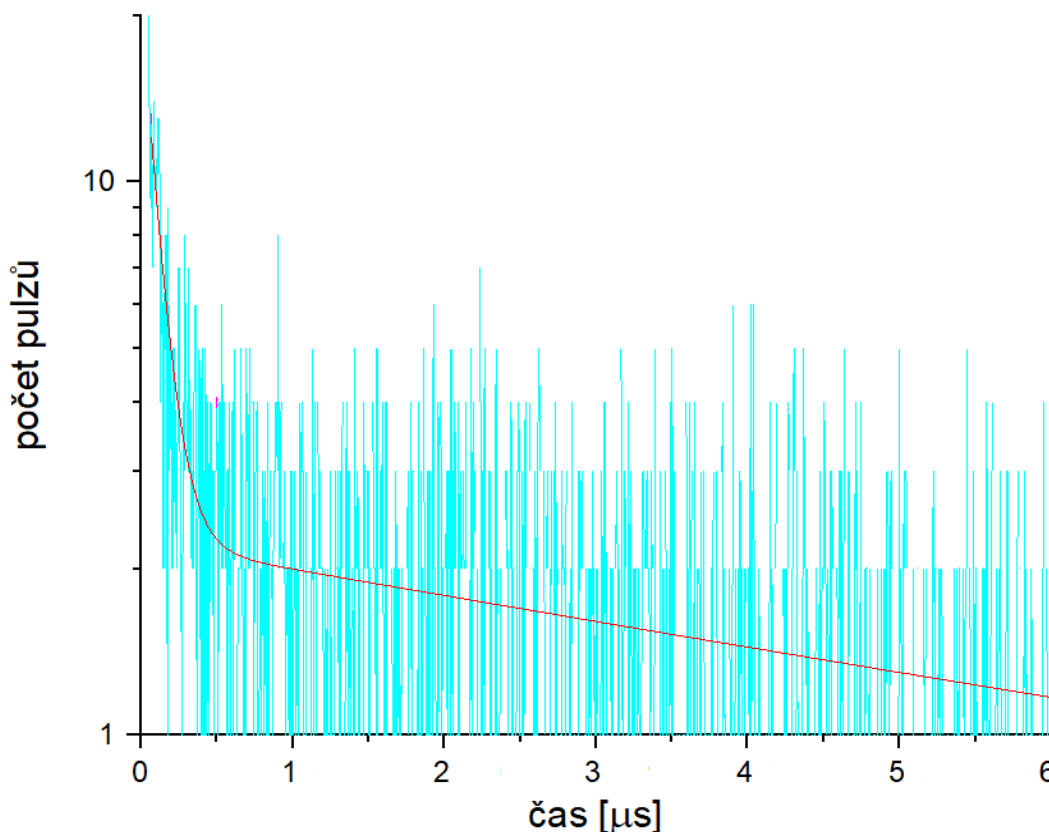
Pozorujeme tedy, že změna dob a amplitud je menší při nasycení vzorku kyslíkem než před ním. To může být způsobeno tím, že VP je zhašen kyslíkem dříve, než projde fotochemickou změnou, a proto je rychlost tvorby fotoproduktu menší než ve vzorku v rovnováze se vzduchem.

Pro další měření byl vzorek liposomálního VP nasycen dusíkem. V takovém případě nemohou být triplety VP zhášeny kyslíkem a signál by měl odpovídat pouze poklesu koncentrace tripletů VP. Průběh kinetik pak vypadal tak, jak je znázorněno na

obr. 34, kde je znázorněn detail pro čas do 6 μs . Získaná data, v souladu s předpokladem dvou skupin VP v liposomech, vykazují dvouexponenciální pokles a byla tak fitována funkcí

$$I(t) = b \cdot \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) + c \cdot \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) + a, \quad (10)$$

v níž jako b a c značíme amplitudy poklesů, t_1 a t_2 jsou doby života dvou skupin VP.



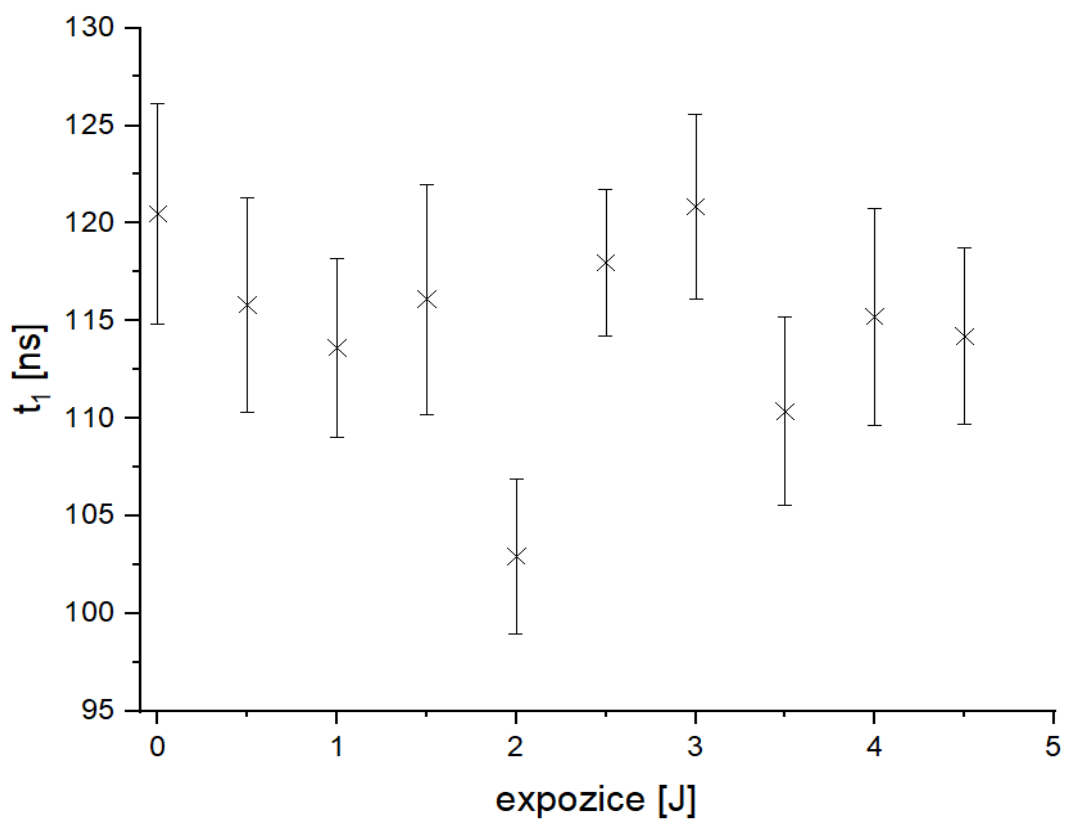
Obr. 34: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem

Stejně jako v předchozích případech nás u dob života a amplitud zajímají závislosti na expozici, které jsme vynesli do obr. 35 až 38.

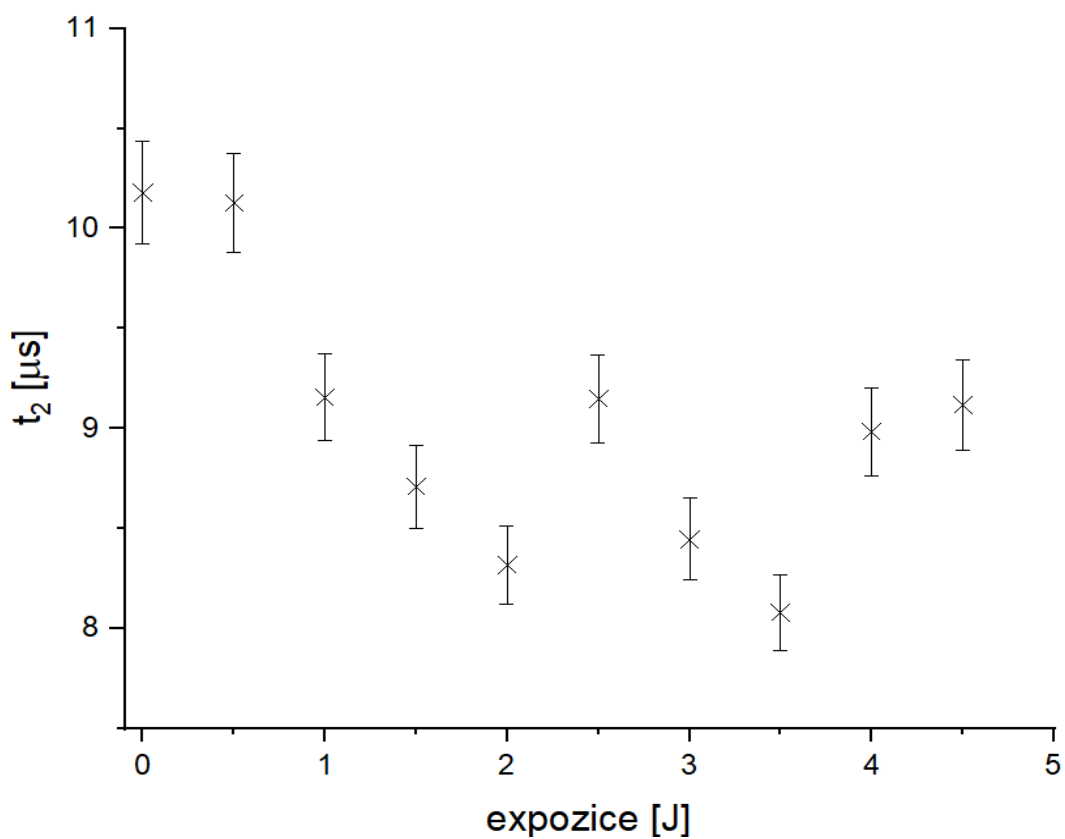
Z obr. 35 lze vyčíst, že závislost doby t_1 na expozici můžeme označit za konstantní. Tato velmi krátká doba života má průměrnou hodnotu (115 ± 2) ns, což je ještě méně, než byly doby nárůstu ve vzduchu.

Závislost doby t_2 na expozici z obr. 36 pak lze ve velmi hrubém přiblížení (a při vynechání prvních dvou hodnot) považovat za konstantu. Její průměr je $(8,7 \pm 0,2)$ μs . To je ovšem v rozporu s výše zmiňovanou myšlenkou na fotodegradaci bez kyslíku.

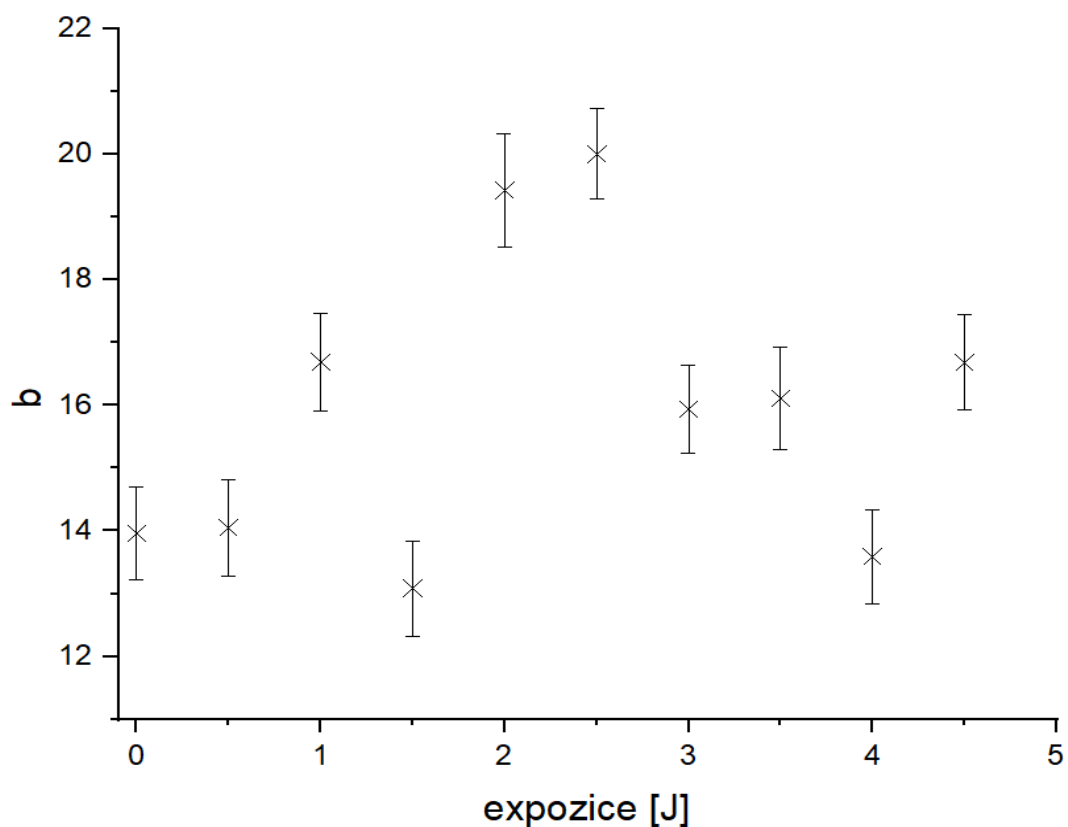
Amplitudy b na obr. 37 a c na obr. 38 pak nevykazují žádnou významnou závislost na expozici, použijeme-li opět velmi hrubé přiblížení, lze amplitudu b brát jako konstantu okolo 16 a amplitudu c jako konstantu okolo 2.



