

Univerzita v českých Budjovicích

Přirodovědecká fakulta



Reaktivní oxidací částice ve fotodynamické terapii, test produkce hydroxylových radikálů v přítomnosti ftalocyaninových senzitizerů

Bakalářská práce

...a ní částice ve fotodynamické terapii, test produkce
...sti ftalocyaninových senzitizerů . [Reactive oxygen
species in photodynamic therapy, test of hydroxyl radicals production in the presence of
phthalocyanine photosensitizers], 28 stran, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích, Česká republika.

Annotation:

The theoretical part of the bachelor thesis is focused on photodynamic therapy treatment, exp.
on new light sources and second-generation sensitizers, and on the reactive oxygen species
and the methods for their determination and quantification.

In the experimental part, results of hydroxyl radicals photochemical production in the aqueous
solutions of five phthalocyanines are presented.

Prohlášení, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů
a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlášení, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se
zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně
přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích
na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 29.4.2008

Poděkování:

Mé poděkování patří především mému školiteli Doc. RNDr. Mance Klementové, CSc. za
odborné vedení, trpělivost a za náměty a připomínky týkající se této práce.

1. Cíl práce	4
2. Teoretická část.....	5
2.1. Fotosenzitizované oxygenace	5
2.2. Fotodynamická terapie (PDT)	7
2.2.1. Princip fotodynamické terapie	7
2.2.2. Historie fotodynamické terapie.....	8
2.2.3. Senzitizátory pro fotodynamickou terapii	9
2.2.4. Světelné zdroje používané ve fotodynamické terapii.....	11
2.3. Reaktivní formy kyslíku.....	13
2.4. Metody stanovení reaktivních forem kyslíku	15
3. Experimentální část	17
3.1. Materiály a metody	17
3.2. Výsledky.....	20
3.3. Diskuze.....	24
3.4. Závěr experimentální části	25
4. LITERATURA.....	26



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

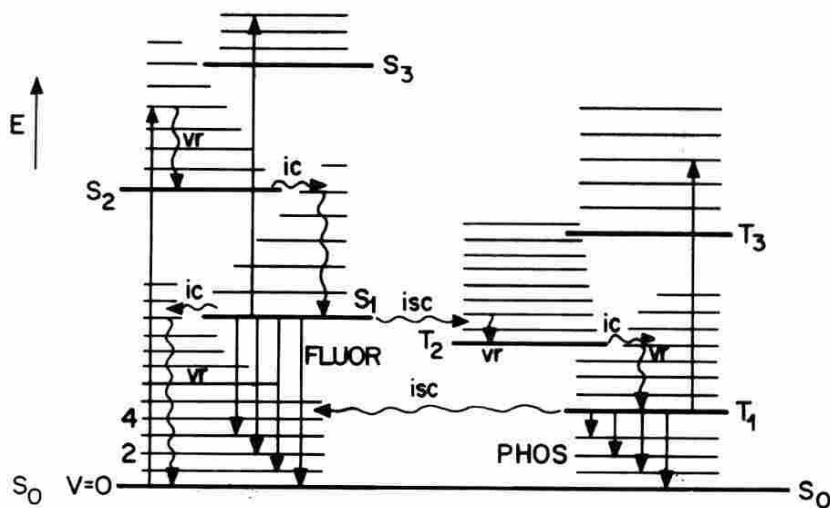
Cílem práce bylo v teoretické části podat pohled souasného stavu fotodynamické terapie a to zejména požívaných zdroj sv tla, senzitivátor a metod použitelných ke stanovení reaktivních oxidací částic.

V experimentální části práce bylo cílem ověřit, zda se při ozarování ftalocyanin nepechodných i nepechodných kov ve vodných roztocích s rozpuštěným kyslíkem mohou tvořit kromě singletového kyslíku též hydroxylové radikály. K tomuto ověření byla vybrána spektrofotometrická metoda stanovení hydroxylových radikál eriothiocyainem.

2.1. Fotosenzitizované oxygenace

Fotochemické reakce jsou v-ěchny reakce zahájené absorpcí zá ení (Wayne 2005a). Mezi fotochemické reakce pat í i reakce fotosenzitizované (Wayne 2005b). Ve fotosyntetizovaných reakcích vystupuje tzv. senzitizer, to je látka, která je schopna energii získanou absorpcí fotonu p edat dal-í látce.

Jednotlivé energetické stavy, kterými senzitizer v pr b hu excitace a deexcitace prochází, jsou znázorn ny na obrázku 1 v tzv. Jablonského diagramu (Grossweiner 2008).



Obr. 1: Jablonského diagram pro optickou excitaci fotosenzitizujících molekul.

Po ozá ení senzitizeru v základním singletovém stavu S_0 dojde k jeho excitaci do n kterého z vy-ích excitovaných singletových stav (S_1 , S_2 , í). Procesem interní konverze (ic) se elektron dostane do prvního excitovaného stavu S_1 . Z tohoto stavu u v t-iny molekul dochází k deexcitaci zp t do základního stavu S_0 . Senzitizery jsou ale látky, které procesem nazvaným mezisystémový p echod (intersystem crossin ó isc) mohou populovat tripletový stav T_1 . P echod ze stavu T_1 do základního stavu S_0 je takzvan spinov zakázaný, proto je doba řivota molekuly v T_1 stavu pom rn dlouhá (ms) a energie excitace m fle být p enesena na jinou molekulu, nap . na molekulu O_2 .

reakcemi jsou senzitivované oxidace. Je-li oxidačním procesem o oxygenaci. Existují dvě možnosti pro tyto senzitivované oxygenací (Gollnick 1968).

Typ I, kdy aktivovaný senzitivátor reaguje přímo s jiným organickým substrátem za přenosu vodíku nebo elektronu a vzniká radikál, který dále reaguje s kyslíkem za vzniku oxidované formy substrátu. Pro tyto senzitivované oxygenace typu I ukazují schematicky rovnice 1 a 2.



Typ II, kdy senzitivátor v tripletovém stavu nejprve reaguje s kyslíkem, nejprve za přenosu energie, čímž vzniká jeho excitovaná forma kyslíku nazývaná singletový kyslík. Ten může dále reagovat s chemickým substrátem v singletovém stavu, výsledkem je oxidovaná forma substrátu. Schéma reakčního mechanismu typu II je znázorněno rovnicemi 3 a 4.



V reakcích typu I, tedy excitovaná forma senzitivátoru reaguje se substrátem za vzniku radikálu substrátu. Reakce typu II produkuje singletový kyslík, který je asi 1000x reaktivnější než základní tripletový stav molekuly O_2 .

