

České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie  
Studijní obor: Jaderná chemie



Detekce singletového kyslíku pomocí  
9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonové kyseliny

Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Kristýna Havlinová

Vedoucí práce: Ing. Iveta Terezie Hošnová

Praha 2022

Před svázáním místo téhle stránky zadání práce s podpisem děkana

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, vědecké články, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne .....

.....

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mě v průběhu vypracování této práce podporovali.

Ráda bych především mnohokrát poděkovala Ing. Ivetě Terezii Hošnové za veškerý čas a nemalou pomoc, které mi byly věnovány v době, kdy jsem vypracovávala tuto práci. Rovněž bych ráda poděkovala Ing. Lence Prouzové Procházkové, Ph.D za věcné připomínky a poznámky k mé diplomové práci.

Bc. Kristýna Havlinová

# Abstrakt

- Název práce: **Detekce singletového kyslíku pomocí 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonové kyseliny**
- Autor: Bc. Kristýna Havlinová
- Obor: Jaderná chemie
- Druh práce: Diplomová práce
- Vedoucí práce: Ing. Iveta Terezie Hošnová
- práce: Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská České vysoké učení technické v Praze
- Text: Teoretická část této práce shrnuje poznatky o singletovém kyslíku a jeho detekci. Dále popisuje mechanismy zhášení singletového kyslíku a jeho dva významné zhášeče,  $\beta$ -karoten a azid sodný. Část je také věnována fotosenzibilizátorům, radiosenzibilizátorům a fotodynamické terapii, jakožto významné aplikaci singletového kyslíku. Experimentální část se věnuje studiu vlastností sondy ABDA, vlivu koncentrace a pH na její absorpční a emisní spektra, stejně jako vlivu rentgenového a viditelného záření. Dále jsou studovány systémy obsahující fotosenzibilizátor, sondu ABDA a zhášeče azid sodný, nebo  $\beta$ -karoten, v různých koncentracích. Jako fotosenzibilizátor jsou použity bengálská červeň a akridinová oranž. Na základě chemické aktinometrie a úbytku sondy ABDA během ozařování je vypočítáno teoretické množství vyprodukovaného singletového kyslíku.
- Klíčová slova 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina, singletový kyslík, bengálská červeň, akridinová oranž, azid sodný,  $\beta$ -karoten, ABDA

# Abstract

Title           **Singlet oxygen detection with 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid**

Author:        Bc. Kristýna Havlinová

Study

specialization: Nuclear Chemistry

Supervisor:   Ing. Iveta Terezie Hošnová

Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská  
České vysoké učení technické v Praze

Text:           The theoretical part of this work summarizes knowledge about singlet oxygen and its detection. It describes the quenching mechanisms of singlet oxygen and presents its two prominent quenchers,  $\beta$ -carotene and sodium azide. A section is also devoted to photosensitizers, radiosensitizers, and photodynamic therapy, as an important application of singlet oxygen. The experimental part presents the study of the properties of the ABDA probe, the influence of concentration and pH on its absorption and emission spectra, and the influence of X-ray and visible radiation on it. Systems containing photosensitizer, the probe ABDA, and the quencher sodium azide, or  $\beta$ -carotene, are also being studied. The photosensitizers rose bengal and acridine orange are used. Based on chemical actinometry and the loss of the ABDA probe during irradiation, the theoretical amount of produced singlet oxygen is calculated.

Key words:     9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid, singlet oxygen, rose bengal, acridine orange, sodium azide,  $\beta$ -carotene

# Obsah

<b>Seznam zkratk a označení</b>	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>11</b>
2.1 Singletový kyslík	11
2.1.1 Chemická detekce singletového kyslíku	13
2.2 Zhášení singletového kyslíku	13
2.2.1 Mechanismy fyzikálního zhášení	14
2.2.2 Zhášení rozpouštědlem	15
2.2.3 Zhášeče	16
2.3 Fotosenzibilizátory a radiosenzibilizátory	19
2.3.1 Bengálská červen	23
2.3.2 Akridinová oranž	24
<b>3 Experimentální část</b>	<b>26</b>
3.1 Použité chemikálie	26
3.2 Použité přístroje	27
3.2.1 Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus spektrofluorimetr	27
3.2.2 Varian Cary 100 UV-VIS spektrofotometr	27
3.2.3 Preparativní rentgen Sciox Beam	27
3.3 Příprava zásobních roztoků	27
3.3.1 Příprava roztoků pro aktinometrii	28
3.4 Stanovení charakteristik zdrojů záření	30
3.4.1 Stanovení toku fotonu Xe lampy při 545 nm	30
3.4.2 Stanovení toku fotonu Xe lampy při 480 nm	30
3.5 Měření vlivu koncentrace na absorpční a emisní spektra sondy ABDA	30
3.6 Měření vlivu pH na absorpční a emisní spektra sondy ABDA	31
3.7 Úbytek sondy ABDA při ozařování bez fotosenzibilizátoru	31
3.8 Vliv rentgenového záření na sondu ABDA	31
3.9 Produkce singletového kyslíku bengálskou červení	32

3.9.1	Použití $\text{NaN}_3$ . . . . .	32
3.9.2	Použití $\beta$ -karotenu . . . . .	32
3.10	Produkce singletového kyslíku akridinovou oranží . . . . .	33
3.10.1	Použití $\text{NaN}_3$ . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Vyhodnocení a diskuze</b> . . . . .	<b>34</b>
4.1	Charakteristika sondy ABDA . . . . .	34
4.1.1	Závislost absorbance na koncentraci . . . . .	34
4.1.2	Závislost intenzity fluorescence na koncentraci . . . . .	35
4.1.3	Vliv pH na absorpční a emisní spektra . . . . .	37
4.1.4	Úbytek sondy ABDA při ozařování . . . . .	40
4.1.5	Vliv rentgenového záření na sondu ABDA . . . . .	40
4.2	Stanovení charakteristik zdrojů záření . . . . .	41
4.2.1	Stanovení toku fotonů Xe lampy při 545 nm . . . . .	41
4.2.2	Stanovení toku fotonů Xe lampy při 480 nm . . . . .	43
4.2.3	Stanovení toku fotonů Xe lampy při 490 nm a při 549 nm . . . . .	44
4.3	Kinetika reakce sondy se singletovým kyslíkem . . . . .	45
4.4	Produkce singletového kyslíku bengálskou červení . . . . .	46
4.4.1	Použití $\text{NaN}_3$ . . . . .	46
4.4.2	Použití $\beta$ -karotenu . . . . .	49
4.5	Produkce singletového kyslíku akridinovou oranží . . . . .	52
4.5.1	Použití $\text{NaN}_3$ . . . . .	56
4.6	Zhodnocení produkce singletového kyslíku . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Závěr</b> . . . . .	<b>60</b>