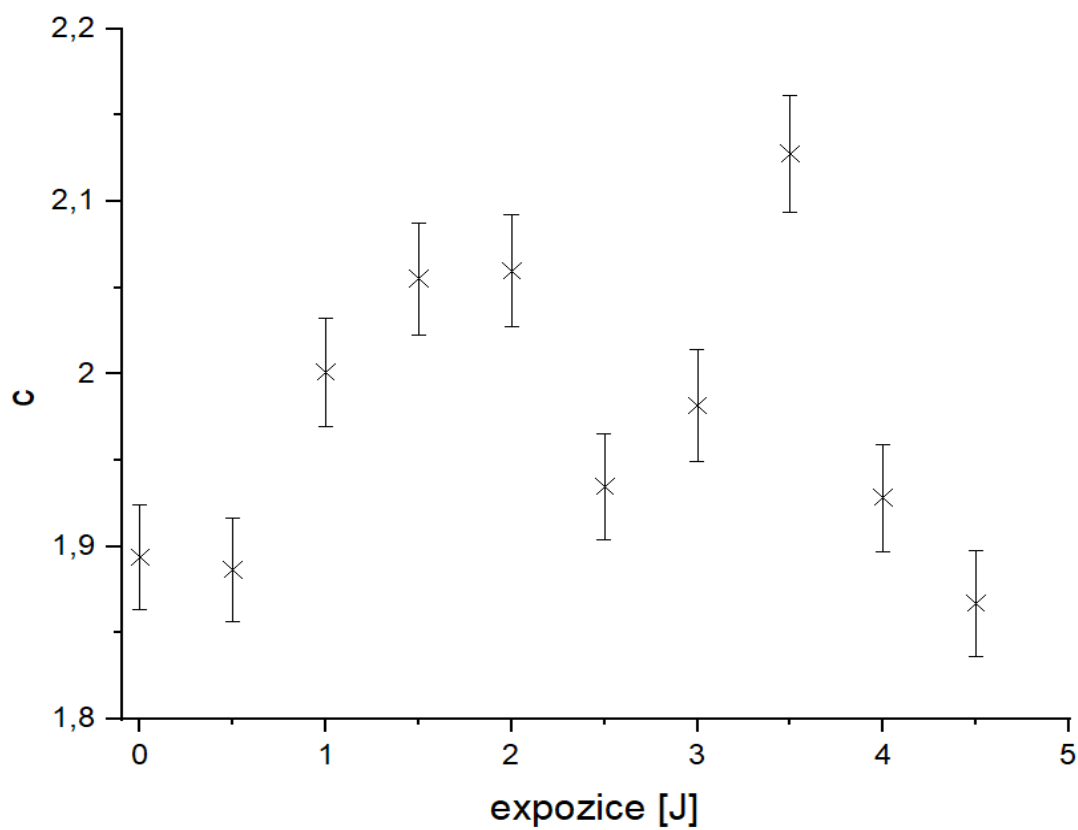
Obr. 35: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem



Obr. 36: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem

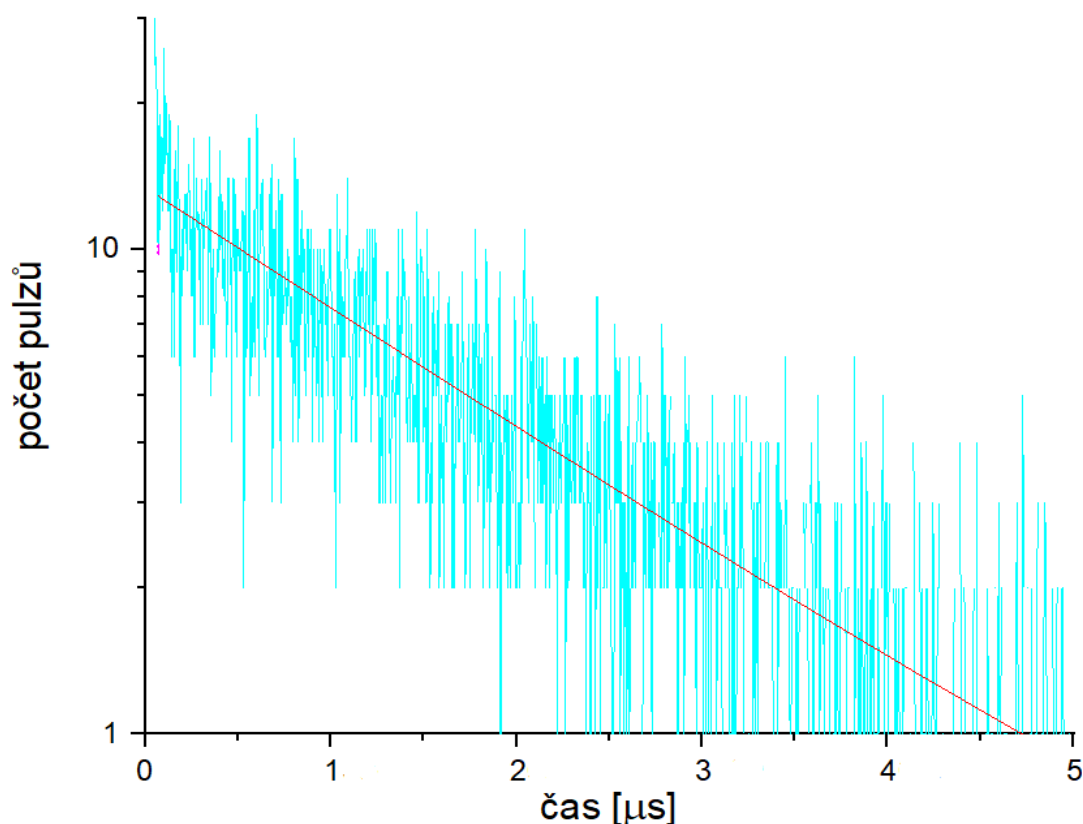


Obr. 37: Závislost amplitudy b na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem



Obr. 38: Závislost amplitudy c na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem

Při poslední sérii pokusů se vzorkem liposomálního VP ředěného PBS jsme vzorek obohatili o specifický zhášec singletního kyslíku azid sodný a opět jsme měřili kinetiku luminiscence. Detail jedné ze změřených kinetik ukazuje obr. 39.



Obr. 39: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3

Získané kinetiky v tomto případě vykazovaly pouze jednoexponenciální pokles a jsou tak fitovány funkcí s předpisem

$$I(t) = b \cdot \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) + a, \quad (11)$$

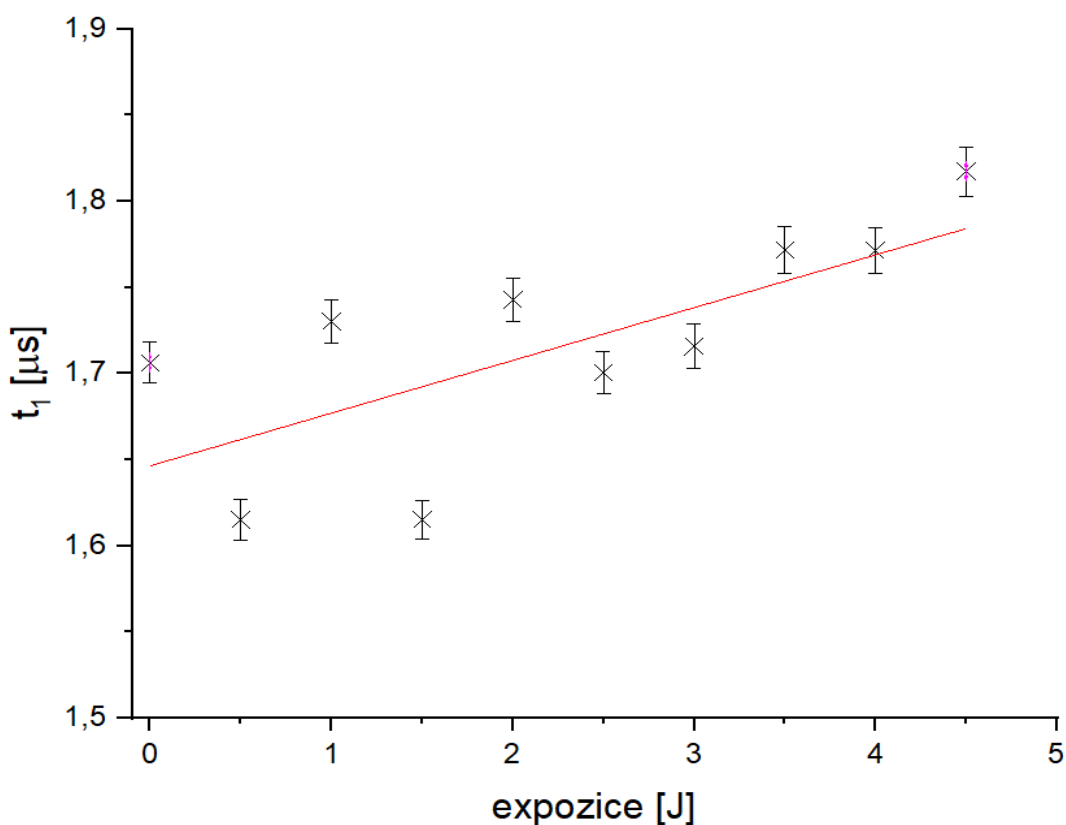
kde jako b označujeme amplitudu poklesu a jako t_1 dobu života tripletů VP.

I v tomto případě jsme na následující grafy – obr. 40 a 41 – vynesli závislosti t_1 a b na expozici.

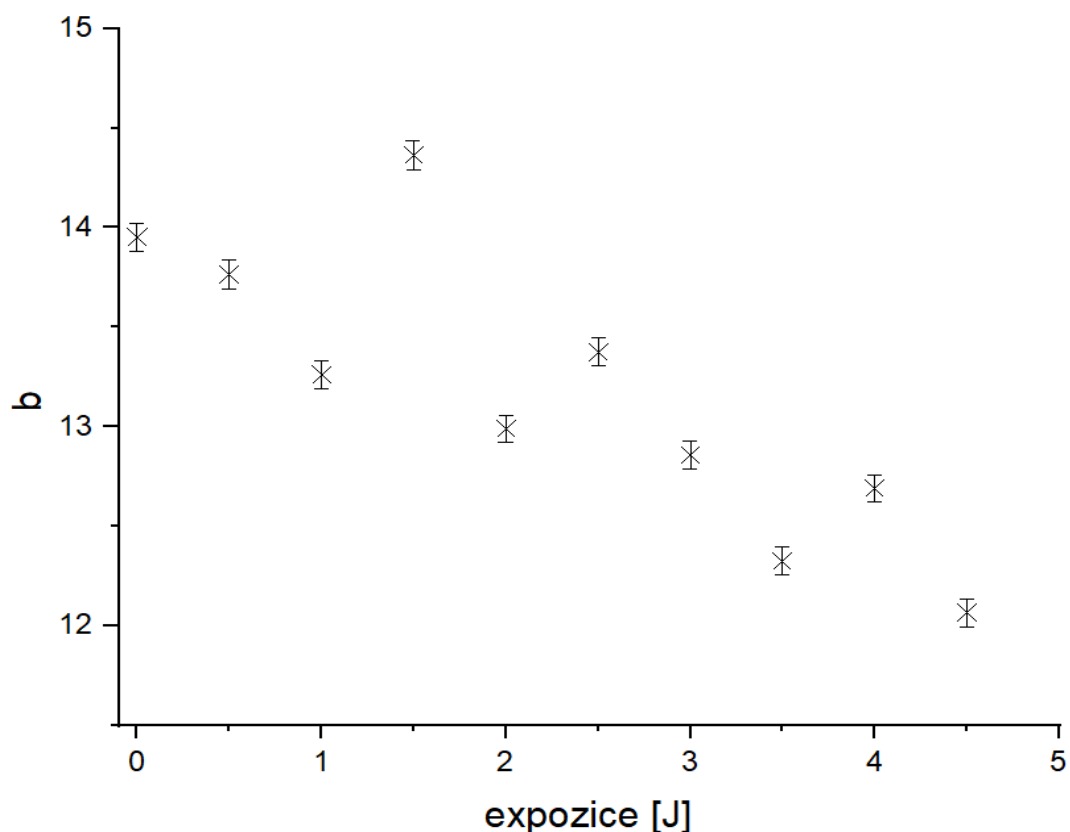
Z obr. 40 lze usuzovat, že doba života t_1 s rostoucí expozicí zhruba lineárně narůstá od $1,6 \mu\text{s}$ do $1,8 \mu\text{s}$, lineární extrapolace k nulové expozici dává dobu $(1,64 \pm 0,03) \mu\text{s}$. To opět odpovídá fotochemické změně, která ale není vyvolána $^1\text{O}_2$, neboť ten je zhášen azidem. V rozporu se získanými výsledky bychom ovšem očekávali, že tato doba bude odpovídat nárůstu ve vzorku v rovnováze se vzduchem, které byla $(326 \pm 11) \text{ ns}$. Naopak amplituda na obr. 41 s expozicí zřejmě lineárně klesá, a to od $14,5$ do 12 . Dochází zde tedy k poklesu jen na zhruba $4/5$ původní hodnoty.

Azid tedy zřejmě ovlivňuje výsledky další způsobem. Vzhledem k delší době života VP navrhuje, že by mohlo docházet k menšímu kontaktu VP s kyslíkem v lipidové dvojvrstvě.

Z výše uvedených výsledků usuzujeme, že VP v tripletním excitovaném stavu nejspíše reaguje s kyslíkem v základním stavu. Proto bez přítomnosti kyslíku (při nasycení dusíkem) není patrná velká změna. Nejedná se o reakci s $^1\text{O}_2$, neboť k ní dochází i v azidovém vzorku, kde $^1\text{O}_2$ není přítomný. Rozdíl mezi vzduchem a kyslíkem tak padá na vrub rychlejšímu zhášení tripletů rozpuštěným kyslíkem a tedy menší šanci na fotochemickou reakci. V [46] bylo pomocí EPR ukázáno, že tripletní VP může kromě $^1\text{O}_2$ účinně tvořit pomocí přenosu elektronu na kyslík i superoxidový radikál, který tak může být zodpovědný za tvorbu fotoproduktu.