Významnou vlastností barviv se senzitivujícími účinky je jejich fluorescence. Excitovaný stav S_1 , který se uplatňuje při fluorescenci, nemá pro fotodynamický účinek význam z důvodu krátké doby trvání (10^{-9} s). Fotodynamicky aktivní jsou sloučeniny, jež mohou tvořit excitované stavy s dlouhou dobou trvání (10^{-6} s) tzv. tripletové stavy, vznikající vnitřním přechodem ze svých excitovaných singletových stavů (Dougherty et al., 1998, Ackroyd et al., 2001, Daniell 1991).

(PDT)

terapie

V současné době jsou intenzivně studovány nové možnosti fotochemoterapie nádorových onemocnění. Fotodynamická terapie (Photodynamic therapy, PDT) je vedle chirurgie, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie další možností léby nádorového onemocnění. Jedná se o fotochemoterapii, která představuje kombinované použití fotodynamicky aktivní látky (fotosensitizeru) a svítidla za přítomnosti kyslíku. Princip léby nádoru je založen na vnitřním podání sensitizeru s následným ozáření UV-A (tab. I) nebo viditelným světlem. Fotosensitizující látka se po určité době selektivně kumuluje v nádoru a poté následuje ozáření světlem o vhodných vlnových délkách shodných s absorpčním maximem fotosensitizeru. Po absorpci světla dochází ve fotosensitizeru ke vzniku excitovaných stavů a k přenosu energie na kyslík za vzniku singletového kyslíku, který může reagovat s membránovými lipidy a proteiny za vzniku oxidovaných produktů, což se projevuje cytolyzou a destrukcí nádoru. (Juzeniene et al., 2007). Excitovaná forma fotosensitizeru může též reagovat přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu. Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou probíhat při PDT současně, avšak jejich relativní podíl na destrukci nádoru závisí na typu a koncentraci fotosensitizeru, na koncentraci kyslíku v nádoru a na vazbě fotosensitizeru na substrát. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk.

oblast UV záření	vlnová délka (nm)
UV-A	315 ó 400
UV-B	280 ó 315
UV-C	100 ó 280

Tab. I.: Rozdělení UV záření.

terapie

Velké terapie lze najít například v Ackroyd 2001, Dougherty 1998. Název "Fotodynamický efekt" byl zaveden na počátku 20. století O. Raabem (Raab O., 1900), který prováděl pokusy na kulturách paramecií v kombinaci s barvivem akridinem a pozoroval změny v ozařování světlem. H. von Tappeiner prokázal závislost těchto procesů na kyslíku a již v r. 1903 publikoval první klinické zkušenosti s užitím eosinu a světla v léčbě kožních nádorů, lupus vulgaris. Ve čtyřicátých letech Blum navrhl, že definice PDT by měla být aplikovaná jen na fotochemické reakce, ve kterých byl kyslík spotřebován. Tyto reakce jsou podle povahy prvních kroků také nazývány fotosenzitizované procesy typu I a typu II.

Další období PDT začalo studií Lipsona a Baldese (Lipson a Baldes, 1961) na Mayo Clinic v roce 1960, kde pozorovali po předchozím podání hematoporphyrinu zviditelněné neoplastické léze během operace. Schwarz a Cohen (Schwarz et al., 1966) upravili hematoporphyrin kyselinou octovou a sírovou. Získal porfyrinovou směs, kterou označil jako hematoporphyrinové deriváty (HpD), jež pak byly použity pro detekci tumoru.

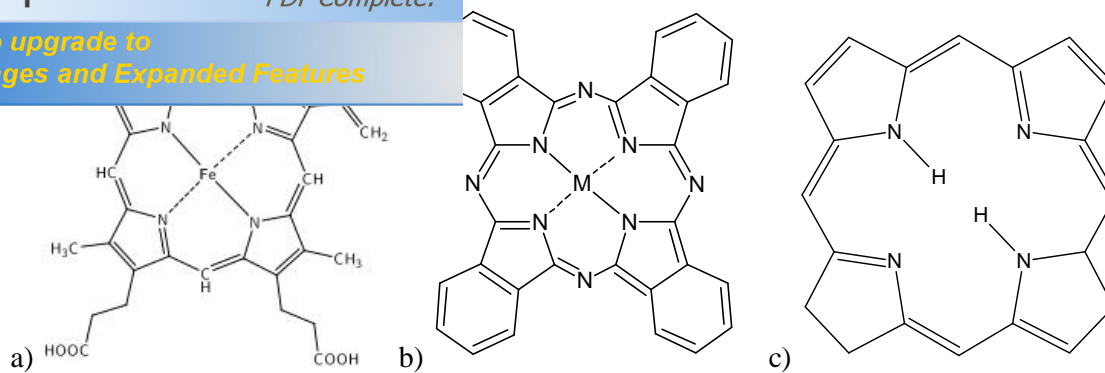
Významným mezníkem ve fotodynamické terapii byla polovina 70. let, kdy Dougherty se spolupracovníky podal zprávu o úspěšném vyléčení tumoru pomocí hematoporphyrinu a světla u myši a zároveň byly provedeny první studie na lidských pacientech. (Kelly et al., 1975).

V roce 1978 ufl Dougherty popsal úspěšnou léčbu u velké série 113 pacientů.

Další vývoj se pak ubíral směrem k vývoji a testování nových typů senzitizerů s vhodnými vlastnostmi pro fotodynamickou terapii, ftalocyanin a chlorin, viz obr. 2.

V 90. letech se pak začala užívat endogenní senzitizerace, která je založena na podání 5-aminolevulové kyseliny (ALA), jež je přirozeným meziproduktem biosyntézy protoporphyrinu IX. (Kennedy et al., 1992), což je tělu vlastní sloučenina s fotosenzitizačními účinky.

Využití fotodynamické terapie se rozšiřuje na další a další nemoci, mezi typické aplikace patří léze kůže, adenokarcinom prsu, bradavice na rukách a chodidlech, akné, tumory fluktuální a některé tumory v plicní tkáni, tumor hlasivek a dokonce glioblastomy. (Ackroyd, 2001).



Obr. 2: Obecné vzorce: a) hemaporphyrinu, b) ftalocyaninu, c) chlorinu.

2.2.3. Senzitizátory pro fotodynamickou terapii

Fotosenzitizátor pro PDT musí splňovat následující požadavky:

- nesmí být toxický
- musí být dostatečně ve vodě rozpustný
- musí silně absorbovat v červené oblasti viditelného spektra (záření těchto vlnových délek proniká hluboko do živé tkáně)
- musí být rychle odstraněn ze zdravé tkáně

První generace fotosenzitizátorů (HpD, Photofrin), které se používaly v klinické praxi, měly z hlediska uvedených podmínek mnoho nevýhod. Nešlo o jednoznačně definované sloučeniny, ale směsi monomerů a oligomerů proměnlivého složení. Uvedené sloučeniny mají maximum absorpce u 630 nm, kde penetrace do tkáně je omezena na maximálně několik milimetrů. Molární absorpční koeficient je nízký. Vyloučení z organismu je pomalé, takže fotocitlivost může přetrvávat po dobu 6 až 8 týdnů.