# Seznam zkratek a označení

ABDA	9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina
ADPA	Antracen-9,10-dipropionová kyselina
AO	Akridinová oranž
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPA	9,10-difenylantracen
H <sub>p</sub> D	Deriváty hematoporfyrinu
PDT	Fotodynamická terapie
PpIX	Protoporfyrin IX
RB	Bengálská červeň
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
THF	Tetrahydrofuran
5-ALA	Kyselina 5-aminolevulová

# 1 Úvod

Koncept využití světla pro léčbu určitých kožních nemocí je lidstvu známý již tisíce let, avšak k objasnění tohoto efektu a uznání existence částice, za něj odpovědné, došlo až ve 20. století. Onou částicí je singletový kyslík a dnes, když už jsou známy jeho silně oxidační a cytotoxické vlastnosti, se může zdát, že se nejedná o molekulu, jejíž přítomnost je v živých systémech zcela žádoucí. Jsme-li však schopni tyto na první pohled nežádoucí účinky zacílit, můžeme například v medicíně, ve fotodynamické terapii, využívat výhod, které konvenční přístupy nenabízí (Abdel-Kader, 2014; Auten a Davis, 2009).

Studium singletového kyslíku  $^1\text{O}_2$  vyžaduje existenci dobře popsanych a spolehlivých metod jeho detekce. Nemáme-li k dispozici vybavení na měření jeho fosforescence, poskytují absorpční, nebo emisní sondy velmi jednoduchou a při správné volbě sondy jednoznačnou metodu detekce  $^1\text{O}_2$ .

Teoretická část této práce se krátce věnuje obecným poznatkům o singletovém kyslíku a chemickým metodám jeho detekce pomocí sond na bázi antracenu. Větší pozornost je věnována problematice zhášení  $^1\text{O}_2$  a dvěma významným zástupcům zhášečů – azidu sodnému a karotenoidům. Stejnou měrou je rozpracována problematika fotodynamické a rentgenem buzené fotodynamické terapie a vybraných fotosenzibilizátorů.

Motivací pro experimenty v této práci je rozšíření poznatků o kyselině 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonové (ABDA). ABDA je chemická sonda  $^1\text{O}_2$ . Pro její použití při detekci  $^1\text{O}_2$ , ať už sledováním změn absorpčních nebo luminiscenčních spekter, a interpretaci výsledků, je vhodné znát závislost těchto spekter na její koncentraci a pH roztoku. Ač jsou zhášeče  $^1\text{O}_2$ , jako je například  $\beta$ -karoten či azid sodný, většinou v literatuře dobře popsány, je vhodné ověřit jejich použitelnost v daném konkrétním systému, v našem případě ve vodném prostředí v kombinaci se sondou ABDA. Stejně tak je vhodné ověřit chování sondy v přítomnosti různých fotosenzibilizátorů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Singletový kyslík

Vlastnosti molekulárního kyslíku jsou studovány již více než 200 let. Existence singletového kyslíku, jakožto samostatné specíe, byla uznána v roce 1924. Až do 60.let mu ale nebyla věnována výrazná pozornost a byl považován za vzácnou formu, hrající roli povětšinou jen v atmosferické fyzice. V dnešní době plyne zájem o singletový kyslík především z jeho potenciálu pro využití v medicíně při fotodynamické nebo rentgenem buzené fotodynamické terapii (Wilkinson et al., 1993).

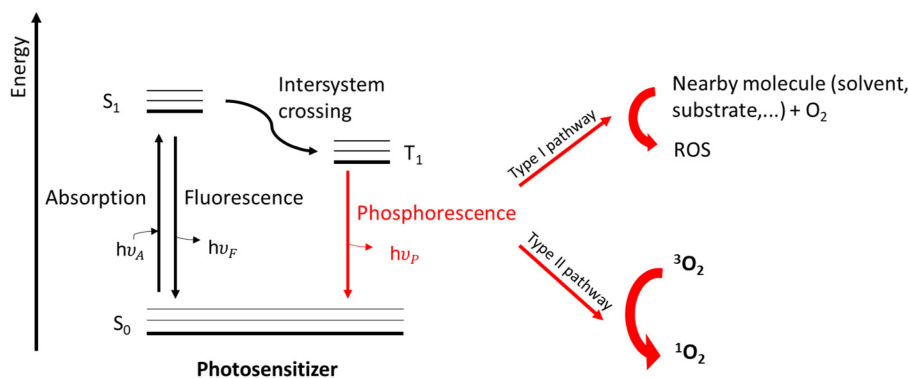
Molekula kyslíku je mezi přírodními sloučeninami značně specifická, dva nepárové elektrony paralelního spinu v nejvyšším antivazebném  $\pi$  orbitalu z ní totiž tvoří molekulu v základním energetickém stavu tripletovou. Z této skutečnosti plyne její omezená reaktivita – dle zákona zachování spinu jsou reakce tripletových molekul se singletovými za vzniku singletových molekul zakázány a pokud probíhají, probíhají pomalu a s vysokými aktivačními energiemi. Toto pravidlo se tedy týká reakcí kyslíku se singletovými organickými substráty, anorganickými anionty a nepřechodnými kovy a má pro život podstatný důsledek – dovoluje existenci organické hmoty v kyslíkové atmosféře (Wagnerova, 2001).