Obr. 40: Závislost doby života t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3



Obr. 41: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3

6.3.2 Měření v D_2O

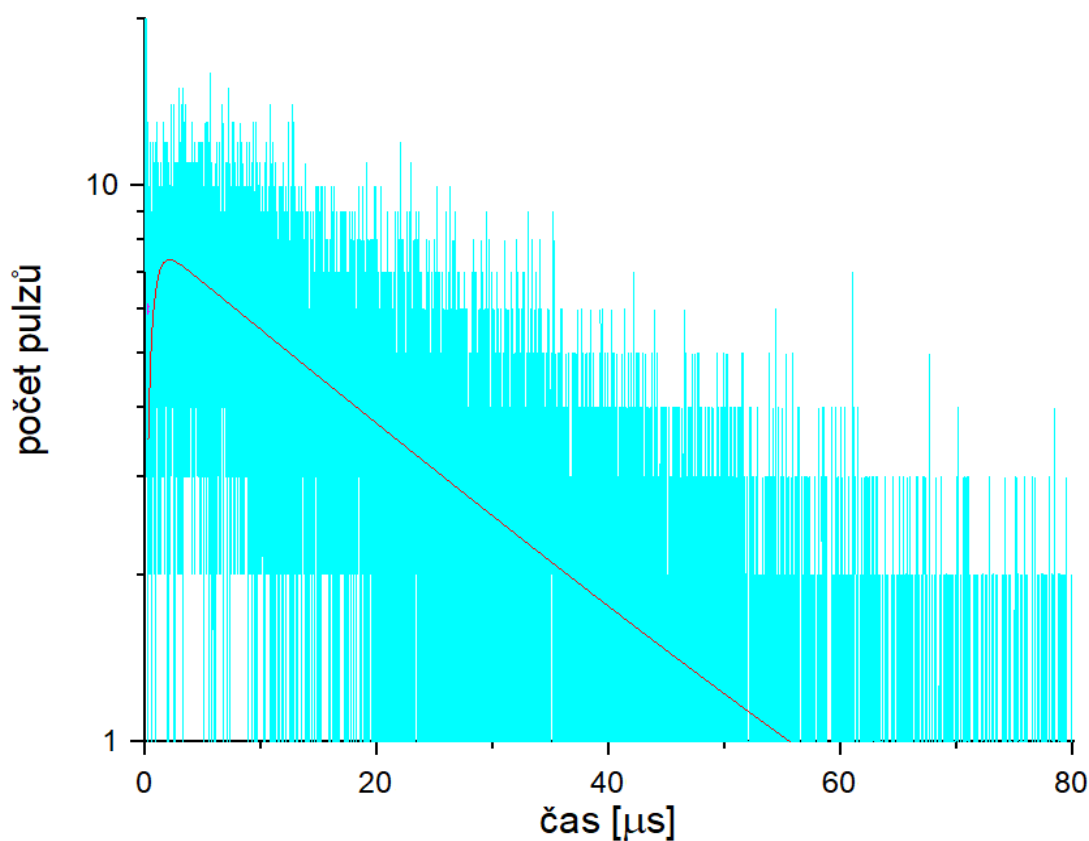
Měření v D_2O probíhalo stejně jako v PBS a zajímaly nás i stejné výstupy. Důvodem použití D_2O místo H_2O je tzv. izotopický efekt – D_2O zhasí $^1\text{O}_2$ mnohem méně než H_2O , a doby života $^1\text{O}_2$ se tak řádově prodlužují. Kinetiku luminiscence ze vzorku s liposomy s čistým PC znovu nevykreslujeme, její charakter byl i zde shodný jako v PBS a dále ji budeme zanedbávat. Na obr. 42 až 45 jsou výsledky pro vzorek liposomálního VP ředěného D_2O . K fitování dat byla použita funkce (8).

Závislost doby poklesu (která zde odpovídá době života $^1\text{O}_2$) t_1 na expozici dle obr. 43 lineárně roste od zhruba $23 \mu\text{s}$ do $25,5 \mu\text{s}$, z lineární extrapolace k nulové expozici získáme hodnotu $(23,4 \pm 0,1) \mu\text{s}$. Očekávali jsme, že se tato doba oproti výsledku v PBS prodlouží. Což se i stalo, konkrétně vzrostla 4,8x, což odpovídá výsledkům v [47], kde se prodloužila 5x. V čisté D_2O bychom měli naměřit hodnotu kolem $68 \mu\text{s}$ [48]. V našem případě ve vzorku zůstala část vody ve vzorku lehká a nejspíše dochází ke zhasení $^1\text{O}_2$ čerstvým VP a ne fotoproduktem (proto s expozicí doba t_1 roste), a tak jsme naměřili menší hodnotu.

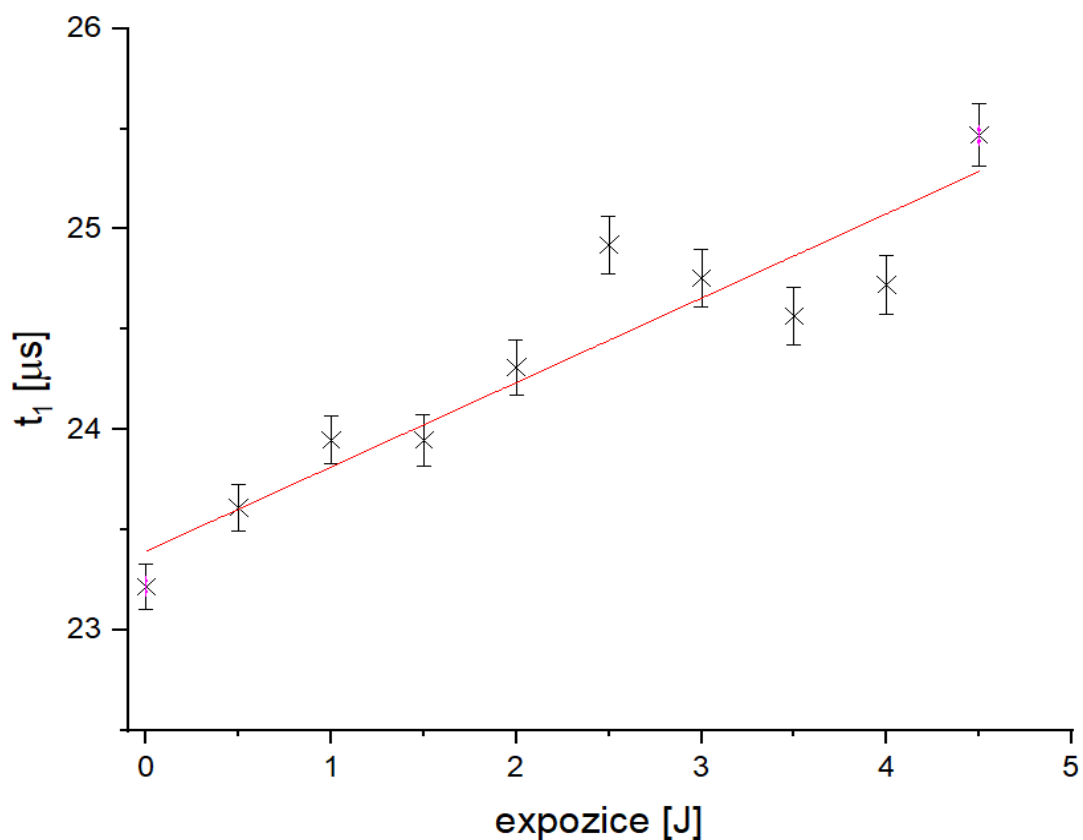
Podobně doba t_2 na obr. 44 s expozicí narůstá od 400 ns do 650 ns , lineární extrapolace k nulové expozici dává dobu $(419 \pm 26) \text{ ns}$. Očekávali bychom, že tato doba se

od výsledků získaných v PBS (kde vyšlo (326 ± 11) ns) nebude lišit. Důvod prodloužení doby nárůstu při přechodu k D_2O vysvětlit neumíme. Možná zde svou roli sehrává jiná iontová síla roztoku či dochází ke změně lipidové dvojvrstvy při vystavení těžké vodě, která může mít vliv na koncentraci nebo pohyblivost molekul kyslíku. Tento efekt by vyžadoval podrobnější zkoumání, které by ale bylo výrazně nad rámec diplomové práce.

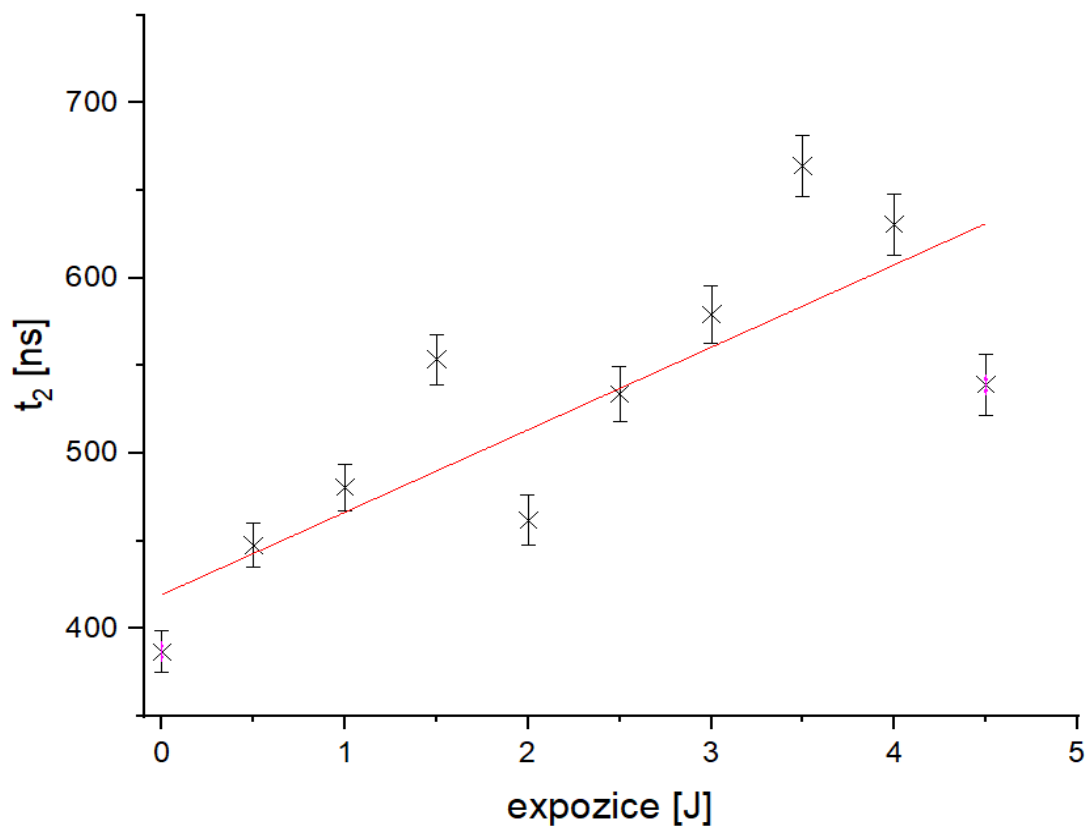
Amplituda b (na obr. 45) s rostoucí expozicí přibližně lineárně klesá od 10,5 do 7, tedy opět na $2/3$ původní hodnoty. I zde, stejně jako u PBS, je změna absorpce na příslušné vlnové délce jen malá.



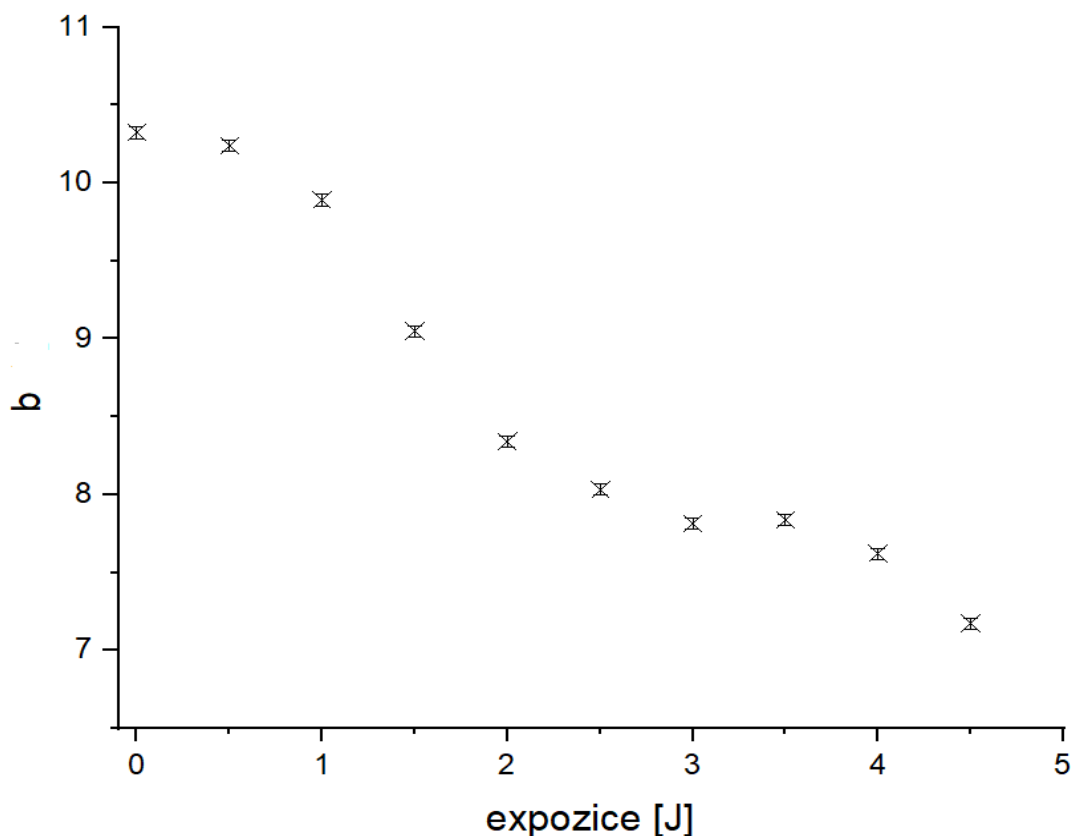
Obr. 42: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O



Obr. 43: Závislost doby t_1 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O



Obr. 44: Závislost doby t_2 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O



Obr. 45: Závislost amplitudy na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O