Druhá generace fotosenzitizátorů je tvořena zejména ftalocyaniny a chloriny (obr.2), ale zkoušely se i sloučeniny patřící k dalším skupinám například porphyceny, pheophorbidy, benzoporphyriny, purpuriny, texaphyriny, bakteriochloriny. Tyto látky lze získat jako chemicky čistá individua. Jejich absorpční maxima leží v oblasti od 650 do 850 nm. Jsou relativně rychle vyloučeny i odbourávány, takže fotocitlivost trvá krátkou dobu (dny). V neposlední řadě jsou mnohé velmi efektivními producenty singletového kyslíku. Senzitizátory první a druhé generace pro klinické použití jsou uvedeny v tabulce II.

mluví o t etí generaci fotosenzitizátor . Jsou to vlastn
jsou ale vázáné na speciální nosi e pro selektivní
akumulaci v tumoru (Juzeniene et al. 2007, Chang 2005, Ackroyd et al. 2001).

Ftalocyaniny ó senzitzátory, s nimi fl byly provád ny experimenty v této práci - jsou slou eniny, které mají strukturu podobnou hematoporfyrin m (HpD), ale místo ty pyrolových jednotek vázaných navzájem methinovými m stky, jsou v nich ty i isoindolové jednotky vázané p es atomy dusíku. (obr. 2). Ftalocyaniny jsou barevné slou eniny, které na-ly široké vyu flití v medicínské praxi. Tyto slou eniny absorbují zá ení del-ích vlnových délek nefl porfyriny (jejich absorp ní maxima le flí v oblasti kolem 680 nm), což je výhodné pro pou flití ve fotodynamické terapii, protože zá ení del-ích vlnových délek v červené oblasti spektra proniká hloub ji do flivo i-ných tkání a tím je možné ozá it podpovrchové tumory ve v t-í hloubce i v t-í velikosti. Výhodou v t-iny ftalocyanin je také jejich relativn velká stabilita p i oza ování. Ftalocyaniny spl ují i dal-í pofladavky na senzitzátory pro PDT kladené, tedy nejsou toxické a jsou pom rn dob e rozpustné ve vod . Vý et senzitzátor , které jifl byly schváleny pro klinické pou flití ve fotodynamické terapii, je v tabulce II.

Chemikálie	Obchodní název	Indikace
HpD, porfimer sodný	Photofrin	mo ový m chý , žaludek, jícn, plíce a pr duzky
monoacid A, verteporfirin	Visudyne	na v ku závislá skvrnitá degenerace
m-THPC, temoporfin	Foscan	nádory krku a hlavy
5-Aminolevulinonová kyselina (ALA)	Levulan	keratóza
Methyl aminolevulinát (MAL)	Metvix	karcinom
Hexil aminolevulinát (HAL)	Hexvix	mo ový m chý

Tab. II.: Schválené léky pro klinické pou ití v PDT.

závislé ve fotodynamické terapii

závislá na optických vlastnostech tkáně a dávkách sv. tla.

Proto je stanovena optická penetrační hloubka (OPD), která je definovaná jako hloubka, při které je intenzita sv. tla snížena přibližně na 37% jeho počáteční hodnoty. Na příklad OPD mozkové tkáně při 635 nm je 800 μm, zatímco u močového měchýře je 4 mm. Podle typu tkáně sv. tlo v oblasti 600–700 nm spektra má o 50–200% větší optickou penetrační hloubku než sv. tlo v oblasti 400–500 nm (Brancaleon et al., 2002).

V PDT jsou používány dva druhy zdrojů sv. tla: lasery a nekoherentní zdroje. Lasery produkují vysoce intenzivní, koherentní a monochromatické sv. tlo. Typy laserů používaných při PDT jsou uvedeny v tab. III. Toto sv. tlo může být vedeno přes optická vlákna a přímo osvícuje cílovou tkáň. Lasery emitují sv. tlo spojitou vlnou nebo pulsem, kdy je puls veden několik fs. To předpokládá, že vysoce-intenzivní puls sv. tla by mohl penetrovat do tkáně hlouběji než spojitá vlna, způsobující přechodní snížení absorpce chromoforu v tkáni. Výhodou použití laserů a optických vláken je, že mohou být použita pro jinak nepřístupná místa jako je močový měchýř, plíce anebo trávicí soustavu (Brancaleon et al., 2002).

Typ laseru	vlnová délka (nm)	vlnový rozsah (nm)	intenzita ozaření	dávka záření	pulsní doba
argonový laser	488 a 514,5	monochromatické	0.5 - 1 W/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	Kontinuální záření
barvivoý laser pumpovaný argonovým laserem	500 - 750 (závislé na barvě)	5 - 10	10 - 200 mW/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	Kontinuální záření
laser s parami kov	UV nebo viditelné sv. tlo	monochromatické	nad 10 W/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	10 - 50 ns
Barvivoý laser pumpovaný laserem s parami kov	500 - 750 (závislé na barvě)	5 - 10	10 - 500 mW/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	10 - 50 ns
Nd:Yag	1064,532,355,266	monochromatické	nad 10 W/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	10 ps - 30 ns
Barvivoý laser pumpovaný laserem Nd:Yag	400-750 (závislé na barvě)	5 - 10	10 - 500 mW/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	10 ps - 30 ns
optická pevná fáze parametrického oscilátoru	250 - 2000	monochromatické	nad 1 W/cm ²	přímo nebo optickým vláknem	10 ps - 30 ns
polovodičové diodové lasery	600 - 950	monochromatické	nad 700 mW/cm ²	optické vlákno	Kontinuální záření

Tab. III.: Typy laserů dostupné pro klinickou PDT.

Nelaserové zdroje (lampy) jsou nejvíce používány v dermatologii. Mají větší osvětlovací plochu, nižší cenu, malou velikost a jednoduchou konstrukci. Typy lamp používaných při PDT jsou uvedeny v tabulce IV. Nevýhodou lamp je, že v části energie se

spektrum se obtífn ji kvantifikuje pomocí dozimetrie (al., 2001).