Naopak excitované stavy kyslíku, které řadíme mezi tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS), mají oba elektrony obsazující nejvyšší antivazebný  $\pi$  orbital spárované – jedná se tedy o molekuly singletové, označované jako  $^1\Delta_g$  a  $^1\Sigma_g$ . Pro tyto molekuly zjevně výše zmíněný spinový zákaz neplatí a vykazují tedy vysokou reaktivitu (Lang et al., 2006).

State	Orbital Assignment
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow_{\pi} \quad \downarrow_{\pi}$
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow_{\pi} \quad \circ_{\pi}$
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow_{\pi} \quad \uparrow_{\pi}$

Obr. 2.1: Zjednodušené schéma obsazení nejvyššího antivazebného  $\pi$  orbitalu kyslíku (DeRosa a Crutchley, 2002)

Singletový kyslík může vznikat řadou procesů, například chemickými reakcemi. Nejrelevantnějšími metodami produkce  $^1\text{O}_2$  jsou však jednoznačně metody fotochemické, které využívají tzv. fotosenzibilizační reakce. Mechanismus vzniku  $^1\text{O}_2$  fotosenzibilizační reakcí je přehledně znázorněn na diagramu na obrázku 2.2. Zjevně stěžejním krokem pro vznik  $^1\text{O}_2$  je mezisystémový přechod mezi stavy  $S_1$  a  $T_1$  fotosenzibilizátoru, jejichž energetický rozdíl musí být nutně vyšší než-li excitační energie  $^1\text{O}_2$ . Mimo tradičně uváděné zhášení tripletového stavu fotosenzibilizátoru molekulárním kyslíkem, uvádí autoři práce (Cabrerizo et al., 2010), že u vybraných fotosenzibilizátorů může tripletový kyslík indukovat přechod mezi stavy fotosenzibilizátoru  $S_1$  a  $S_0$ , za současného vzniku  $^1\text{O}_2$  (Ogilby, 2010).



Obr. 2.2: Zjednodušené schéma produkce  $^1\text{O}_2$  fotosenzibilizační reakcí a reakcí typu I a II (Aerssens et al., 2022)

Obecně je zvykem dělit fotosenzibilizační reakce zahrnující kyslík na reakce typu I a II, toto dělení vychází ze skutečnosti, že excitovaný stav fotosenzibilizátoru může reagovat se substrátem či rozpouštědlem, nebo přímo s kyslíkem. Reakce se substrátem/rozpouštědlem vedou prostřednictvím přenosu elektronu nebo odtržením atomu vodíku ke vzniku radikálů. Vznik reaktivních forem kyslíku, jako je  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nebo  $\text{HO}_2^{\bullet}$ , je v případě reakcí typu I důsledkem sekundárního děje, tedy inter-

akce dříve vzniklých radikálů s molekulárním kyslíkem (Foote, 1991; Baptista et al., 2017).

Za nezpochybnitelný důkaz o přítomnosti  $^1\text{O}_2$  lze považovat měření jeho fosforecence, konkrétně při přechodu  $^1\Delta_g \longrightarrow ^3\Sigma_g$  je sledována vlnová délka 1270 nm. Využití této emise je však složité, vzhledem k velmi slabé intenzitě. Slabá intenzita této emise je způsobena existencí neradiačních způsobů deaktivace, které mají rychlostní konstanty až 6–krát vyšší. Jako alternativa k přímému měření fosforence byly vyvinuty a jsou aplikovány chemické sondy, které často nabízí nenáročnou a spolehlivou formu detekce  $^1\text{O}_2$  (You, 2018).

### 2.1.1 Chemická detekce singletového kyslíku

Jako prostředky pro chemickou detekci  $^1\text{O}_2$  může sloužit řada polycyklických aromatických uhlovodíků, jako jsou například deriváty antracenu. Deriváty antracenu reagují s  $^1\text{O}_2$  za vzniku příslušného 9,10–endoperoxidu. Tyto reakce se vyznačují poklesem absorbance, případně luminiscence, a tedy mohou být tímto způsobem snadno sledovány (Díaz-Urbe et al., 2014). Hlavními rozlišujícími faktory chemických sond na bázi antracenu jsou jednak jejich rychlosti reakce s  $^1\text{O}_2$ , stejně jako rozdílné míry rozpustnosti ve vodě. Mezi zástupce této skupiny využívané pro detekci  $^1\text{O}_2$  patří například antracen-9,10-dipropionová kyselina (ADPA), 9,10-difenylantracen (DPA), nebo 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina (ABDA). ADPA je jednou ze sond, která je ve vodě rozpustná, její reakci lze sledovat poklesem absorbance v maximu při 400 nm. Vznikající endoperoxid je za laboratorní teploty stabilní, není však fotochemicky stálý a při ozařování vlnovými délkami kratšími než 300 nm může docházet k zpětnému vzniku sondy ADPA (Lindig a Rodgers, 1981; Moreno et al., 2003). DPA je jednou z nejpoužívanějších sond pro detekci  $^1\text{O}_2$ , není však rozpustná ve vodě. Její reakci s  $^1\text{O}_2$  a tedy formaci teplotně stabilního endoperoxidu lze sledovat pouze poklesem absorbance při 355 nm, kvůli absenci fluorescence této sondy. Vzhledem k její nerozpustnosti ve vodě a absenci fluorescence jsou vyvíjeny její deriváty s výhodnějšími vlastnostmi (Atzrodt et al., 2017). ABDA je další z chemických sond na bázi antracenu. Je ve vodě rozpustná a její reakce s  $^1\text{O}_2$ , za vzniku endoperoxidu, lze sledovat poklesem absorbance v jejích absorpčních maximech 400 nm, 380 nm, případně 360 nm. Reakce s  $^1\text{O}_2$  lze sledovat rovněž prostřednictvím poklesu intenzity fluorescence v emisních maximech 430 nm a 410 nm. Mezi hlavní přednost této sondy ve vztahu k detekci  $^1\text{O}_2$  patří skutečnost, že je pro  $^1\text{O}_2$  specifická (Entradas et al., 2020).