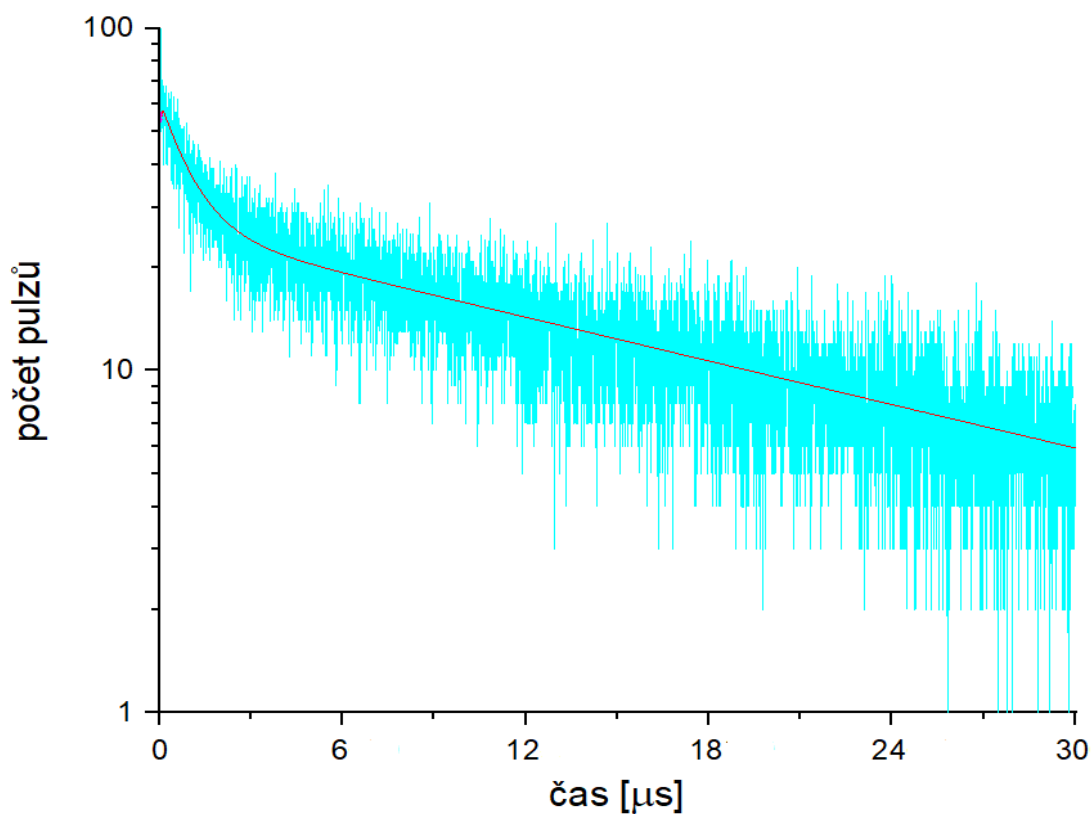
Dále byl vzorek opět nasycen kyslíkem, detail jedné z kinetik tohoto vzorku je vynesena na obr. 46. Data byla fitována funkcí (9). Další výsledky pro tato měření jsou zobrazeny na obr. 47 až 51.

Doba t_1 v závislosti na expozici roste od 875 ns do 1025 ns, jak ukazuje obr. 47. Extrapolace k nule dává čas (896 ± 19) ns. V PBS vyšla ovšem tato doba konstantní. Směrnice je ale poměrně malá, má hodnotu 19. Tato doba vyšla vyšší než v PBS, což odpovídá předpokladu prodloužení doby nárůstu při přechodu od PBS k D₂O.

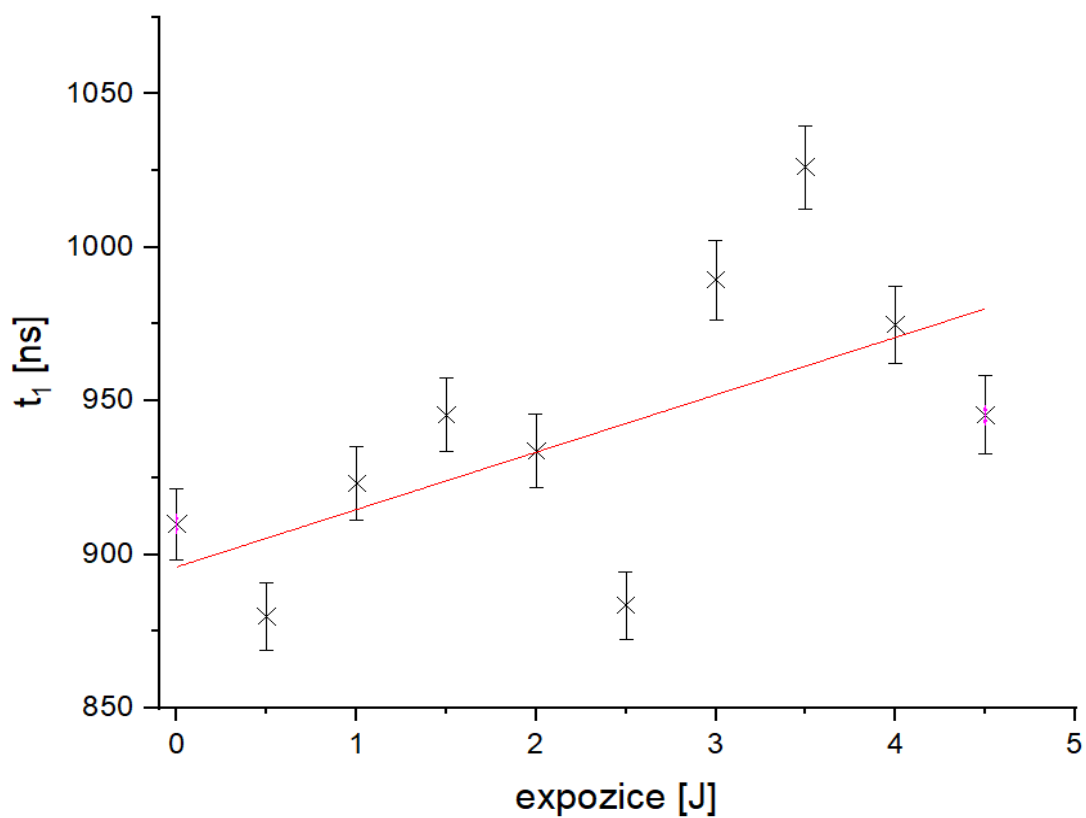
Na obr. 48 lze vidět, že doba t_2 je s rostoucí expozicí zhruba konstantní okolo 28 ns, konkrétně hodnota průměru je (28 ± 2) ns. To dobře odpovídá hodnotě 30 ns v PBS, kde se ovšem doba t_2 s expozicí prodlužuje.

Obr. 49 pak ukazuje závislost doby t_3 na expozici. Je též konstantní s průměrem ($20,19 \pm 0,02$) μ s. Oproti PBS došlo k prodloužení na šestinásobek, zkrácení oproti výsledkům na vzorku v rovnováze se vzduchem je minimální. Amplitudy s rostoucí expozicí klesají, amplituda b (obr. 50) od 40 do 37, amplituda c (obr. 51) od 26 k 25.

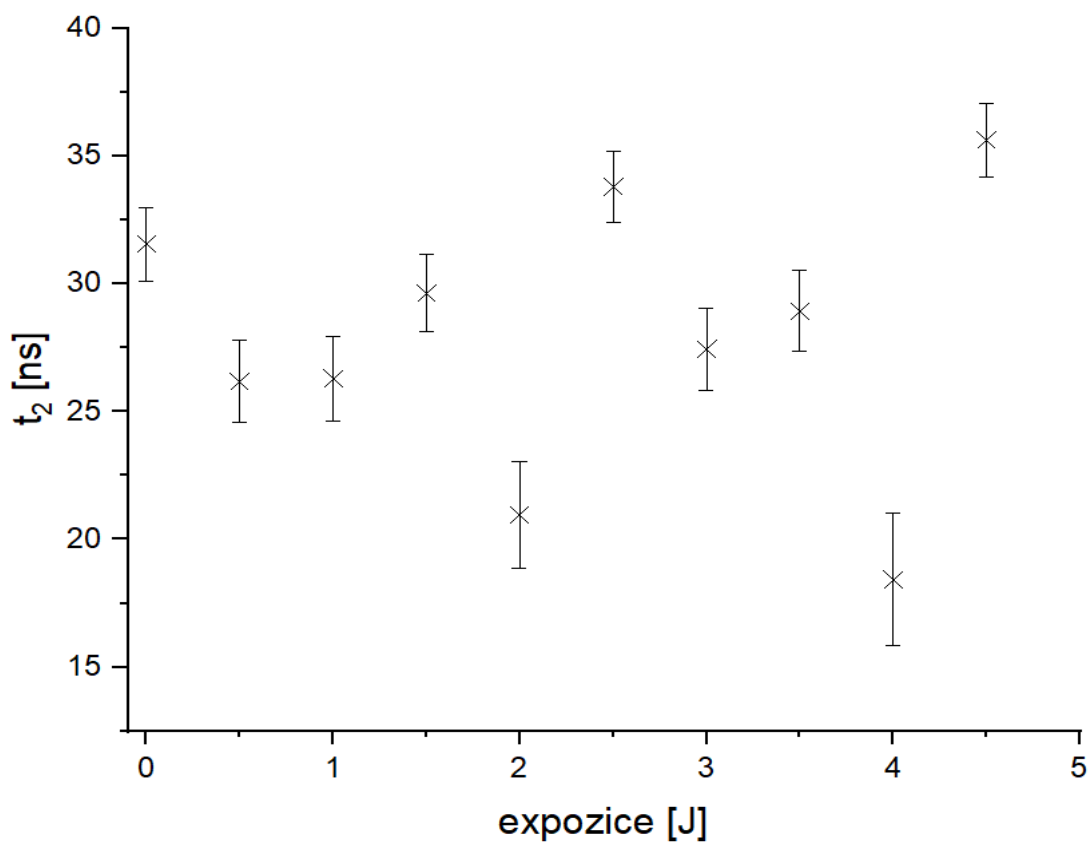
Stejně jako v PBS zde po nasycení kyslíkem doby života rostou a amplitudy klesají pomaleji kvůli rychlejšímu zhášení tripletů VP rozpuštěným kyslíkem, které konkuruje tvorbě fotoproduktu.



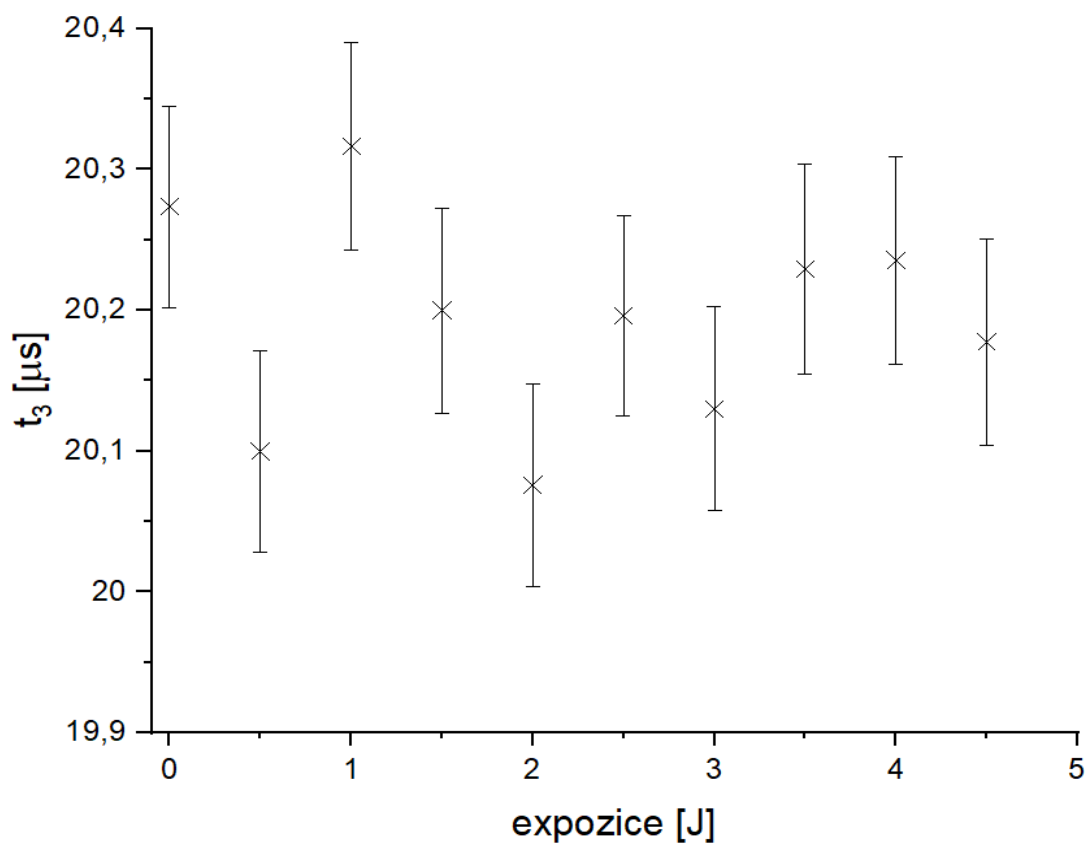
Obr. 46: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O nasyceném kyslíkem



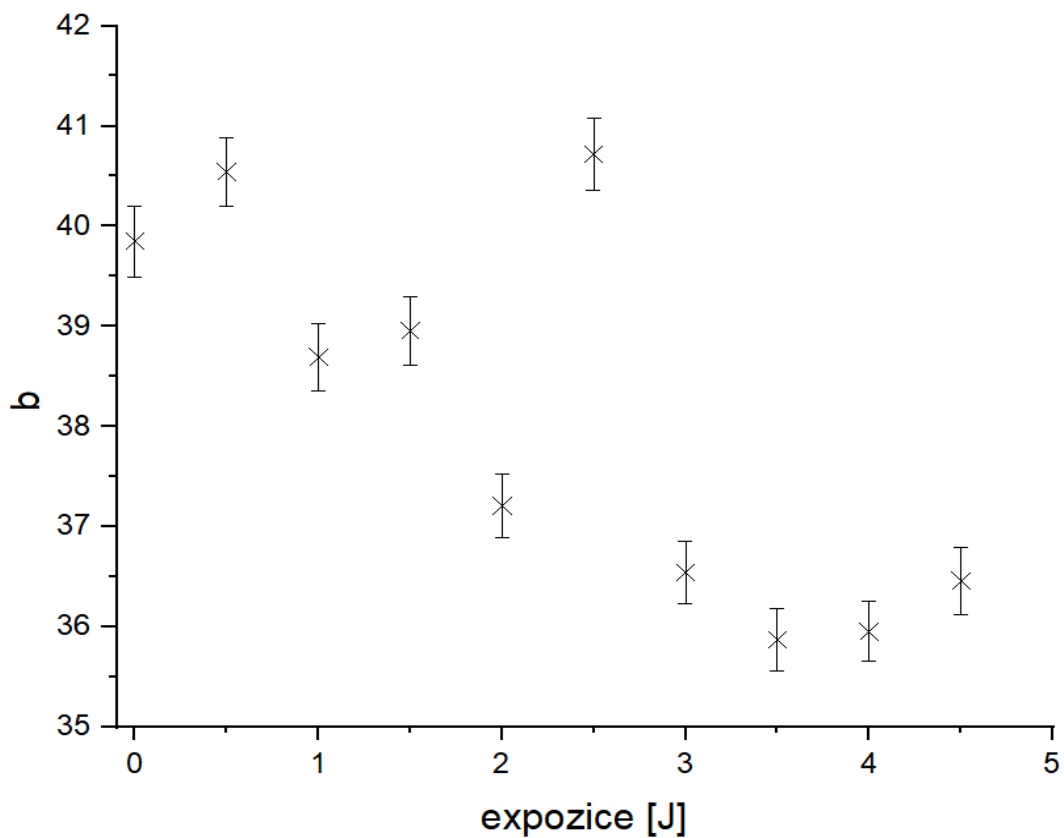
Obr. 47: Závislost doby t_1 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O nasyceném kyslíkem