Typ zdroj	vlnová délka (nm)	vlnový rozsah (nm)	intenzita ozá ení
wolframové vlákno	400 - 1100	10 - 100 v závislosti na pou0itém fitru	typické nad 1.8 mW/cm ² /nm
xenonová výbojka	300 - 1200	10 - 100 v závislosti na pou0itém fitru	typické nad 3 mW/cm ² /nm
halogenidová výbojka	250 - 730	10 - 100 v závislosti na pou0itém fitru	typické 1.2 mW/cm ² /nm
sodíková výbojka	590 - 670	10 - 80 v závislosti na pou0itém fitru	nad 100 mW/cm ²
fluorescen ní Óárovka	400 - 450	p iblí0n 30	nad 10 mW/cm ²
Laser s prac. látkou v pevné fázi pro dva fotony	infra ervené	monochromatické	1 W v p iblífném objemu 5 ó 10 μm^3
LED	viditelného a infra erveného sv tla	5 ó 10	nad 150 mW/cm ²

Tab. IV.: Typy zdroj sv tla dostupné pro klinickou PDT.

Obrázek 3 ukazuje provedení terapie pro omezené podkofní lofisko s využitím halogenidové výbojky Waldmann PDT 1200 (Brancaleon L., et al., 2002).



Obr. 3: Halogenidová výbojka (Waldmann PDT 1200).

ěální pro každou možnou indikaci pro PDT, ani s tím
světelného zdroje je založena na absorpci použitého
fotosenzitizátoru, na typu onemocnění. Požadavky, které jsou kladeny na zdroje světla pro
PDT zahrnují kromě spektrálních vlastností též spolehlivost, jednoduchou údržbu, velikost a
cenu (Brancaleon et al., 2002, Ackroyd et al., 2001).

2.3. Reaktivní formy kyslíku

Termín "reaktivní formy kyslíku" (reactive oxygen species - ROS) označuje poměrně širokou skupinu částic, z nichž některé vznikají v lidském těle, jiné nikoli, všechny se ale vyznačují silnými oxidačními účinky a tím druhotně i často velmi neřádnými účinky na živé organismy.

Mnohé reaktivní formy kyslíku jsou radikály, například superoxidový anion nebo superoxid O_2^- , hydroxylový radikál HO^\cdot , peroxylové radikály ROO^\cdot , alkoxy radikály RO^\cdot , hydroperoxylový radikál HO_2^\cdot . K reaktivním formám kyslíku, které nemají povahu radikálů, patří peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná $HClO$, ozón O_3 a singletový kyslík 1O_2 (Zima et al. 1996).

Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku (dikyslík, dioxygen) se redukuje na monoradikální superoxid:



Další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



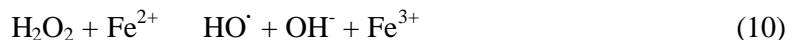
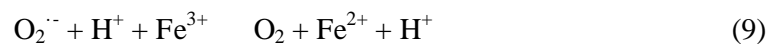
Jsou-li k dispozici další 2 elektrony, dvouatomová molekula peroxidu vodíku se rozpadá na vodu (v rovnici je uvedena její disociovaná forma, tedy hydroxidový ion OH^-) a hydroxylový radikál HO^\cdot (ten má o jeden elektron méně než hydroxidový ion OH^-):



Popsaná čtyřelektronová redukce molekuly atmosférického kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života. Probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií,

peroxidu a umohl uje známou transformaci energie
trifosfátu (ATP), což je univerzální forma energie pro
biochemické procesy organismu. Ani neaktivní forma kyslíku (hydroxylový radikál HO[•])
není ve vazbě s enzymem kódní. Volná částice je vysoce reaktivní látkou, ve tkáni
interaguje s jakoukoli sousední molekulou nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji.
(Třípek S. et al., 2000).

Hlavním zdrojem HO[•] radikál v organismu je reakce peroxidu a superoxidu
v přítomnosti feleza, která probíhá ve dvou krocích. Nejdříve superoxid zredukuje felezité
ionty na feleznaté a ty pak redukuje peroxid.



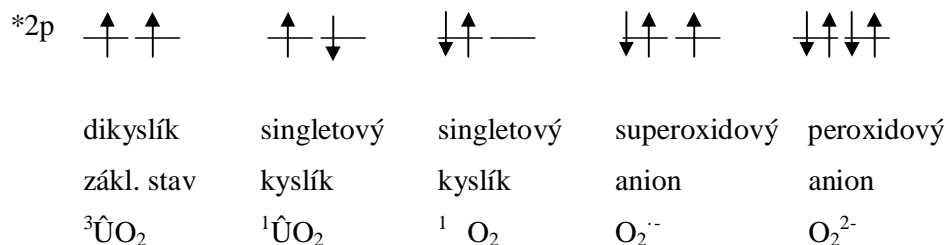
Poslední reakce se označuje jako felezem katalyzovaná Haberova-Weissova nebo spíše jako
Fentonova reakce.

Singletový kyslík je excitovaný stav molekulárního kyslíku O₂, označujeme jej ¹O₂.
Jak ukazuje obr. 4, molekulární kyslík v základním stavu má dva elektrony v ^{*}2p orbitalech
s paralelními spiny, kdežto singletový kyslík má tyto dva elektrony spinov spárované, tj.
s antiparalelními spiny. Singletový kyslík vzniká reakcí s ³O₂ nebo ¹O₂ vystaven
záření nebo vyel z chemické reakce a získal s tím energii, která excitovala jeden
z nespárovaných elektronů tak, že došlo ke změně jeho spinu.



Singletový kyslík může existovat ve dvou formách ličících se navzájem excitací energií: bu
je dvojice elektronů v jednom orbitalu ^{*}2p a druhý orbital je prázdný nebo je každý
z elektronů v samotném orbitalu ^{*}2p. Singletový kyslík je velice reaktivní, ve chvíli po
kterou existuje, se slučuje například s nenasycenými mastnými kyselinami na lipidové
peroxydy. V lidském těle singletový kyslík vzniká po absorpci světla některými pigmenty
(fotosenzitizace porfyrin) nebo při spontánní neenzymové dismutaci superoxidu.

Reaktivní oxidací částice vytvořené v organismu způsobují oxidativní poškození
biomolekul jako DNA, protein, lipid, toto poškození může iniciovat kardiovaskulární
onemocnění, nádory, aj.



Obr. 4: Rozložení elektronů v molekulárních orbitálech *2p u dvouatomových kyslíkových částic (upraveno podle Týpek S. et al., 2000).