## 2.2 Zhášení singletového kyslíku

Procesy vedoucí k deaktivaci singletového kyslíku zhášením můžeme obecně rozdělit do dvou skupin. Interakce vedoucí k deaktivaci  $^1\text{O}_2$  a zároveň přechodu zhášeče do excitovaného vibračního nebo elektronického stavu, při kterých nedochází ke spotřebě kyslíku, nebo tvorbě produktů, nazýváme fyzikální zhášení. Do druhé skupiny spadají interakce  $^1\text{O}_2$  se zhášeči, které vedou ke tvorbě produktů. Tyto procesy na-

zýváme chemické zhášení. Proces fyzikálního zhášení, s rychlostní konstantou  $k_Q$ , popisuje schéma 2.1, kde Q představuje zhášeč. Obdobně schéma 2.2 znázorňuje chemické zhášení, probíhající s rychlostní konstantou  $k_R$  (Beutner et al., 2000; Wasserman a Murray, 1979).



Interakce zhášečů s  ${}^1\text{O}_2$  probíhá oběma výše uvedenými procesy, celkové zhášení látkou tedy můžeme reprezentovat součtem rychlostních konstant ( $k_Q + k_R$ ). Z hlediska vztahu mezi těmito dvěma konstantami nastávají tři situace a to, že  $k_R \gg k_Q$  a látka tedy primárně deaktivuje  ${}^1\text{O}_2$  chemickým zhášením (například DPBF a další chemické sondy (Merkel a Kearns, 1975)),  $k_R \ll k_Q$  a tedy množství zhášeče podléhající reakci je malé v porovnání s množstvím podléhajícím fyzikálnímu zhášení (například  $\beta$ -karoten (Ramel et al., 2012)). Třetí možností jsou látky jejichž rychlostní konstanty  $k_R$  a  $k_Q$  jsou srovnatelné, přičemž konkrétní poměr těchto konstant je často závislý na použitém rozpouštědle (mezi takovéto zhášeče patří například aminy nebo tokoferoly) (Lissi et al., 1993; Wasserman a Murray, 1979).

### 2.2.1 Mechanismy fyzikálního zhášení

Pro popis procesu fyzikálního zhášení byly objasněny tři mechanismy. Tyto mechanismy jsou, v pořadí s rostoucí frekvencí výskytu, elektronicky-vibrační přechod, zhášení indukované přenosem náboje a nejčastější elektronický přechod (Schweitzer a Schmidt, 2003).

#### Elektronicky-vibrační přechod

Princip deaktivace  ${}^1\text{O}_2$  elektronicky-vibračním přechodem (e–v) spočívá v přenosu elektronické excitační energie molekuly  ${}^1\text{O}_2$  do vibračních stavů molekuly kyslíku a zhášeče. Tato forma deaktivace  ${}^1\text{O}_2$  byla pozorována v plynné i v kapalně fázi a probíhá se zhášeči s vysokým oxidačním potenciálem a energií tripletového stavu vysokou tak, aby znemožňovala proběhnutí fyzikálního zhášení jinými procesy (Schweitzer a Schmidt, 2003).

#### Zhášení indukované přenosem náboje

Molekuly, které mají energii tripletového stavu vyšší než  $94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  a zároveň mají nízký oxidační potenciál, mohou zhášet  ${}^1\text{O}_2$  s rychlostními konstantami, které až 7–krát překračují hodnoty očekávané pro zhášení elektronicky-vibračním přechodem. Proces, který v tomto případě probíhá, je indukován přenosem náboje a spočívá ve vzniku singletového srážkového komplexu  ${}^1(\text{Q}^1\text{O}_2)_{\text{EC}}$ , který přechází na exciplex  ${}^1(\text{Q}^1\text{O}_2)_{\text{CT}}$  rovněž v singletovém stavu, který je stabilizován přenosem

náboje ze zhášeče na molekulu kyslíku. Tento exciplex je deaktivován mezisystémovým přechodem za vzniku tripletového komplexu  ${}^3(Q^3O_2)_{CT}$ , který může podléhat chemickým reakcím, nebo disociovat na výsledné produkty – tripletový kyslík a molekulu zhášeče (Schweitzer a Schmidt, 2003).

## Elektronický přechod

Třetím popsaným mechanismem fyzikálního zhášení  ${}^1O_2$  je tzv. elektronický přechod (EET). Tento mechanismus vede ke vzniku kyslíku v základním stavu a excitované molekuly zhášeče a pro jeho efektivitu je nutné, aby excitovaný stav molekuly zhášeče měl nižší energii než singletový stav kyslíku. Mezi látky zhášečící  ${}^1O_2$  tímto mechanismem patří například karotenoidy (Schweitzer a Schmidt, 2003).

### 2.2.2 Zhášení rozpouštědlem

Mimo interakce s rozpuštěnými látkami, jako jsou zhášeče či fotosenzibilizátory, je v kapalně fázi nutné brát v úvahu rovněž možnost deaktivace  ${}^1O_2$  interakcí s molekulami rozpouštědla. Na základě výše uvedených informací lze celkovou rychlostní konstantu deaktivace  ${}^1O_2$  vyjádřit dle výrazu v rovnici 2.3.

$$k_{\Delta} = k_{nr}[M] + k_r[M] + k_Q[R] + k_R[R] \quad (2.3)$$

V této rovnici faktory  $k_Q[R]$  a  $k_R[R]$  představují fyzikální a chemické zhášení  ${}^1O_2$  rozpuštěnou látkou. Vliv rozpouštědla V této rovnici označují faktory s členem  $[M]$ , které dále dělíme na zářivé procesy, zastoupené faktorem  $k_r$  a nezářivé procesy, reprezentované faktorem  $k_{nr}$ . Převrácená hodnota konstanty  $k_{\Delta}$  představuje dobu života  ${}^1O_2$   $\tau_{\Delta}$ .

Zářivý přechod singletového kyslíku  $O_2({}^1\Delta_g)$  na tripletový kyslík  $O_2({}^3\Sigma_g)$  představuje spinově zakázaný proces, jehož pravděpodobnost zvyšují perturbace molekuly kyslíku způsobené rozpouštědlem. Zároveň bylo prokázáno, že zářivé a nezářivé procesy deaktivace závisí na rozpouštědle rozdílným způsobem, a tedy probíhají rozdílnými mechanismy (Bregnhøj et al., 2016).