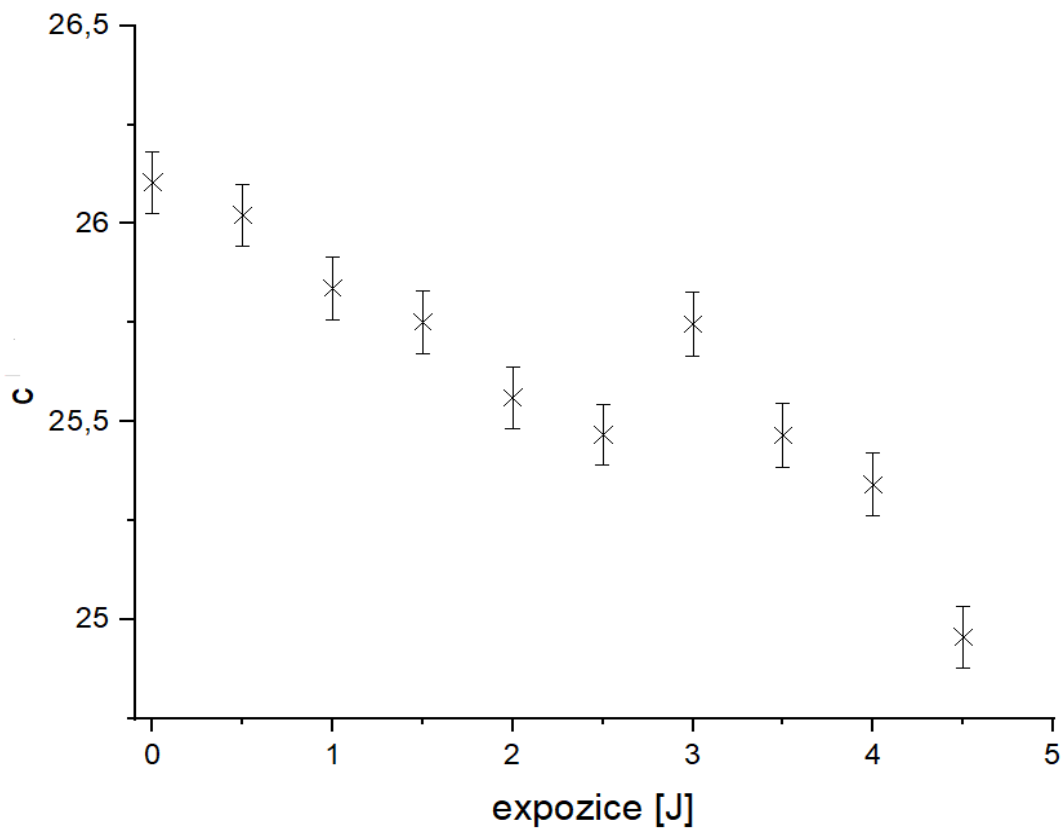
Obr. 48: Závislost doby t_2 na expoziční energii ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem



Obr. 49: Závislost doby t_3 na expoziční energii ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem

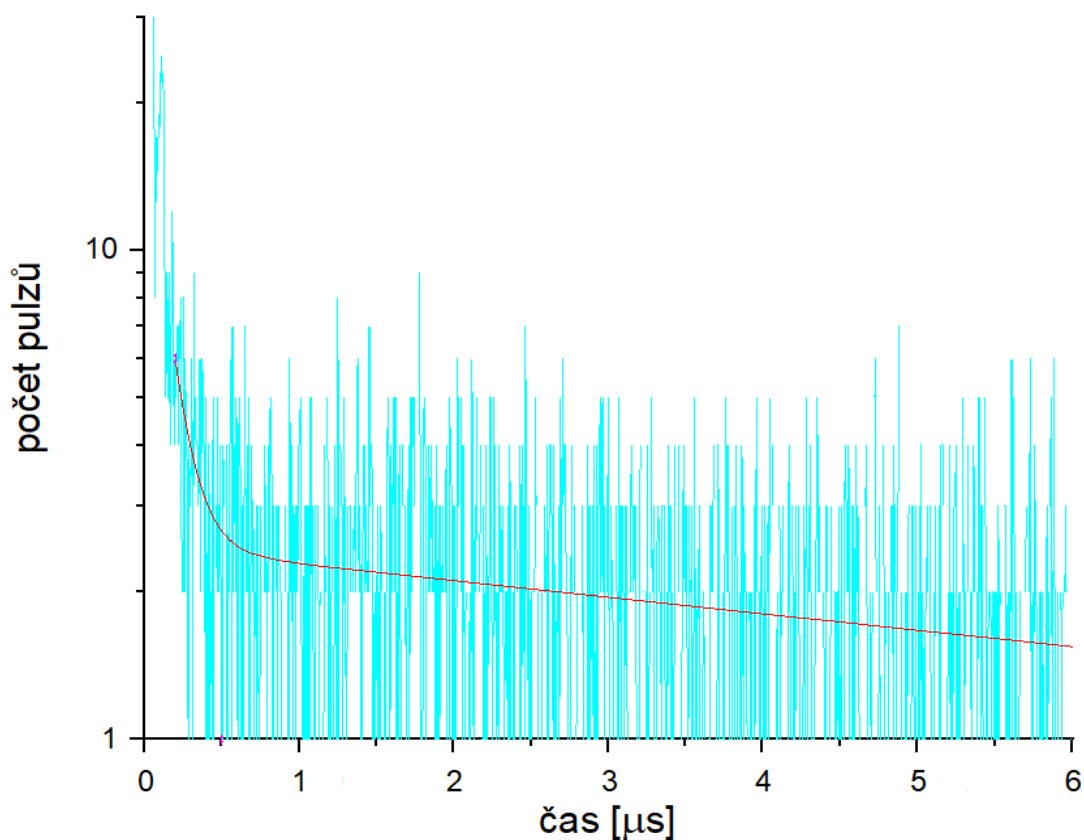


Obr. 50: Závislost amplitudy b na expoziční energii ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem



Obr. 51: Závislost amplitudy c na expoziční energii ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem

Další měření byla provedena se vzorkem nasyceným dusíkem. Obr. 52 ukazuje, jak v tomto případě vypadala kinetika luminiscence, data jsou fitována funkcí (10). Obr. 53 až 56 zobrazují závislost zjišťovaných parametrů na expozici.



Obr. 52: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem

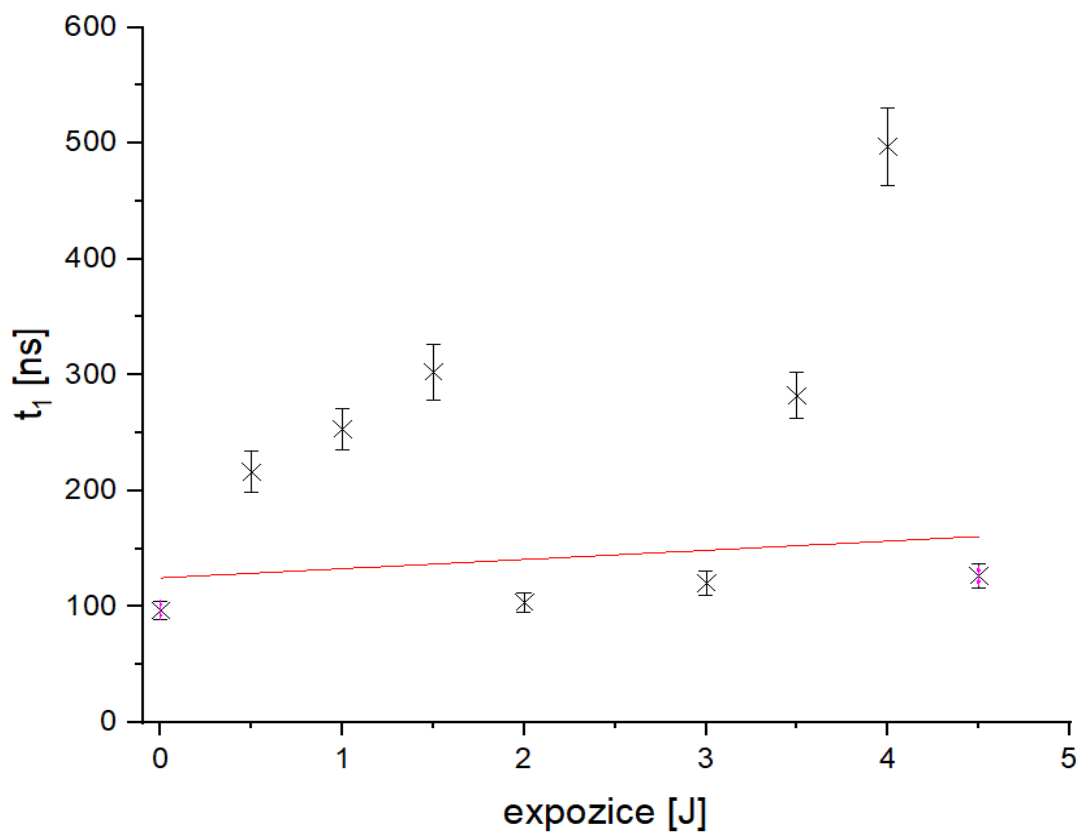
Ze zpracování byla vyřazena hodnota při expozici 2,5 J, která se řádově lišila od ostatních.

Závislost doby t_1 na expozici se z obr. 53 jeví jako rostoucí od 100 ns do 450 ns, ale pozorujeme oscilace hodnot. Lineární extrapolace k nulové expozici dává dobu (125 ± 43) ns (směrnice regresní přímky je $7,9 \pm 17,0$). Tato hodnota je v rámci chyby shodná s příslušnou hodnotou v PBS, kde ale byla závislost na expozici konstantní (ani zde se ale od konstanty příliš neliší). Pokud bychom se rozhodli nepovažovat závislost za rostoucí a brali ji jako zhruba konstantní, získali bychom průměr (222 ± 43) ns, což je téměř dvojnásobná hodnota oproti PBS.

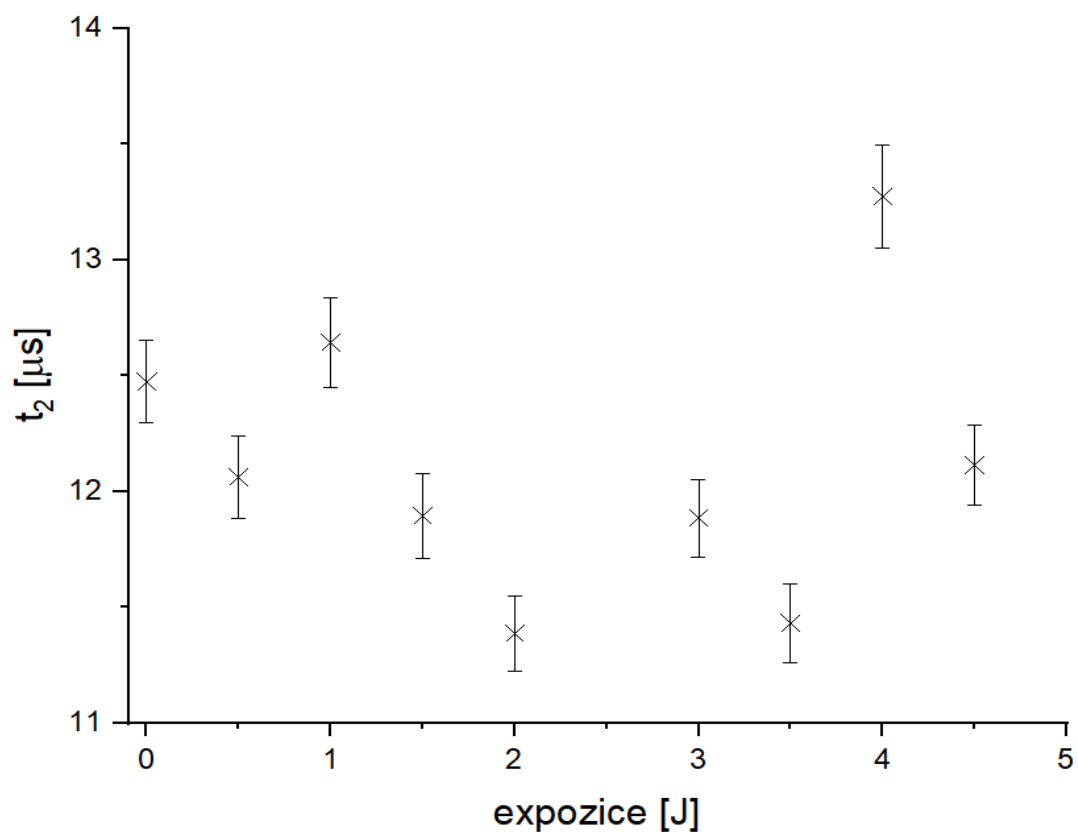
U závislosti doby t_2 na expozici (na obr. 54) se hodnoty jeví jako konstantní s průměrem $(12,1 \pm 0,2)$ μ s. To je více než v PBS, z čehož lze usuzovat, že izotopická záměna má nejspíše vliv i na doby života tripletů VP. Prodloužení je konzistentní s výsledky v předchozích vzorcích.