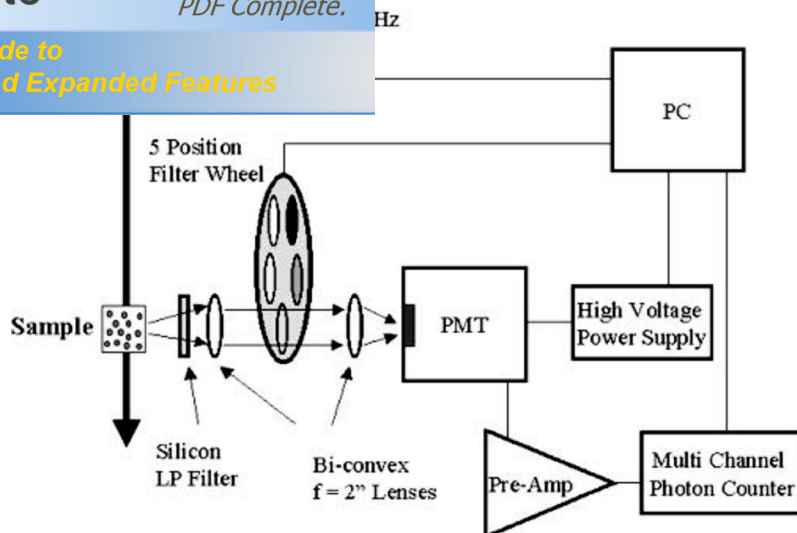
2.4. Metody stanovení reaktivních forem kyslíku

Pro detekci a stanovení oxidativních částic jsou používány chemické metody založené na reakcích jednotlivých oxidativních částic se selektivními lapacími činidly. Přehled některých používaných metod lze najít v práci Klementové a Wágnerové 1990 nebo v práci Molota et al. 2003.

Tak například pro stanovení singletového kyslíku se používají jako specifické lapací činidla dimethylfuran nebo furfurylalkohol, pro hydroxylové radikály byly použity jako lapací činidla kumen, benzen, butylchlorid, eriochlorin.

Všechny tyto metody jsou založeny na měření buď úbytku lapacího činidla nebo množství konečných oxidativních produktů biomolekul s využitím technik jako například vysokou tlakovou kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (GC-MC), spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV, VIS) a biochemických nebo chemických analýz (Wenli Y., 2005).

Pro detekci 1O_2 v biologických vzorcích například PDT se v posledních několika letech testuje měření vlastní luminiscence 1O_2 při 1270 nm (Niedre et al. 2003 a Niedre et al. 2005). Schéma aparatury ukazuje obrázek 5 převzatý z práce Niedre et al. (2003). Tato metoda detekce 1O_2 patří k tzv. "přímé dozimetrii" v PDT umožňující měřit množství 1O_2 v průběhu zákroku.



Obr. 5: Schéma experimentálního zařízení použité pro měření luminescence $^1\text{O}_2$ *in vitro* (Niedre et al. 2003).

Při měření vyuffívajícího luminescence singletového kyslíku je vzorek (Sample) ozařován laserem vhodné vlnové délky (z hlediska senzitivované tvorby $^1\text{O}_2$) a v tomto případě laserem z krystalu fluoridu yttria a lantanu dopovaného ionty neodymu (Laser). V místě vzorku je kolmo k procházejícímu laserovému paprsku umístěna soustava k filtraci a fokusaci luminescenčního záření (Silicon LP Filter, Bi-convex Lenses). Jako detektor je použit fotonásobič (PMT = proton multiplying tube) se zesilovačem (Pre-Amp) a multikanálový počítač (Multi Channel Photon Counter).

3.1. Materiály a metody

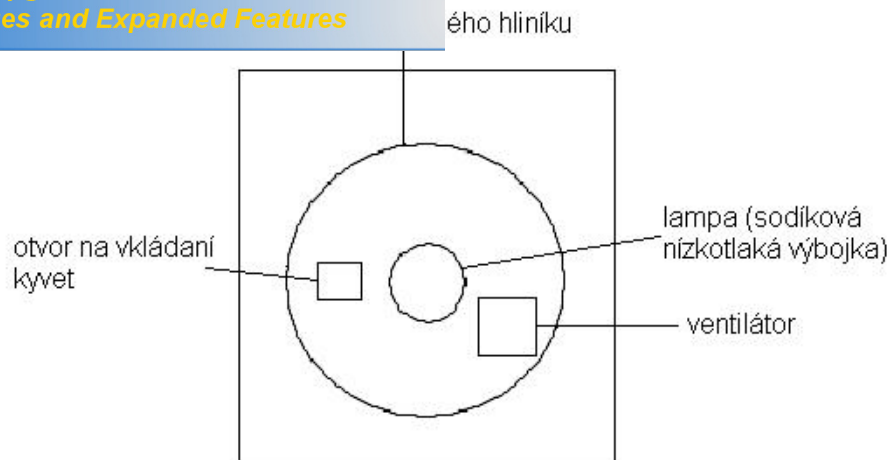
Bylo použito pět senzitivizátorů, a to ftalocyanin disulfochlorohlinitý (AlClPcS₂), ftalocyanin trisulfozine natý (ZnPcS₃), ftalocyanin tetrasulfokobaltnatý (TSPCo), ftalocyanin tetrasulfofeleztý (TSPFe), ftalocyanin tetrasulfonikelnatý (TSPNi), všechny látky byly poskytnuty Ústavem anorganické chemie AV ČR, Praha. Erioglaucin byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich.

K přípravě roztoků byla použita ultra čistá voda, která byla vyrobena v zařízení Milli-Q, Millipore Waters.

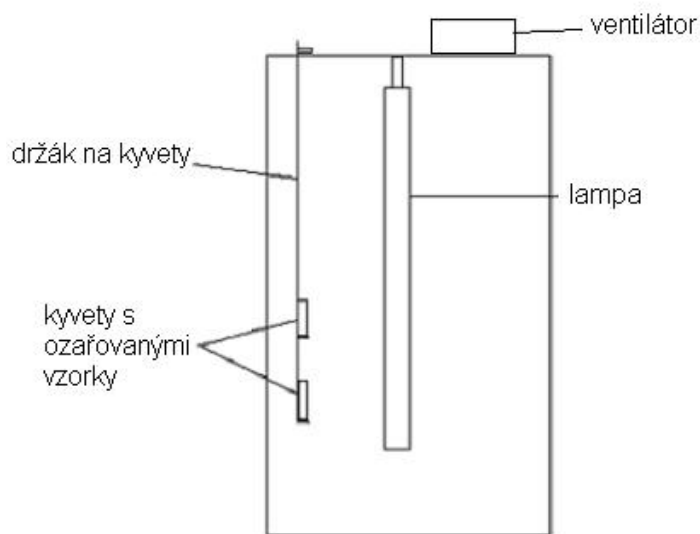
Pro přípravu zásobních roztoků ftalocyaninů o koncentraci cca 10⁻³ mol.dm⁻³ byly naváženy jednotlivé vzorky na analytických vahách v rozmezí 0,0029 až 0,0038 g, dále byly navážky naedány 3 ml ultra čisté vody. Zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě při pokojové teplotě. Zásobní roztok erioglaucinu byl připraven rozpouštěním 10,5 mg v 1 litru vody o koncentraci $c = 1,26 \cdot 10^{-3}$.