V roce 1972 představili autoři článku Merkel a Kearns (1972) teorii vysvětlující nezářivé procesy zhášení  ${}^1O_2$  rozpouštědlem. Jejich teorie uvádí, že excitační energie  ${}^1O_2$  je převáděna do vibračních módů molekul rozpouštědla, jedná se tedy o výše uvedené fyzikální zhášení formou elektronicky-vibračního přechodu, tato teorie však nepočítá s vlivem teploty na dobu života  ${}^1O_2$ . V několika pracích, jako jsou například Jensen et al. (2010); Bregnhøj et al. (2016), byla prezentována nová teorie, která bere v potaz pozorovanou závislost doby života  ${}^1O_2$  na teplotě. Tato teorie předpokládá nutnost překonání aktivační bariéry pro vznik tripletového kyslíku a vibračně-excitované molekuly rozpouštědla, ze srážkového komplexu tvořeného molekulou rozpouštědla a  ${}^1O_2$ . Autoři rovněž nevyklučují, že roli v tomto mechanismu může hrát kvantové tunelování aktivační bariérou.

### 2.2.3 Zhášče

Schopnost zhášet  $^1\text{O}_2$  (popřípadě i další reaktivní formy kyslíku) jedním z výše popsaných procesů byla popsána u řady skupin látek. Látky z několika těchto skupin hrají podstatnou roli zejména ve fotosyntetizujících rostlinách, kde spolu s enzymy působí jako ochrana před poškozením způsobeným oxidačním stresem.

Zdrojem  $^1\text{O}_2$  v zelených rostlinách je hlavně chlorofyl fotosystému II. Doba života tripletového excitovaného stavu je delší než doba života singletového excitovaného stavu, což umožňuje interakci s molekulou kyslíku v základním stavu. Dalším možným zdrojem  $^1\text{O}_2$  mohou být fotosenzibilizující chromofory, které některé rostliny produkují při interakci s patogeny, nebo jako sekundární metabolity (Triantaphylidès a Havaux, 2009).

### Karotenoidy

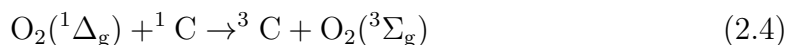
Karotenoidy patří mezi jedny z nejrozšířenějších pigmentů žluté, oranžové, nebo červené barvy. Jsou tvořeny isoprenovými jednotkami. Samotná základní 40-uhlíková kostra karotenoidů může být dále modifikována cyklizací na jenom nebo obou koncích řetězce nebo přidávkem skupin obsahujících kyslík. Obecně můžeme karotenoidy dále dělit na dvě skupiny, karoteny, obsahující pouze nesubstituovaný řetězec, a xanthofyly, které obsahují jednu nebo více skupin obsahujících kyslík (Britton, 1995). Karotenoidy mohou existovat v mnoha geometrických formách jako cis- a trans-izomery, které mohou být mezi sebou konvertovány prostřednictvím světla, tepelné energie nebo chemických reakcí. Výsledkem fotoizomerizací karotenoidů jsou především cis-izomery, s 9-cis izomerem jako hlavním produktem, který je pro případ  $\beta$ -karotenu uveden na obrázku 2.4 (Stahl a Sies, 1993; Verduin, 2020). Pravděpodobně nejstudovanějším zástupcem karotenoidů je  $\beta$ -karoten (Liebler, 1993). Karotenoidy a především pak již zmíněný  $\beta$ -karoten byly jedny z vůbec prvních popsaných látek schopných zhášet  $^1\text{O}_2$  (Foote a Denny, 1968). Mimo již výše popsanou funkci ochrany před poškozením způsobeným reaktivními formami kyslíku, jako je singletový kyslík  $^1\text{O}_2$ , superoxidový anion-radikál  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a hydroxylový radikál  $\text{OH}^{\bullet-}$ , rovněž rozšiřují rozsah vlnových délek absorbovaných rostlinami pro účely fotosyntézy, vzhledem k tomu, že karotenoidy dosahují maximální absorbance při vlnových délkách, při kterých chlorofyl příliš neabsorbuje. Energie absorbovaná karotenoidy je následně přenášena na chlorofyl právě pro účel fotosyntézy.

Využití karotenoidů pro terapeutické účely, díky jejich anti-oxidačním vlastnostem, je rovněž předmětem studií. Jedna z prvních studií, která byla v různých formách později opakována, aplikovala  $\beta$ -karoten pacientům trpícím erytropoetickou protoporfyrií. Tato nemoc se vyznačuje poruchou v procesu syntézy hemu, což vede k akumulaci jednoho z jeho prekurzorů, protoporfyrinu IX, v kůži. Protoporfyrin IX je známý fotosenzibilizátor produkující  $^1\text{O}_2$ , jeho přítomnost v kůži tedy vede k jejímu poškození. Značná část pacientů, trpících touto nemocí, zaznamenala po několika týdnech aplikací vysokých dávek  $\beta$ -karotenu zlepšení stavu a zvýšení schopnosti tolerovat sluneční světlo. Obdobně byl v souvislosti s ochranou proti fotopoškození kůže zkoumán karotenoid lykopen. Obecně lze pro karotenoidy nalézt množství důkazů o jejich schopnosti chránit lidskou kůži před následky poškození kůže způsobené