Na obr. 55 není zřejmá žádná závislost amplitudy b na expozici, hodnoty střídavě skokově rostou a klesají, některé z nich jsou navíc zatíženy velkými chybami.

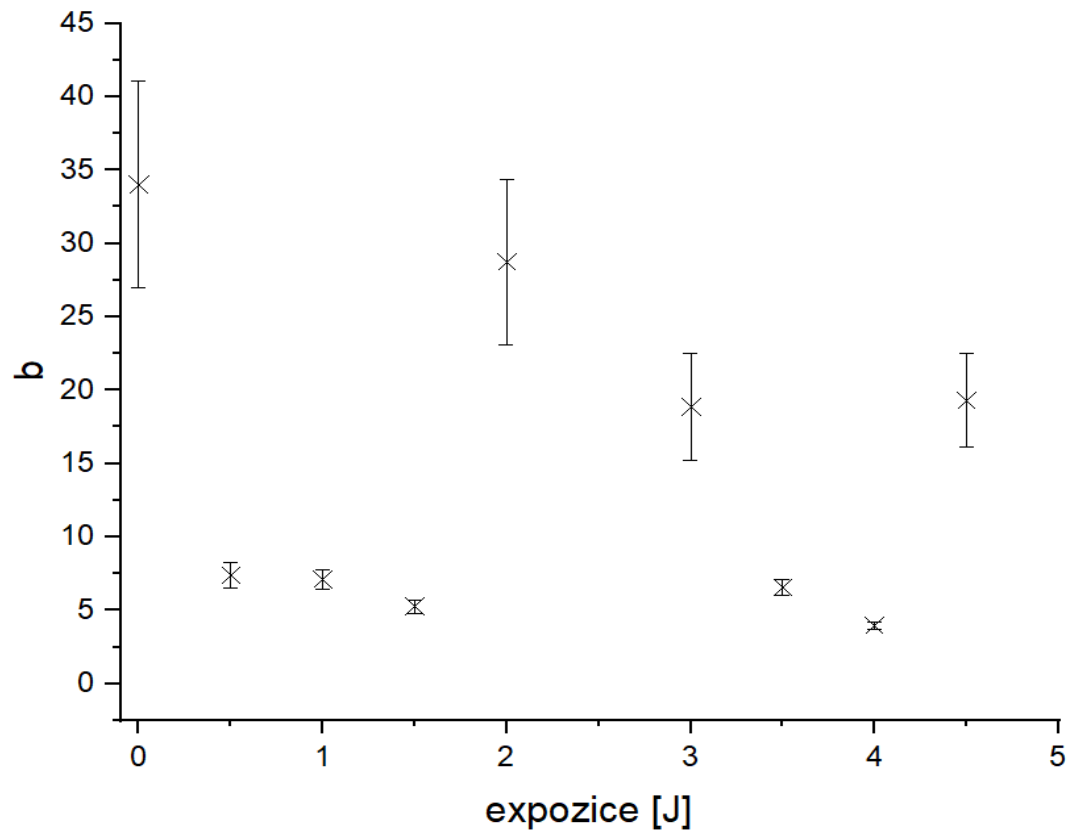
Amplituda c zůstává dle obr. 56 s rostoucí expozicí konstantní kolem hodnoty 2,24, což odpovídá situaci v PBS.



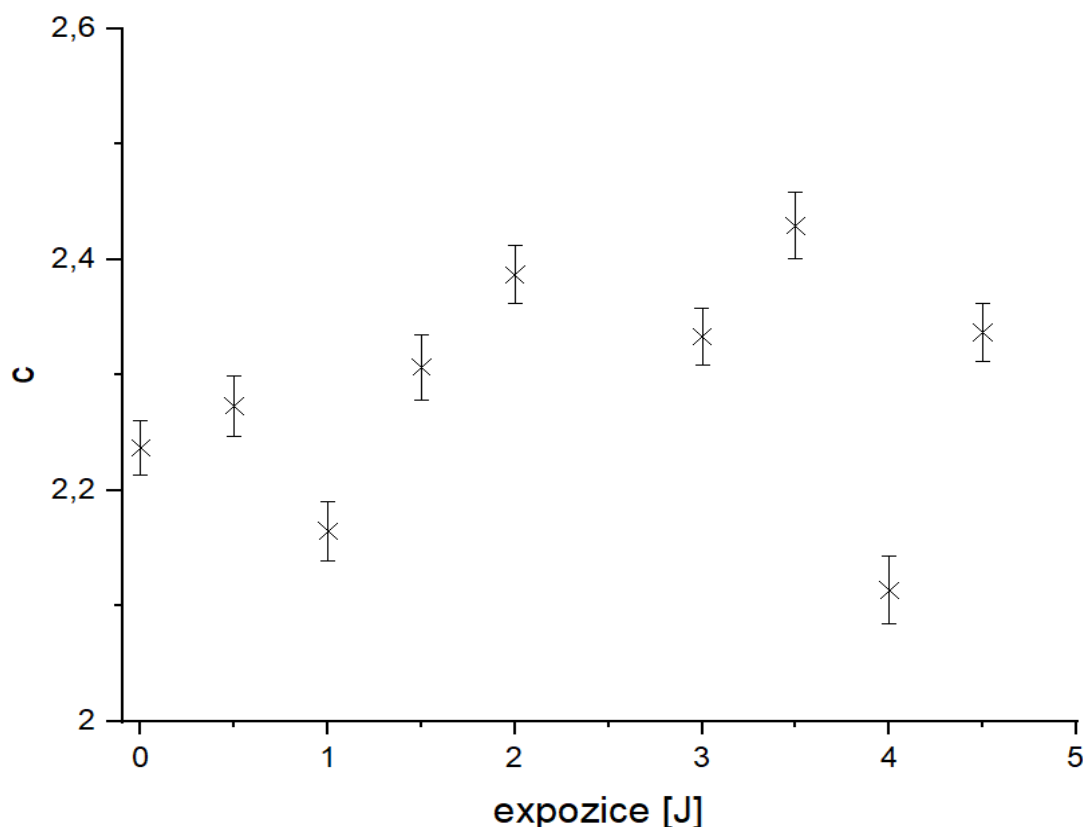
Obr. 53: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem



Obr. 54: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem



Obr. 55: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem



Obr. 56: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem

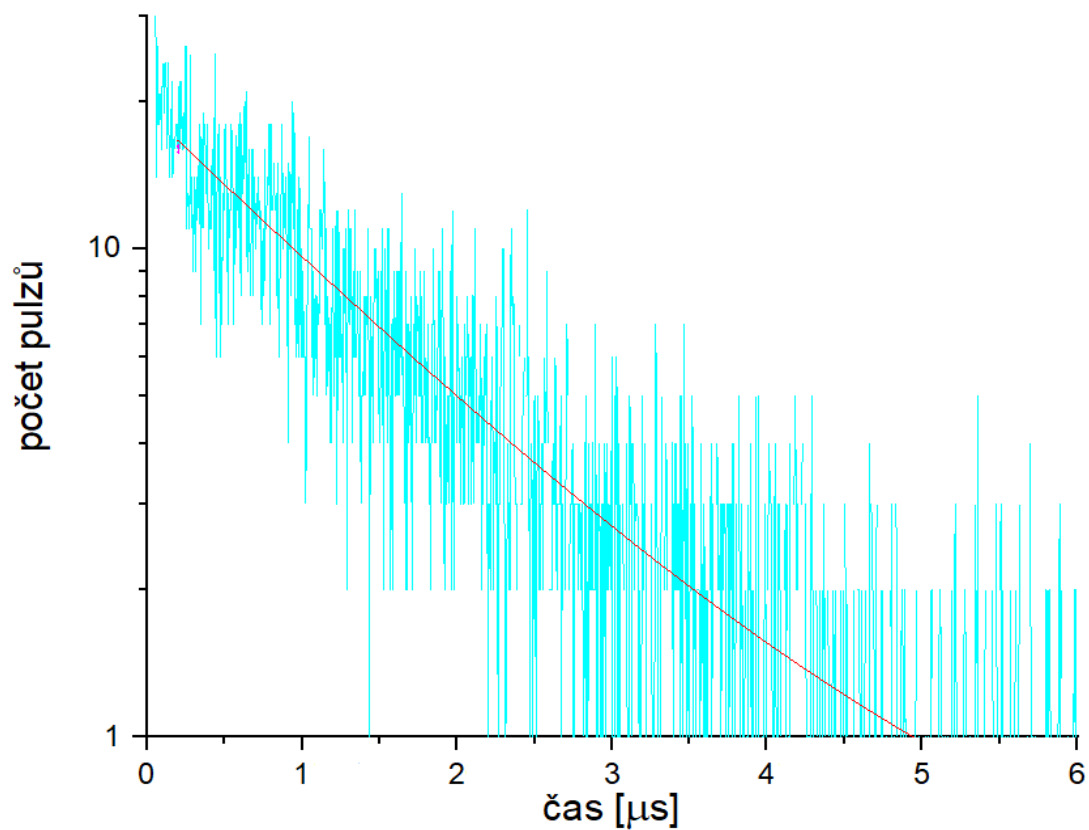
Poslední měření jsme opět provedli se vzorkem obohaceným o NaN_3 . Kinetiky – jejichž příklad ukazují obr. 57 – byly, na rozdíl od kinetik vzorků v PBS obohacených o NaN_3 , fitovány funkcí (10). Závislosti zjišťovaných parametrů na expozici jsou zobrazeny na obr. 58 až 61.

Z obr. 58 se zdá, že závislost doby t_1 na expozici vykazuje rostoucí trend – hodnoty se od $1,3 \mu s$ zvyšují k $1,6 \mu s$. Z lineární extrapolace k nulové expozici získáváme hodnotu doby $(1,37 \pm 0,03) \mu s$. Růst odpovídá situaci v PBS, ale hodnota zde vychází nižší. Nárůst zde opět svědčí o fotochemické změně nezávislé na 1O_2 .

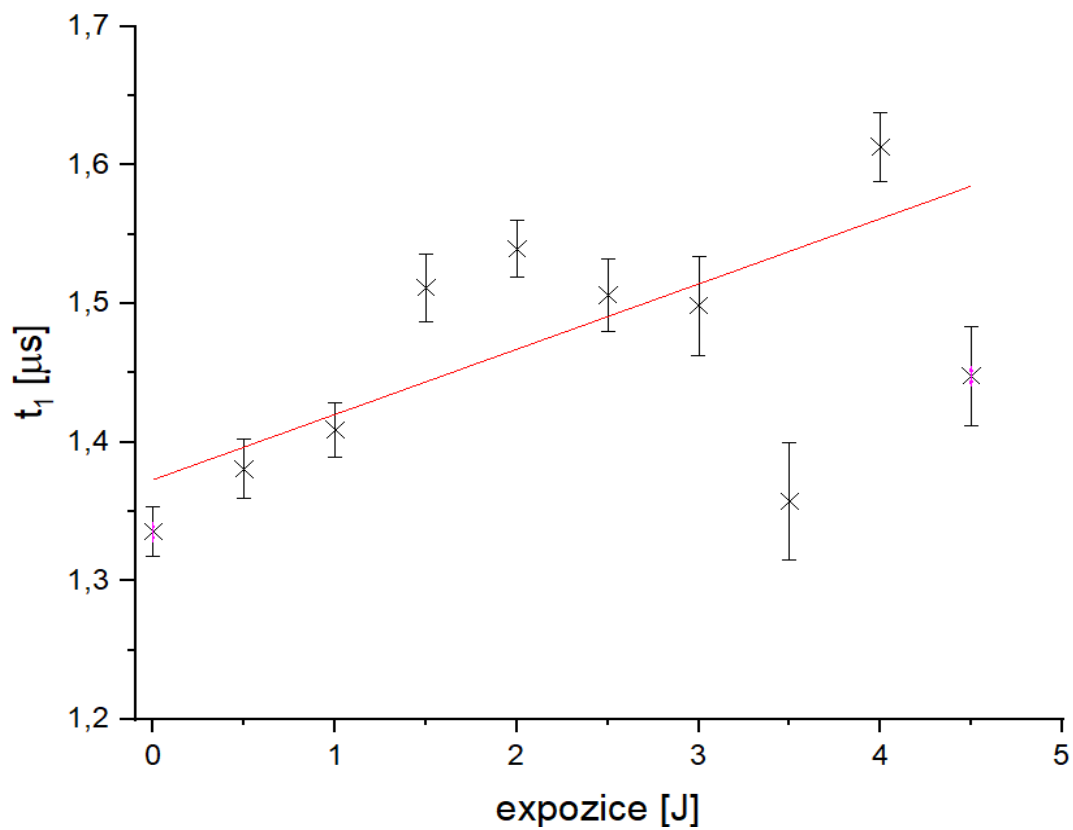
Doba t_2 se dle obr. 59 jeví zpočátku konstantní kolem hodnoty $6 \mu s$, poslední hodnoty tomuto trendu však neodpovídají. Průměr hodnot t_2 vychází jako $(5,9 \pm 0,3) \mu s$.

Amplituda b s rostoucí expozicí lineárně klesá (jak ukazuje obr. 60) a to od 19 k 14, tj. pokles na 74 % původní hodnoty. To je kvalitativně stejné jako v PBS, kde ale pozorujeme pokles pouze na 83 %.