Absorpční a diferenční spektra ftalocyaninů byla měřena na dvoupráskovém spektrofotometru Shimadzu UV-1601 řízené počítačem pomocí softwaru UV-Probe.

Ozařování bylo prováděno ve fotochemickém reaktoru s nízkotlakou sodíkovou výbojkou jako zdrojem záření dichromatického světla o vlnových délkách ($\lambda = 589$ nm, $\lambda = 589,6$ nm). Přehled aparatury a uspořádání při ozařování ukazuje obrázek 6.

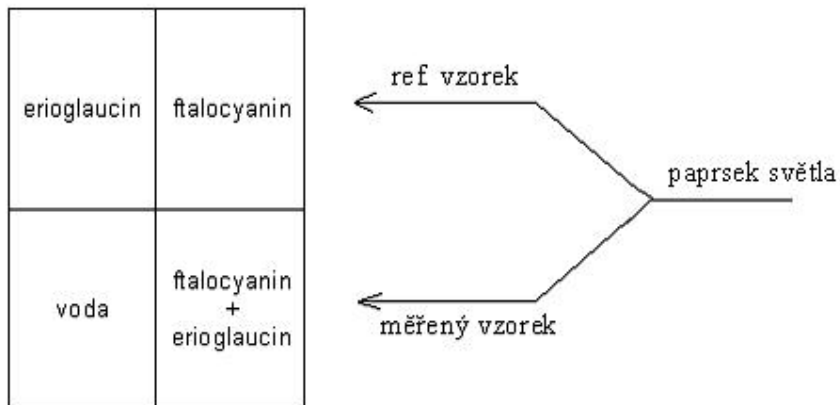


b)



Obr.6: Schéma fotochemického reaktoru: a) ó pohled shora-horizontální pr ez aparaturou
b) ó pohled z boku-vertikální pr ez aparaturou.

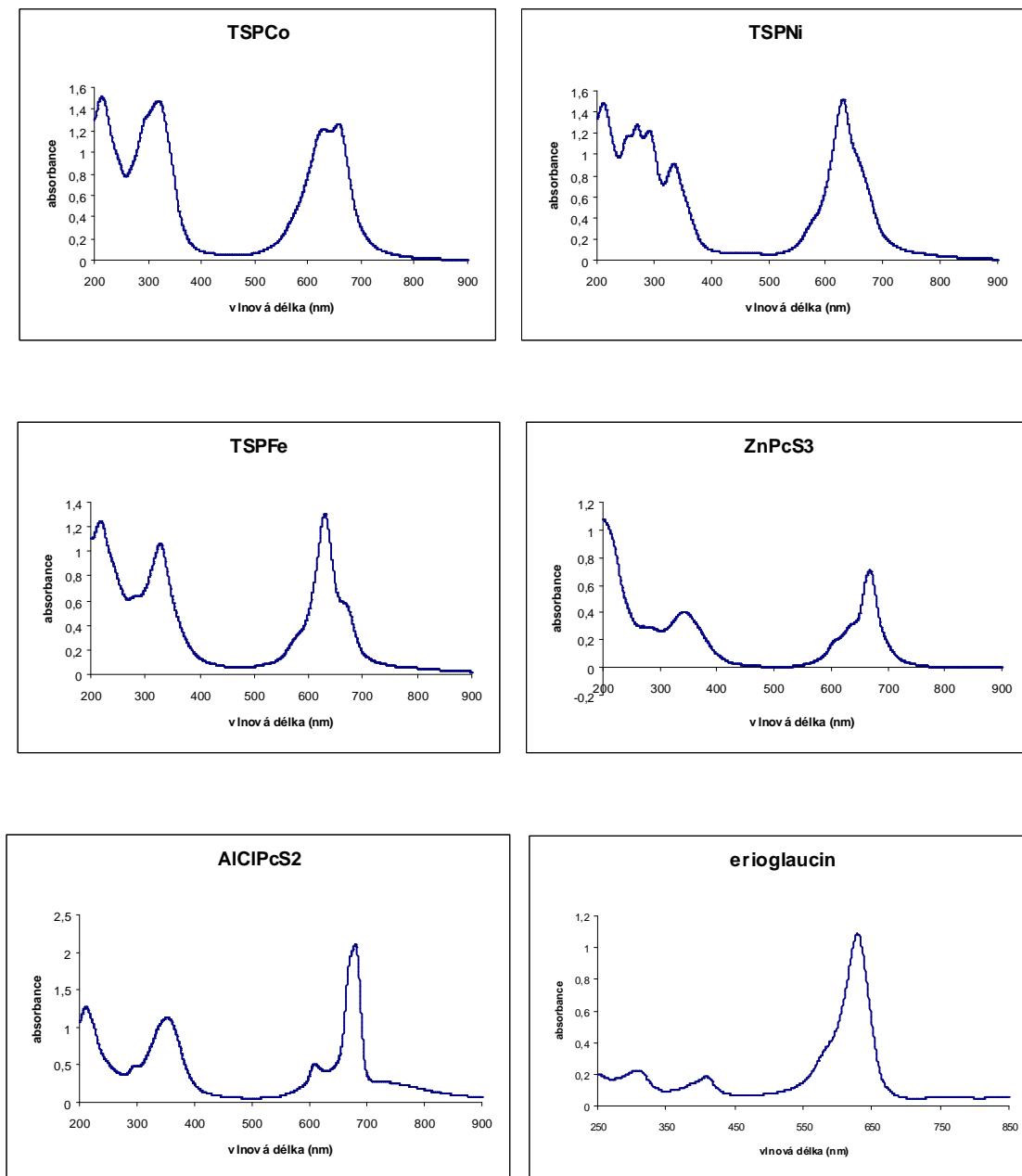
byly použity 4 k emenné kyvety. Uspo ádaní kyvet



Obr.7: Schéma uspo ádaní vzork v kyvetách p i m ení diferen ních spekter.

V kyvetách umíst ných jako referen ní (slepý) vzorek, byl erioglaucin a ftalocyanin v odd lených kyvetách, takže sv tlo pohlcovaly na sob nezávisle. V kyvetách umíst ných jako m ený vzorek byl erioglaucin p idán k roztoku ftalocyaninu , takže v p ípad interakce a z ní vyplívající zm ny ve spektru by se signál m eného vzorku li-il od signálu vzorku referen ního. Kyveta s vodou je za azena pro dosažení stejného po tu optických rozhraní a stejné optické vrstvy rozpou-t dla.