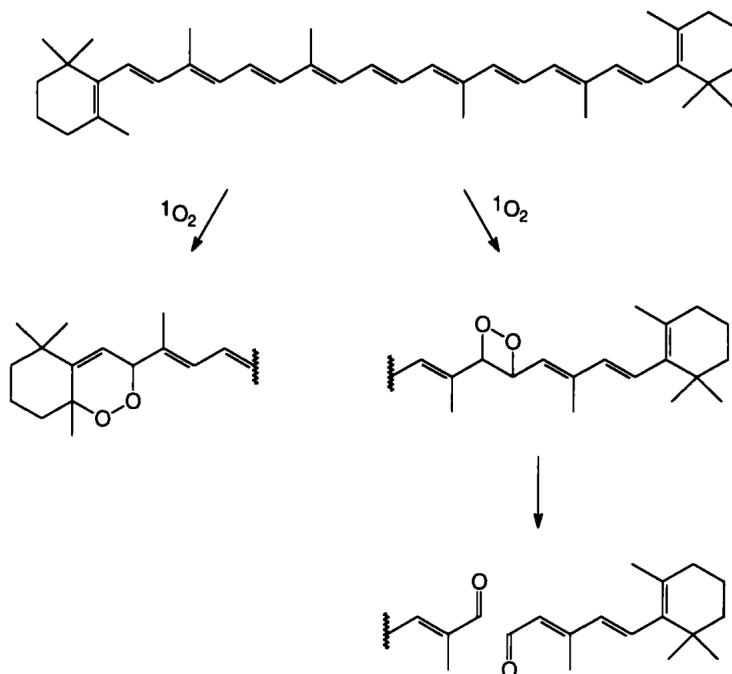


reaktivními formami kyslíku. Efekty aplikace karotenoidů závisí na mnoha faktorech, především pak ale na délce léčby a na aplikovaných dávkách. Mimo tyto pozitivní výsledky však byly zaznamenány i případy, kdy karotenoidy měly účinek opačný. Jako příklad je uváděna především studie, ve které byly kuřákům podávány vysoké dávky  $\beta$ -karotenu, což vedlo ke zvýšení výskytu rakoviny plic. Jedno z navržených vysvětlení pro tento efekt počítá s reakcí radikálů přítomných v cigaretovém kouři, především  $\text{NO}_2^\bullet$  s  $\beta$ -karotenem za vzniku kation-radikálu tohoto karotenoidu, který je schopen poškozovat amino kyseliny, nebo může dále reagovat za vzniku dalších reaktivních forem (Edge a Truscott, 2018; Böhm et al., 2012).

Samotné zhášení  $^1\text{O}_2$  karotenoidy může probíhat oběma výše uvedenými způsoby, z nichž fyzikální zhášení je způsobem majoritním. Konkrétně dochází k deaktivaci  $^1\text{O}_2$  elektronickým přechodem, při němž vzniká z molekuly karotenoidu v základním singletovém stavu molekula v tripletovém excitovaném stavu. Průběh této interakce reprezentuje schema (2.4) (Farmilo a Wilkinson, 1973).



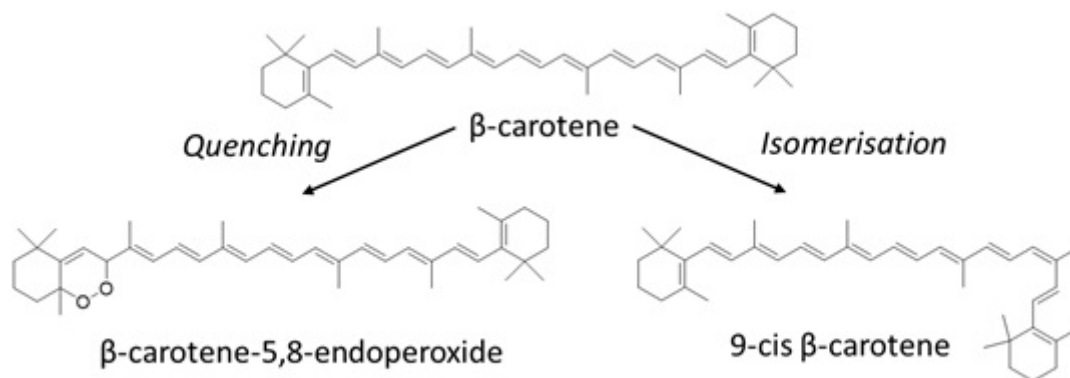
Energie tripletové molekuly karotenoidu může být disipována rotačně-vibračními interakcemi s okolními molekulami za uvolnění tepelné energie, nebo může dojít k izomerizaci mezi trans- a cis- formami (Stahl a Sies, 1993). Konkrétně pro již zmínovaný  $\beta$ -karoten uvádí autoři práce Foote et al. (1970), že při využití chlorofylu A jako fotosenzibilizátoru probíhají izomerace pouze ve směru cis  $\rightarrow$  trans. Podobně při použití methylenové modři, jako fotosenzibilizátoru, uvádí, že produktem izomerace je z většiny all-trans- $\beta$ -karoten.



Obr. 2.3: Příklad reakčních cest oxidace  $\beta$ -karotenu  $^1\text{O}_2$  (Liebler, 1993)

Tento výše popsaný proces tedy zjevně nevede k destrukci polyenového řetězce

karotenoidu a tím i ke ztrátě jeho schopnosti zhasět  $^1\text{O}_2$  a další reaktivní formy kyslíku. Fyzikální zhasení je doprovázeno zhasením chemickým, které vede k ireverzibilní destrukci polyenového řetězce karotenoidu a ztrátě jeho zhasecích vlastností. Tento proces je však v porovnání s fyzikálním zhasením zanedbatelný, avšak budí zájem, vzhledem k tomu, že mezi všemi možnými produkty můžeme nalézt produkty specifické pro reakci s  $^1\text{O}_2$ . Pro  $\beta$ -karoten byl jako tento specifický produkt identifikován  $\beta$ -karoten 5,8-endoperoxid (Liebler, 1993).