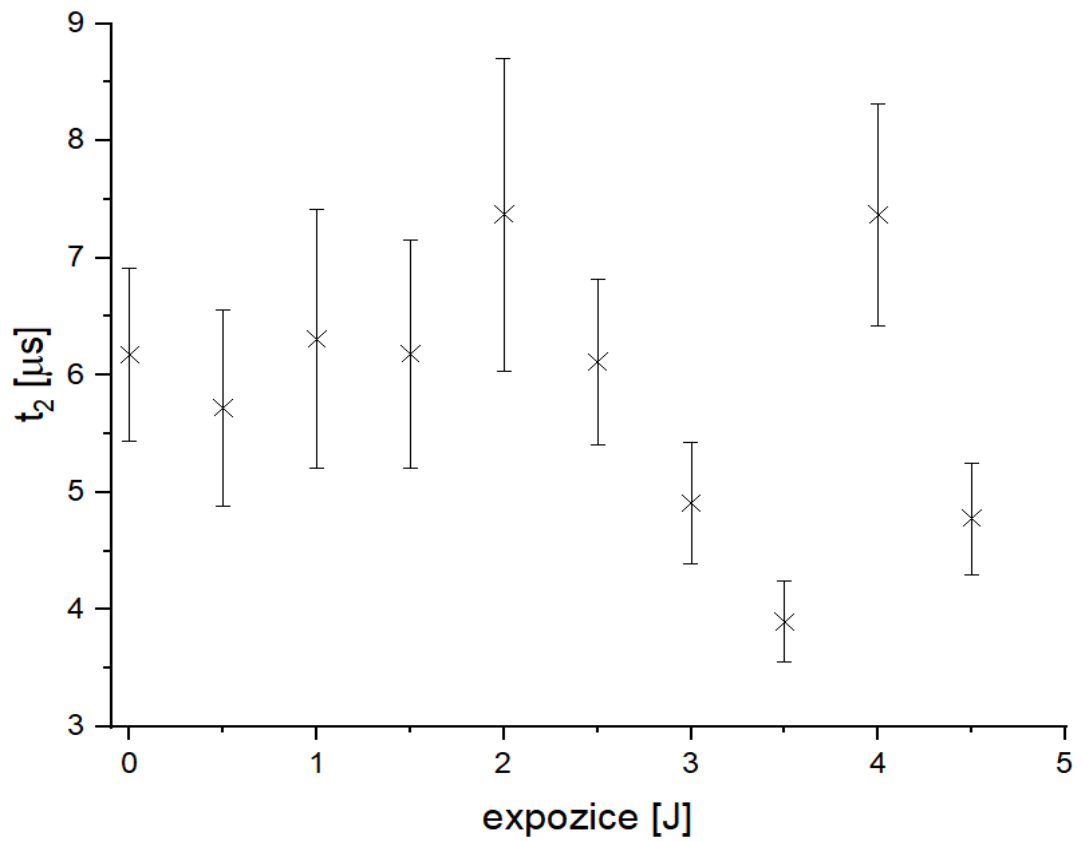
Amplituda c se v závislosti na expozici znázorněné na obr. 61 chová zpočátku jako konstanta okolo 0,75, v druhé polovině měření pak roste zhruba ke 2.



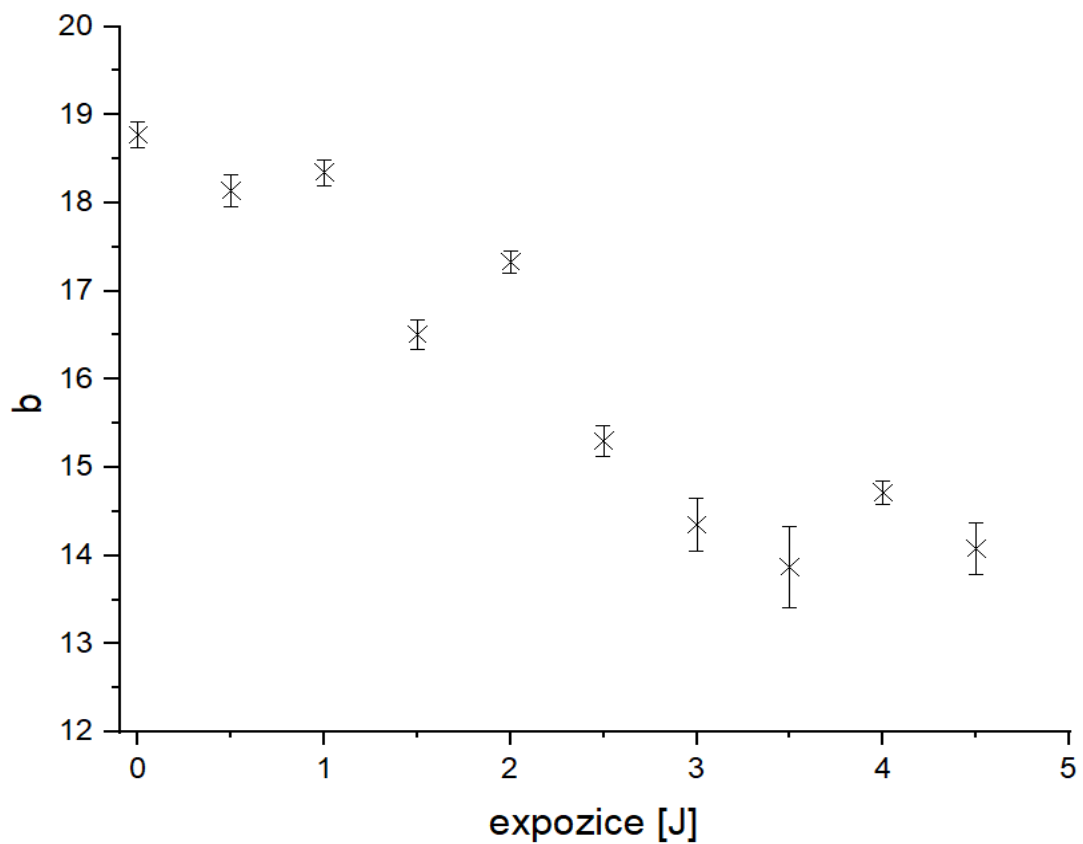
Obr. 57: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O obohaceném o NaN₃



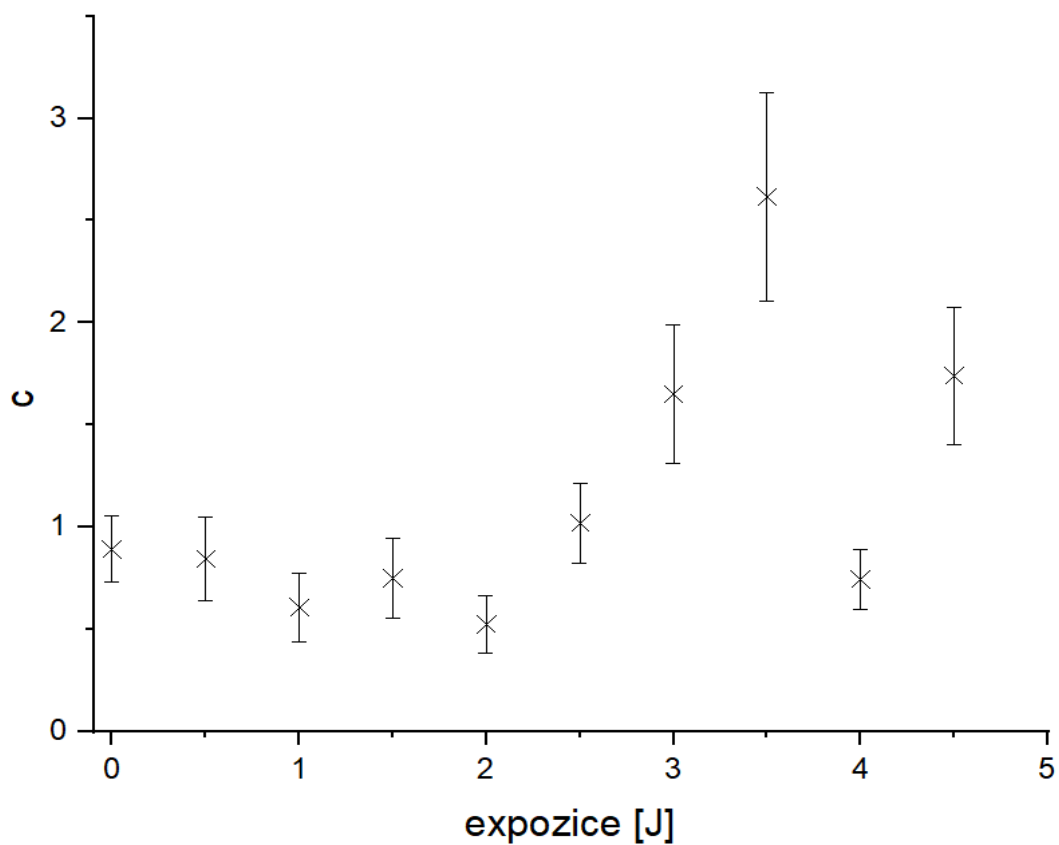
Obr. 58: Závislost doby t_1 na expoziční ve vzorku liposomálního VP ředěného v D₂O obohaceném o NaN₃



Obr. 59: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3



Obr. 60: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3



Obr. 61: Závislost amplitudy c na expozi v vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohacěném o NaN_3

7 Závěr

Pomocí hydratace fosfatidylcholinového filmu s verteporfinem a následné extruze byly připraveny liposomy o jednotné velikosti kolem 130 nm. Srovnáním absorpčního a fluorescenčního spektra verteporfinu v liposomech se spektry roztoku verteporfinu v organickém rozpouštědle bylo prokázáno, že se verteporfin nachází v lipofilní části lipidové dvojvrstvy v neagregované formě.

Měření absorpčních a fluorescenčních spekter před expozicí liposomů laserovému záření a po ní prokázalo vybělování verteporfinu a tvorbu fotoproduktu objevením nových spektrálních pásů.

Chování tripletních stavů verteporfinu v liposomech a jimi generovaného singletního kyslíku bylo zkoumáno měřením časově rozlišené emise singletního kyslíku. Změny dob života obou excitovaných stavů během expozice vzorku laserovému záření dokládají výše zmíněnou tvorbu fotoproduktu. Měření těchto kinetik za různé koncentrace rozpuštěného kyslíku a případné přítomnosti selektivního zhasěče singletního kyslíku prokázalo, že fotoprodukt vzniká pouze v přítomnosti kyslíku, a to i když je singletní kyslík zhasen zhasěčem. To ukazuje, že fotoprodukt vzniká reakcí tripletního stavu verteporfinu s kyslíkem v základním stavu. Byl navržen mechanismus reakce verteporfinu se superoxidovým radikálem, který může vznikat přenosem elektronu z tripletu verteporfinu na kyslík v základním stavu.

Průběh kinetik luminiscence singletního kyslíku a tripletů verteporfinu spolu se změnami vyvolanými záměnou normální vody za vodu těžkou ukazuje, že i verteporfin vytváří v liposomech dvě spektroskopicky odlišné skupiny.

Odlišnosti mezi chováním verteporfinu a jemu příbuzných fotosenzibilizátorů v liposomech, především při záměně normální vody za těžkou, otevřely řadu nových zajímavých otázek, jejichž zodpovězení bude vyžadovat podrobnější měření, která ale překračují rozsah diplomové práce. D₂O ani NaN₃ se však v těle při PDT nevyskytují, proto zkoumání jejich vlivu na chování VP v liposomech nemá význam z pohledu klinického využití fotosenzibilizátoru.

Všechny úkoly diplomové práce byly splněny.

Seznam použité literatury

- [1] LAUBROVÁ, Veronika. *Fotogenerace singletního kyslíku verteporfinem*. Praha, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra chemické fyziky a optiky. Vedoucí práce Doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.
- [2] MOLNÁR, Alexander. *Spectroscopic Study of Singlet Oxygen in Biological Systems*. Praha, 2008. Doktorská práce. Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra chemické fyziky a optiky. Vedoucí práce RNDr. Roman Dědic, Ph.D.
- [3] ŽONDECKÁ, Terezie. *Fotodynamická léčba v oftalmologii*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Monika Synková.
- [4] ŠULCOVÁ, Kristýna. *Fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii nádorů*. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček.
- [5] GRANDOVÁ, Milada. *Solubilizační systémy pro potenciální fotodynamicky aktivní látky III*. Hradec Králové, 2009. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Vedoucí práce PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.
- [6] KACEROVSKÁ, Denisa. *Fotodynamická terapie a diagnostika v dermatologii*. Plzeň, 2007. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni. Vedoucí práce Prof. MUDr. Karel Pizinger, CSc., Prof. MUDr. Vladimír Resl, CSc.
- [7] ŠTUKAVEC, Jan. *Preklinické stanovení účinnosti ftalocyaninu pro fotodynamickou terapii tumorů rektu*. Praha, 2009. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta. Vedoucí práce Doc. MUDr. Ladislav Horák, DrSc.
- [8] PAVELKOVÁ, Alena. *Využití chemiluminiscence při studiu fotodynamické produkce reaktivních forem kyslíku*. Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Mgr. Martina Bancířová, Dr.
- [9] ŠTROFOVÁ, Helena, Karel SEDLÁČEK, Alena JAROŠOVÁ a Zora DUBSKÁ. Věkem podmíněná makulární degenerace. *Klin Farmakol Farm.* 2013, **27**(2), 68-74.
- [10] SCHMIDT-ERFURTH, Ursula a Tayyaba HASAN. Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology*. 2000, **45**(3), 195-214. Dostupné z: doi:10.1016/s0039-6257(00)00158-2
- [11] FIALOVÁ, Petra a Vladimír VAŠKŮ. PDT a možnosti jejího využití v dermatologii. *Dermatologie pro praxi*. 2017, **11**(4), 166-169.
- [12] AGOSTINIS, Patrizia, Kristian BERG, Keith A. CENGEL, Thomas H. FOSTER, Albert W. GIROTTI, Sandra O. GOLLNICK, Stephen M. HAHN, Michael R. HAMBLIN, Asta JUZENIENE, David KESSEL, Mladen KORBELIK, Johan MOAN, Pawel MROZ, Dominika NOWIS, Jacques PIETTE, Brian C. WILSON a Jakub GOLAB. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2011, **61**(4), 250-281. Dostupné z: doi:10.3322/caac.20114