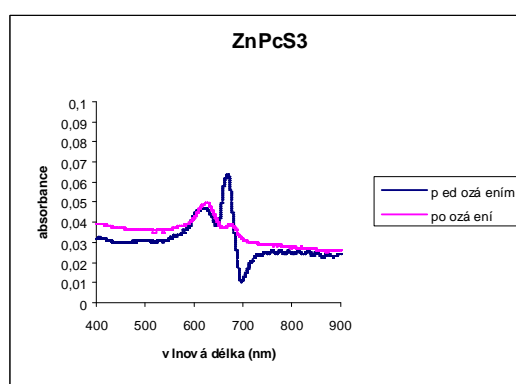
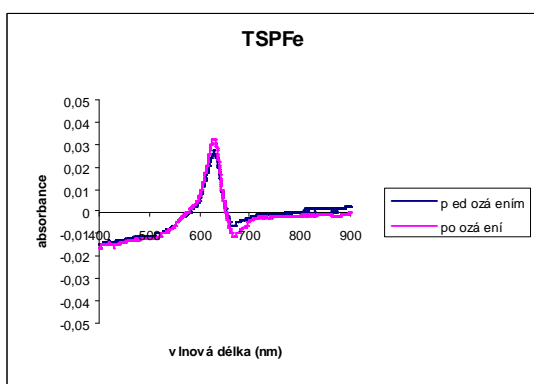
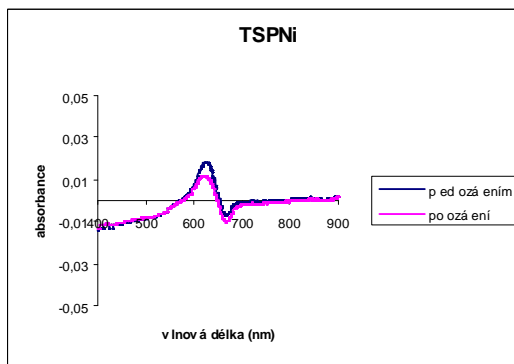
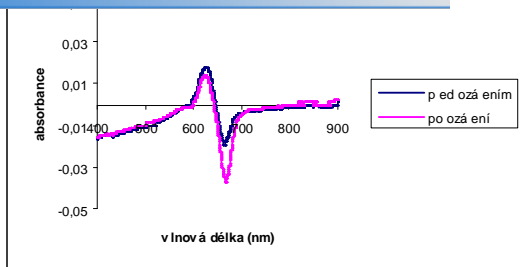
iny byla změna absorpční spektra v oblasti vlnových délek 200 ó 900 nm a pro erioglaucin v oblasti 250 ó 850 nm. Všechny grafy jsou znázorněny na obrázku 8.



Obr. 8: Absorpční spektra jednotlivých ftalocyanin a erioglaucinu o koncentracích : TSPCo ó $0,95 \cdot 10^{-3}$ mol/l, TSPNi ó $1,27 \cdot 10^{-3}$ mol/l, TSPFe ó $1,01 \cdot 10^{-3}$ mol/l, ZnPcS₃ ó $1,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l, AICIPcS₂ - $1,03 \cdot 10^{-3}$ mol/l, erioglaucin ó $1,26 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

ty ftalocyaniny vykazují absorpci jednak v UV oblasti u vlnových délek 300 ó 350 nm a jednak ve viditelné oblasti u vlnových délek v rozmezí 600 - 700 nm. Erioglucin má dvě nevýrazná maxima v UV oblasti ($\lambda = 308$ nm, $\lambda = 409$ nm) a výrazné maximum ve viditelné oblasti 630 nm.

Pro každý ftalocyanin bylo změřeno diferenční spektrum dle uspořádání v obrázku 7. Obrázek 9 ukazuje naměřená diferenční spektra pro jednotlivé ftalocyaniny. Ve všech případech bylo získáno nenulové diferenční spektrum, které svědčí o tom, že jednotlivé ftalocyaniny interagují s erioglucinem, pokud jsou společně v jednom roztoku.



Obr. 9: Diferenční spektra ftalocyaninů před ozářením a po 60 minutách ozáření.

diferenční spektrum jíl p ed ozá ením negativní maximum p i 630 nm. Tento typ diferenčního spektra vznikne p i posunu maxima absorpce ke kratším vlnovým délkám v d sledku interakce molekul p ítomných v roztoku (tj. ftalocyanin + eriglaucin).

TSPNi má v diferenčním spektru p ed ozá ením negativní maximum p i 668 nm a pozitivní maximum p i 630 nm. I tento typ diferenčního spektra vznikne p i posunu maxima absorpce ke kratším vlnovým délkám v d sledku interakce molekul p ítomných v roztoku (tj. ftalocyanin + eriglaucin).

TSPFe vykazuje v diferenčním spektru p ed ozá ením negativní maximum p i 666 nm a pozitivní maximum p i 628 nm. Toto diferenční spektrum vznikne p i posunu maxima absorpce ke kratším vlnovým délkám v d sledku interakce molekul p ítomných v roztoku (tj. ftalocyanin + eriglaucin).

ZnPcS₃ má v diferenčním spektru p ed ozá ením negativní maximum v 696,5 nm a první pozitivní maximum v 668 nm. (Tento typ diferenčního spektra vznikne p i posunu maxima absorpce ke kratším vlnovým délkám v d sledku interakce molekul p ítomných v roztoku) a druhé pozitivní maximum v 620 nm, které vzniklo zvýšením maxima absorpce.

AlCIPcS₂ vykazuje v diferenčním spektru p ed ozá ením první pozitivní maximum p i 785 nm, druhé pozitivní maximum p i 680 nm a t etí pozitivní maximum p i 630 nm. Tento typ diferenčního spektra vznikne p i zvýení maxim absorpce v d sledku interakce molekul p ítomných v roztoku.

Ozá ení vzorku TSPCo m lo za následek vzr st absorbance v negativním maximu, k emufl dojde, jestliffe v pr b hu v pr b hu oza ování vznikl produkt s vyším molárním absorp ním koeficientem. U 630 nm (v maximu erioglaucinu) do-lo k nepatrnému poklesu absorbance.

Ozá ení vzorku TSPNi zp sobilo vzr st absorbance v negativním maximu, k emufl dojde, jestliffe v pr b hu v pr b hu oza ování vznikl produkt s vyším molárním absorp ním koeficientem. U 630 nm (v maximu erioglaucinu) do-lo k nepatrnému poklesu absorbance.

Ozá ení vzorku TSPFe m lo za následek vzr st absorbance v negativním maximu, k emufl dojde, jestliffe v pr b hu v pr b hu oza ování vznikl produkt s vyším molárním absorp ním koeficientem. U 630 nm (v maximu erioglaucinu) do-lo k nepatrnému zvýení absorbance.

o ilu první pozitivní maximum p i 680 nm a druhé
lo-lo k nepatrnému zvý-ení absorbance.