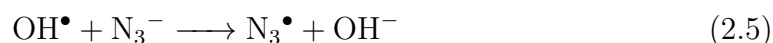


Obr. 2.4: Srovnání produktu specifického zhasení  $^1\text{O}_2$   $\beta$ -karotenem a foto-izomerizace  $\beta$ -karotenu (Verduin, 2020)

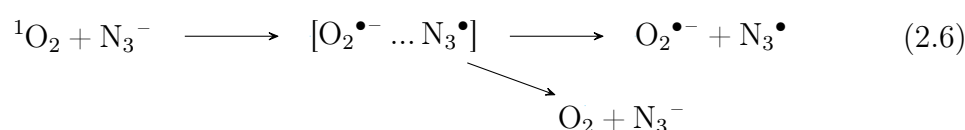
Nutné je rovněž uvést, že lykopen a  $\beta$ -karoten mohou stejně jako molekula kyslíku zhasět tripletové stavy fotosenzibilizátorů, aby toto však bylo podstatou ochrany karotenoidů před fotooxidační poškozením, bylo by nutné, aby koncentrace těchto látek výrazně převyšovala koncentraci kyslíku (Foote et al., 1970). Rychlostní konstanty zhasení  $^1\text{O}_2$  rostou s počtem konjugovaných dvojných vazeb v molekule, což je zřetelné například při srovnání lykopenu, karotenoidu s 11 konjugovanými dvojnými vazbami, který je efektivnějším zhasěčem než  $\beta$ -karoten, který má konjugovaných dvojných vazeb 9. Mírně odlišný pohled na tento rozdíl efektivity zhasení přináší možné sterické faktory. Lykopen, na rozdíl od  $\beta$ -karotenu, nedisponuje dvěma  $\beta$ -jononovými kruhy na koncích řetězce. Vyšší uváděná rychlostní konstanta zhasení však nezbytně nečiní lykopen lepším zhasěčem. Ve srovnání s  $\beta$ -karotenem je snáze oxidovatelný a může tedy docházet k jeho rychlejší ztrátě, a tedy ztrátě jeho zhasecích vlastností (Di Mascio et al., 1989; Edge et al., 1997).

### Azid sodný

Pro zkoumání procesů zahrnujících  $^1\text{O}_2$  je často využíván jako jeho zhasěč azid sodný. Azid sodný je na rozdíl od řady zhasěčů, jako jsou například výše popsané karotenoidy, rozpustný ve vodě. Z dalších reaktivních částic může azidový aniont reagovat také s hydroxylovým radikálem ( $\text{OH}^\bullet$ ). Tato reakce vede ke vzniku azidového radikálu a její schema je uvedeno v rovnici (2.5).



Samotné zhášení  $^1\text{O}_2$  probíhá v případě azidu sodného procesem přenosu náboje, během kterého vzniká exciplex. Rozpadem exciplexu mohou zpět vznikat reaktanty v základním energetickém stavu, nebo může prostřednictvím přenosu elektronu docházet ke vzniku produktů. Popsaný proces zhášení je prezentován schématem v rovnici (2.6) (Haag a Mill, 1987; Huang et al., 2012). V určitých případech nelze vyloučit možnost, že místo kyslíku bude tripletový stav fotosenzibilizátoru zhášen právě azidem sodným. V práci Nilsson et al. (1972) však uvádí, že při použití fotosenzibilizátoru methylenová modř je při koncentracích kyslíku  $10^{-3}$  M a azidu sodného  $10^{-1}$  M zhášení tripletového stavu fotosenzibilizátoru kyslíkem  $10^4$ -krát pravděpodobnější, než-li zhášení tripletového stavu azidem. Obdobné výsledky byly sledovány pro fotosenzibilizátor eosin Y, v jehož případě je zhášení kyslíkem  $10^6$ -krát efektivnější. V případě bengálské červeně je zhášení tripletového stavu fotosenzibilizátoru kyslíkem rovněž majoritní proces (Baier et al., 2007).



Schopnost azidu sodného zhášet  $^1\text{O}_2$  závisí v určité míře na vlastnostech použitého rozpouštědla. Vzhledem k mechanismu zhášení, při kterém dochází ke vzniku polárního komplexu, má vliv na rychlostní konstantu zhášení polarita zvoleného rozpouštědla a to tak, že s klesající polaritou klesá hodnota rychlostní konstanty. Dalším faktorem, ovlivňujícím rychlostní konstantu zhášení je proticita rozpouštědla, s klesající proticitou roste hodnota rychlostní konstanty. Přesný důvod tohoto jevu není objasněn, nicméně pravděpodobně se jedná o kombinaci solvatace azidových aniontů a schopnosti rozpouštědla odštěpovat protony, které jsou přijímány azidovými anionty (Li et al., 2001; Rubio et al., 1992).

## 2.3 Fotosenzibilizátory a radiosenzibilizátory

Názvem fotodynamická terapie (PDT) rozumíme terapeutický proces využívající tři hlavní komponenty – fotosenzibilizátor, světlo a kyslík. Tyto tři hlavní složky jsou zodpovědné za vznik reaktivních forem kyslíku, uplatňovaných v léčbě řady onkologických i neonkologických onemocnění (Abdel-Kader, 2014). Hlavní požadavky, aby byl fotosenzibilizátor vhodný pro aplikaci ve fotodynamické terapii, lze shrnout do několika bodů:

1. Dostatečný kvantový výtěžek pro efektivní produkci  $^1\text{O}_2$ , vzhledem k tomu, že  $^1\text{O}_2$  je zodpovědný za většinu poškození generovaného PDT
2. Absorbance v rozsahu vlnových délek 600–800 nm.
3. Zanedbatelná tzv. „temná toxicita“ a zároveň specifická akumulace jen v nádorech. Akumulace v kůži, a tím způsobená její fotosenzitivita, by měla být zcela minimální.
4. Molekula složená z ve vodě rozpustných a hydrofobních částí, což je vhodné pro efektivní prostup fotosenzibilizátoru tělními strukturami.

5. Dobrá chemická stabilita a rozpustnost v rozpouštědlech vhodných pro injekční podání.
6. Vysoká chemická čistota, rychlá příprava a vysoký výtěžek přípravy.