- [13] ŠLAMPA, Pavel, Ludmila HYNKOVÁ, Denis PRINC, Petr BURKONĚ a Hana DOLEŽALOVÁ. Radioterapie. *Masarykův onkologický ústav* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: https://static.mou.cz/d/mou.cz/files/4752.pdf/sea58aa172ecd?_ts=1622820457
- [14] ALLEN, Cynthia M., Wesley M. SHARMAN a Johan E. VAN LIER. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001, **5**(2), 161-169. Dostupné z: doi:10.1002/jpp.324
- [15] SCHOLZ, Marek. *Role antioxidantů v biologických systémech*. Praha, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce RNDr. Roman Dědic, Ph.D.
- [16] SKÁLA, Lubomír. *Kvantová teorie molekul*. Vydání první. Praha: Karolinum, 1995. ISBN 80-7184-007-6.
- [17] CASTANO, Ana P., Tatiana N. DEMIDOVA a Michael R. HAMBLIN,. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004, **1**(4), 279-293. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4
- [18] STEKLÁ, Monika. *Fotosenzitizéry používané v klinické praxi*. Hradec Králové, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček, Ph.D.
- [19] VAN STRATEN, Demian, Vida MASHAYEKHI, Henriette S. DE BRUIJN, Sabrina OLIVEIRA a Dominic J. ROBINSON. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*. 2017, **9**(2). Dostupné z: doi:10.3390/cancers9020019
- [20] ZVOLÁNKOVÁ, Kateřina. *Nové ftalocyaninové fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. Miloslav Macháček.
- [21] ZIMČÍK, Petr a Miroslav MILETÍN. Photodynamic Therapy. In: LANG, Arnold R. (ed.). *Dyes and Pigments: New Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009, s. 1-62. ISBN 978-1-60692-027-5.
- [22] FREISLEBEN, Jaroslav. *Elektroluminiscenční dioda jako iniciátor reaktivních forem kyslíku*. Plzeň, 2015. Disertační práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnická. Vedoucí práce Doc. Ing. Aleš Hamáček, Ph.D.
- [23] SVOBODA, Jan, Kamila SYSLOVÁ a Petr KAČER. Cílený transport platino-vých cytostatik. *Chemické listy*. 2016, **110**(12), 909-916.
- [24] ACKROYD, Roger, Clive KELTY, Nicola BROWN a Malcolm REED. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001, **74**(5), 656-669. Dostupné z: doi:10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2
- [25] ALLISON, Ron R. a Claudio H. SIBATA. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010, **7**(2), 61-75. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001
- [26] JOSEFSEN, Leanne B. a Ross W. BOYLE. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs*. 2008, (4). Dostupné z: doi:10.1155/2008/276109

- [27] NYMAN, Emma S. a Paavo H. HYNNINEN. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B: Biology*. 2004, **73**(1-2), 1-28. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002
- [28] O'CONNOR, Aisling E., William M. GALLAGHER a Annette T. BYRNE. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2009, **85**(5), 1053-1074. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x
- [29] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1). Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [30] VELÍNSKÁ, Kamila. *Využití nanofluidního směšování pro přípravu liposomálních nosičů značených gadoliniem pro kontrastní zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
- [31] FAHMY, Sherif Ashraf, Hassan Mohamed El-Said AZZAZY a Jens SCHAEFER. Liposome Photosensitizer Formulations for Effective Cancer Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(9). Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13091345
- [32] GURÁŇ, Roman. *Studium vlastností liposomů jako přenašečů léčiv pomocí různých analytických metod*. Brno, 2014. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie. Vedoucí práce Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.
- [33] HUBOVÁ, Veronika. *Studie interakcí azaftalocyaninů s unilamelárními liposomy II*. Hradec Králové, 2008. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Vedoucí práce PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.
- [34] ZUBER, Agnieszka A., Elizaveta KLANTSATAYA a Akash BACHHUKA. Biosensing. In: ANDREWS, David L., Robert H. LIPSON and Thomas NANN (ed.). *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*. Druhé vydání. Elsevier, 2019, s. 105-126. ISBN 978-0-12-812296-9.
- [35] KAŇA, Antonín a Oto MESTEK. Atomová absorpční spektrometrie. *VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [36] VOLKA, Karel, Marcela KADLECOVÁ a Kamil ZÁRUBA. *Příklady z analytické chemie pro bakaláře*. Praha: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-610-9.
- [37] GREMLICA, Miroslav. *Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace v materiálově orientovaných vědách*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
- [38] D'ORAZIO, Valeria, SENESI, Nicola, ed. Fluorescence Spectroscopy. In: HILLEL, Daniel. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, 2005, s. 35-52. ISBN 978-0-12-348530-4/978-0-12-348530-4.
- [39] GILLIES, Robert, Nikiforos KOLLIAS, Tayyaba HASAN a Heyke C. DIDDENS. Spectral characterization of the benzoporphyrin derivative monoacid

- ring— A photoproduct formed in fetal calf solutions during irradiation with 694 nm continuous-wave radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B: Biology*. 1996, **33**(1), 87-90. Dostupné z: doi:10.1016/1011-1344(95)07222-5
- [40] AVELINE, Béatrice, Tayyaba HASAN a Robert W. REDMOND. Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Photochemistry and Photobiology*. 1994, **59**(3), 328-335. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05042.x
- [41] DE OLIVEIRA, Daphne Christine Salles, Camila Fabiano DE FREITAS, Italo Rodrigo CALORI, et al. Theranostic verteporfin- loaded lipid-polymer liposome for photodynamic applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B: Biology*. 2020, **212**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112039
- [42] SIMIONESCU, Stefania, Sofia TEODORESCU, Rodica Mariana ION, Elena VOICILA a Gheorghe NECHIFOR. Polymeric Membrane for Verteporfin Purification. *Materiale Plastice*. 2017, **54**(1), 14-17. Dostupné z: doi:10.37358/MP.17.1.4775
- [43] WESTON, Mark A. a Micheal S. PATTERSON. Calculation of Singlet Oxygen Dose Using Explicit and Implicit Dose Metrics During Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A (BPD-MA)-PDT In Vitro and Correlation with MLL Cell Survival. *Photochemistry and Photobiology*. 21n. 1., **87**(5), 1129-1137. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00942.x
- [44] MOLNÁR, Alexander, Roman DĚDIC a Jan HÁLA. Spectroscopic study of singlet oxygen photogeneration by lipophilic photosensitizer in liposomes. *Journal of Luminescence*. 2008, **128**(5-6), 783-785.
- [45] DĚDIC, Roman, Alexander MOLNÁR, Miloslav KOŘÍNEK, Antonín SVOBODA, Jakub PŠENČÍK a Jan HÁLA. Spectroscopic study of singlet oxygen photogeneration in meso-tetra-sulphonatophenyl-porphin. *Journal of Luminescence*. 2004, **108**(1-4), 117-119. Dostupné z: doi:10.1016/j.jlumin.2004.01.027
- [46] HADJUR, Christophe, Georges WAGNIERES, Philippe MONNIER a Hubert VAN DEN BERGH. EPR and Spectrophotometric Studies of Free Radicals ($O_2^{\circ-}$, $^{\circ}OH$, $BPD-MA^{\circ-}$) and Singlet Oxygen (1O_2) Generated by Irradiation of Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A. *Photochemistry and Photobiology*. 1997, **65**(5), 818-827. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb01929.x
- [47] MOLNÁR, Alexander, Roman DĚDIC, Jan HÁLA a Antonín SVOBODA. Singlet oxygen production by lipophilic photosensitizers in liposomes studied by time and spectral resolved phosphorescence. *Journal of Molecular Structure*. 2007, **834**, 488-491. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2006.12.019
- [48] KILGER, Robert, Max MAIER, Rolf-Markus SZEIMIES a Wolfgang BÄUMLER. Bidirectional energy transfer between the triplet T1 state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide. *Chemical Physics Letters*. 2001, **343**(5-6), 543-548. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-2614(01)00738-2
- [49] YANO, Tomonori, Manabu MUTO, Kenichi YOSHIMURA, et al. Phase I study of photodynamic therapy using talaporfin sodium and diode laser for local failure after chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Radiation Oncology*. 2012, **7**. Dostupné z: doi:10.1186/1748-717X-7-113

- [50] FREI, Angelo. Molecular orbital scheme for triplet oxygen and the two forms of singlet oxygen. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. Wikimedia Foundation, 15. prosince 2013 [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/58/Molecular_orbital_scheme_for_the_three_forms_of_oxygen.png/1200px-Molecular_orbital_scheme_for_the_three_forms_of_oxygen.png
- [51] Age-Related Macular Degeneration. In: *Brahmanbaria Eye Hospital* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://brahmanbariaeyehospital.com/admin/uploads/arch/website/magazine/61ab2a9fa27608898.jpg>
- [52] BOZZUTO, Giuseppina a Agnese MOLINARI. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, **10**(1), 975-999. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S68861
- [53] KIM, You Chan., Eun So LEE, P. S. CHUNG a C. K. RHEE. Recalcitrant palmoplantar pustular psoriasis successfully treated with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2005, **30**(6), 723-724. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01905.x
- [54] RATKAY, Leslie G., J. Douglas WATERFIELD a David W. C. HUNT. Photodynamic Therapy in Immune (Non-Oncological) Disorders. *BioDrugs*. 2000, **14**(2), 127-135. Dostupné z: doi:10.2165/00063030-200014020-00006
- [55] Extruder. In: *Avanti Polar Lipids: Equipment* [online]. [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://avantilipids.com/assets/general/extruder-1c-1200px.jpg>
- [56] DĚDIC, Roman, Antonín SVOBODA a Jan HÁLA. *Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky II - náhradní úloha číslo 7: Měření emise fotogenerovaného singletního kyslíku*. KCHFO MFF UK.
- [57] GIBAULT, Floriane, Fabrice BAILLY, Matthieu CORVAISIER, Mathilde COEVOET, Guillemette HUET, Patricia MELNYK a Philippe COTELLE. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. *ChemMedChem*. 2017, **12**(12), 954-961. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201700063

Seznam obrázků

Obr. 1: Vlevo stav pacienta s lupénkou před PDT, vpravo stav po léčbě (převzato z [53])	2
Obr. 2: Léčba nádoru pomocí chemoradioterapie a PDT (převzato z [49]).....	3
Obr. 3: Porovnání změn na sítnici při suché (vlevo) a vlhké (vpravo) formě AMD (převzato z [51])	4
Obr. 4: Schematické znázornění molekulovým orbitalů kyslíku (upraveno z [50])	5
Obr. 5: Schematické znázornění procesu fotosenzibilizace (upraveno z [10])	6
Obr. 6: Optické okno a absorpční spektra důležitých chromoforů (převzato z [17]).....	9
Obr. 7: Strukturní typy porfyrinů (I), chlorinů (II) a bakteriochlorinů (III) (převzato z [4])	11
Obr. 8: Chemická struktura ftalocyaninů (převzato z [4])	12
Obr. 9: Stavba liposomu (převzato z [52])	13
Obr. 10: Struktura verteporfinu, hematoporfyrinu a protoporfyrinu IX, (převzato z [57])	14
Obr. 11: Absorpční spektrum verteporfinu (převzato z [54])	14
Obr. 12: Extruder pro tvorbu liposomů požadované velikosti (převzato z [55])	19
Obr. 13: Výsledek měření na zeta-sizeru. Zelená barva odpovídá vzorku liposomů s VP, červená vzorku čistých liposomů	20
Obr. 14: Uspořádání pro měření infračervené luminiscence singletního kyslíku (převzato z [56])	21
Obr. 15: Absorpční spektrum vzorku s VP v PBS před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v PBS s azidem po měření kinetik luminiscence.....	23
Obr. 16: Absorpční spektrum NaN_3	24
Obr. 17: Absorpční spektrum prázdných liposomů v PBS	25
Obr. 18: Absorpční spektrum vzorku s VP v D_2O před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v D_2O s azidem po měření kinetik luminiscence.....	26
Obr. 19: Absorpční spektrum prázdných liposomů v D_2O	27
Obr. 20: Fluorescenční spektrum vzorku s VP v PBS před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v PBS s azidem po měření kinetik luminiscence	28

Obr. 21: Fluorescenční spektrum vzorku s VP v D ₂ O před měřením kinetik luminiscence a po něm a vzorku VP v D ₂ O s azidem po měření kinetik luminiscence	30
Obr. 22: Příklad rozložení fluorescenčního spektra na pásy, zde konkrétně pro vzorek VP v liposomech ředěný D ₂ O po měření kinetik luminiscence	31
Obr. 23: Kinetika luminiscence na vzorku prázdných liposomů ředěných v PBS	32
Obr. 24: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS	33
Obr. 25: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS	33
Obr. 26: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS	34
Obr. 27: Závislost amplitudy na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS	34
Obr. 28: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	35
Obr. 29: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	36
Obr. 30: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	37
Obr. 31: Závislost doby t_3 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	37
Obr. 32: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	38
Obr. 33: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném kyslíkem	38
Obr. 34: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem	40
Obr. 35: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem	41
Obr. 36: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem	41
Obr. 37: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem	42

Obr. 38: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS nasyceném dusíkem	42
Obr. 39: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3	43
Obr. 40: Závislost doby života t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3	44
Obr. 41: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v PBS obohaceném o NaN_3	45
Obr. 42: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O	46
Obr. 43: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O	47
Obr. 44: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O	47
Obr. 45: Závislost amplitudy na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O	48
Obr. 46: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem	49
Obr. 47: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem	49
Obr. 48: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem	50
Obr. 49: Závislost doby t_3 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem	50
Obr. 50: Závislost amplitudy b na expozici na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem.....	51
Obr. 51: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném kyslíkem	51
Obr. 52: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem	52
Obr. 53: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem	53
Obr. 54: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem	54

Obr. 55: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem	54
Obr. 56: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O nasyceném dusíkem	55
Obr. 57: Kinetika luminiscence na vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3	56
Obr. 58: Závislost doby t_1 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3	56
Obr. 59: Závislost doby t_2 na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3	57
Obr. 60: Závislost amplitudy b na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3	57
Obr. 61: Závislost amplitudy c na expozici ve vzorku liposomálního VP ředěného v D_2O obohaceném o NaN_3	58

Seznam tabulek

Tabulka 1: Pásky ve fluorescenčních spektrech vzorků ředěných PBS..... 30

Tabulka 2: Pásky ve fluorescenčních spektrech vzorků ředěných D₂O..... 31

Seznam použitých zkratek

PDT	fotodynamická terapie
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace
$^1\text{O}_2$	kyslík v singletním stavu
$^3\text{O}_2$	kyslík v základním tripletním stavu
S_0	základní singletní stav
S_1	singletní excitovaný stav
T_1	tripletní stav
ROS	reaktivní forma kyslíku
PS	fotosenzibilizátor
PC	fosfatidylcholin
VP	verteporfin
^3PS	tripletní stav fotosenzibilizátoru
PBS	fosfátový pufr
NaN_3	azid sodný
H_2O	voda
D_2O	těžká voda
DMF	dimethylformamid