Po ozá ení AICIPcS₂ se objeví negativní maximum p i 740 nm a intenzivní pozitivní maximum p i 679 nm . Maximum p i 630 nm z stává nezm n no.

3.3. Diskuze


Erioglaucin (podle Molota) je vyzkou-eným inidlem ke stanovení [•]OH radikál spektrometrickou metodou ó v p ítomnosti [•]OH radikál dochází k odbourávání eriglaucinu a tím ke sniflování absorbance v absorp ním maximu eriglaucinu u 630 nm. Jde tedy o extrémn výhodnou jednoduchou metodu. Tato metoda byla zatím pouflita pro detekci vzniku [•]OH radikál v p írodních vodách a k hodnocení extracelulární tvorby [•]OH radikál v kultu e asových bun k (Molot et al., 2003).

Protofle u ftalocyanin se mluví prakticky výlu n o fotosenzitizované produkci singletového kyslíku, nicmén v pracích o fotodynamickém efektu se uvádí, fle na destruk ní fotoinicované oxidace se pravd podobn ú astní i dal-í reaktivní kyslíkové ástice. Rozhodl jsem se vyzkou-et, zda ve vodném roztoku s rozpu-t ným kyslíkem bude mofné pomocí eriglaucinu detekovat vznik [•]OH radikál .

Oproti p vodnímu o ekávání, fle diferen ní spektrum p ed ozá ením bude nulové, se ukázalo, fle v-echny ftalocyaniny interagují v roztoku s eriglaucinem (pravd podobn tvo í addukt v d sledku hydrofobních interakcí).

Vlivem ozá ení do-lo ve v-ech p ípadech ke zm n diferen ního spektra, cofl zna í, fle v systému prob hly je-t jiné fotoinicované reakce nefl jen fotodegradace ftalocyaninu (oza ován byl nejen roztok ftalocyaninu s eriglaucinem, ale vfdy po stejnou dobu sou asn za týchfl podmínek i roztok samotného ftalocyaninu, aby vlastní degradace ftalocyaninu byla v diferen ním spektru kompenzována.

V p ípad ftalocyaninu tetrasulfonikelnatého a ftalocyaninu tertasulfokobaltnatého do-lo ke zm n v diferen ním spektru, která m fle být interpretována jako pokles koncentrace eriglaucinu v roztoku ó vzr st pozitivního maxima u 630 nm. Interpretace ale není jednozna ná, nebo stejné diferen ní spektrum by vzniklo v p ípad fotoinicovaného vzniku produktu, který by m l výrazn vy-í molární absorp ní koeficient a k vy-ím vlnovým délkám posunuté absorp ní maximum.



PDF Complete

*Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

části

Oza ováním ftalocyaninu disulfochlorohlinitého, ftalocyaninu trisulfozine natého, ftalocyaninu tetrasulfofelezitého se v roztocích $\cdot\text{OH}$ radikály netvoří.

Oza ování ftalocyaninu tetrasulfonikelnatého a ftalocyaninu tetrasulfokobaltnatého se projevuje změnou v diferenčním spektru, která může být způsobena vznikem $\cdot\text{OH}$ radikálů.

Ackroyd Roger, Kelty Clive, Brown Nicola, Reed Malcolm (2001): The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **74**(5), 656 ó 696.

Brancaleon L. , Moseley H. (2002): Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.*, **17**,173ó186.

Daniell M. D. and Hill J. S. (1991): A history of photodynamic therapy, *Aust. N. Z. J. Surg.*, **61**, 340 ó 348.

Dougherty Thomas J., Gomer Charles J., Henderson Barbara W., Jori Giulio, Kessel David, Korbelik Mladen, Moan Johan, Peng Qian (1998): Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, No. 12.

Gollnick K. (1968): Type II Photooxygenation reaction in solution. *Adv. Photochem.*, **6**, 1 ó 9

Grossweiner Leonard I. , Singlet Oxygen: Generation and Properties. Dostupne z URL:
<http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html> [cit. 3.3.08]

Chang Raymond (2005): Physical chemistry for the biosciences. University science books, Sausalito, USA, str. 591 ó 594.

Juzeniene Asta, Peng Qian and Moan Johan (2007): Milestone in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **6**, 1234-1245.

Kennedy J.C., Pottier R.H. (1992): New trends in photobiology endogenous protoporphyrin IX, a clinical usefel photosenzitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **14**(4), 275 ó 292.

Kelly J.F., Snell M.E., Berenbaum M.C. (1975): Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer*, **31**, 237 ó 244.*

(1990): Fotoiniciované oxida ní reakce v p írodních

Lipson R.L., Baldes E.J. (1961): Haematoporphyrin derivate: A new aid for endoscopic detection of malignant diseases. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **42**, 623 ó 629.

Molot L. A., Miller S. A., Diplom P.J., Trick C.G. (2003): A simple method for assaying extracellular hydroxyl activity and its application to natural and synthetic waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **60**, 203 ó 213.

Niedre M.J., Secord A.J., Patterson, Wilson B.C. (2003): In vitro test of singlet oxygen luminiscence measurements as a dose in photodynamic therapy, *Cancer Res.*, **63**, 7986 ó 7994.

Niedre M.J., Yu C.S. Patterson M.S., Wilson B.C. (2005): Singlet oxygen luminiscence as an in vivo photodynamic therapy dose metric validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid., *British J. Cancer.*, **92**, 298 ó 304.

Raab O. (1900): Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien, *Z. Biol.*, **39**, 524-546. *

Schwartz S., Cohen L. (1966): Modification of radisensitivity by porphyrins II. transplanted Rhabdomyosarcoma in mice. *Cancer Res.*, **26**, 1769 ó 1773.

Trápek S., Borovanský J., ejková J., Homolka J., Klener P., Luká-M., Tráák J., Tesa V., Zeman M., Zima T., fiák A. (2000): Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 21 - 27, Grada, Praha, eská republika.

Yu Wenli, Zhao Yaping (2005): Chemiluminiscence evaluation of oxidative damane to biomoleculs induced by singlet oxygen and the protective effects of antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**, 30 ó 34.

Wayne C. E., Wayne P.R. (2005a): Photochemical principles v Photochemistry, Oxford University Press, str. 1 ó 18.



PDF Complete

Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

): Applied photochemistry v Photochemistry, Oxford

University Press, str. 78 ó 89.

Zima T., Týpek S., Tesa V., Pláteník J., Crkovská J. (1996): Volné radikály ó reaktivní formy kyslíku, antioxida ní látky a antioxida ní terapie. *Remedia*, **6**, 35 ó 38. *

*Literární prameny ozna eny hv zdi kou jsem p evzal z jiných literárních zdroj .