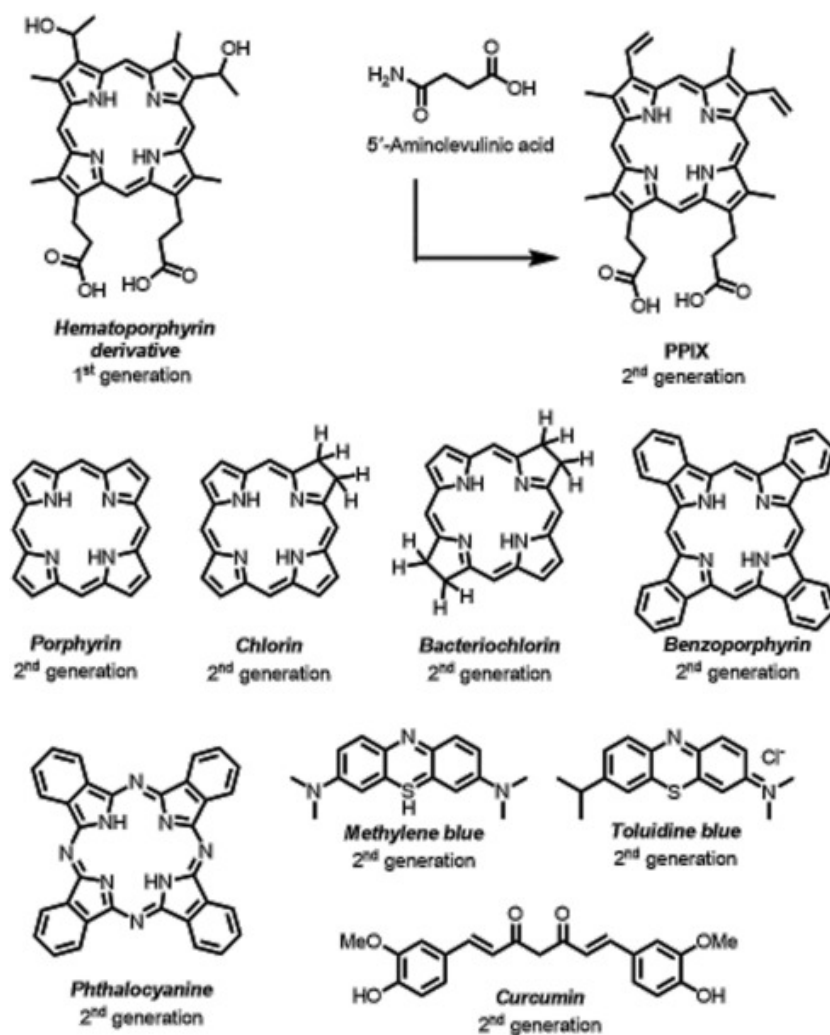
K těmto požadavkům je nutno dodat, že žádný dnes komerčně využívaný fotosenzibilizátor všechny tyto podmínky nespĺňuje (Hamblin a Mroz, 2008).

Pravděpodobně nejdéle používanou skupinou fotosenzibilizátorů jsou porfyriny. Jako důležitý zlom ve vývoji PDT lze považovat objev hematoporfyrinu v 19. století, stejně jako počátek intenzivního zkoumání jeho fototoxických vlastností na začátku století 20. To, co bylo v době objevu považováno za samostatnou látku, bylo později identifikováno jako směs mnoha porfyrinů a dalších látek, která vykazuje vyšší fototoxicitu než samotný čistý hematoporfyrin. Tato směs monomerů, dimerů a oligomerů byla souhrnně nazvána jako deriváty hematoporfyrinu (HpD) a představuje tzv. první generaci fotosenzibilizátorů, využívanou např. pod komerčním názvem Photofrin (Abdel-Kader, 2014). Fotosenzibilizátory první generace se potýkají s řadou nevýhod. První nevýhoda již byla částečně zmíněna, tyto fotosenzibilizátory nejsou přesně definované sloučeniny, ale směs látek, což činí případnou snahu o chemické modifikace těchto fotosenzibilizátorů složitější. Ač je vhodné, aby měly fotosenzibilizátory pro PDT co nejvyšší absorpční vlnovou délku v červené oblasti viditelného spektra, kde je pronikavost tkáněmi nejvyšší, fotosenzibilizátory první generace mají absorpční maxima v této oblasti minimální. Rovněž u nich v průběhu ozáření dochází k rychlému odbarvení (*photobleaching*) a tedy ztrátě jejich fotosenzibilizačních vlastností. Pro samotnou léčbu je také důležité, že se specificky neakumulují jen v nádorech, ale také může docházet k jejich depozici v kůži, což vede k její dlouhodobé fotosenzitivitě (You et al., 2003).

Základ fotosenzibilizátorů druhé generace tvoří rovněž porfyrin, nebo chlorin. Fotosenzibilizátory druhé generace eliminují řadu limitujících faktorů generace první, jedná se o přesně definované molekuly, jejichž absorpční maxima se nacházejí při delších vlnových délkách, což umožňuje použití excitačního světla, které má vyšší dosah v tkáních. Rovněž se selektivněji akumulují v nádorových tkáních a jsou rychleji vylučovány. Podskupinou fotosenzibilizátorů druhé generace jsou fotosenzibilizátory modifikované pro cílení na konkrétní buněčnou organelu, například mitochondrii (Baskaran et al., 2018; Kou et al., 2017).

Zajímavým zástupcem fotosenzibilizátorů druhé generace je kyselina 5-aminolevulová (5-ALA), která sama o sobě fotosenzibilizátorem není. 5-ALA je přirozeným prekurzorem hemu. Metabolicky je z 5-ALA syntetizován protoporfyrin IX (PpIX), který již fotosenzibilizátorem druhé generace je. 5-ALA může být podávána orálně a je schopná se efektivně akumulovat v nádorových buňkách, kde je v mitochondriích přeměněna na PpIX. V normálních buňkách je PpIX dále enzymaticky metabolizován, avšak řada typů nádorových buněk mohou mít sníženou produkci tohoto enzymu a umožňují takto akumulaci PpIX. PpIX má výrazné absorpční maximum při 410 nm a další méně výrazná maxima mezi 480 nm a 650 nm (Mahmoudi et al., 2019). Ač fotosenzibilizátory druhé generace řeší řadu nevýhod generace první, mají své pro PDT nevýhodné vlastnosti. Příkladem jsou nízká rozpustnost ve vodě, rychlost odbourávání, nebo stále nedostatečná selektivita. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeni jejich nástupci ve formě fotosenzibilizátorů třetí generace.

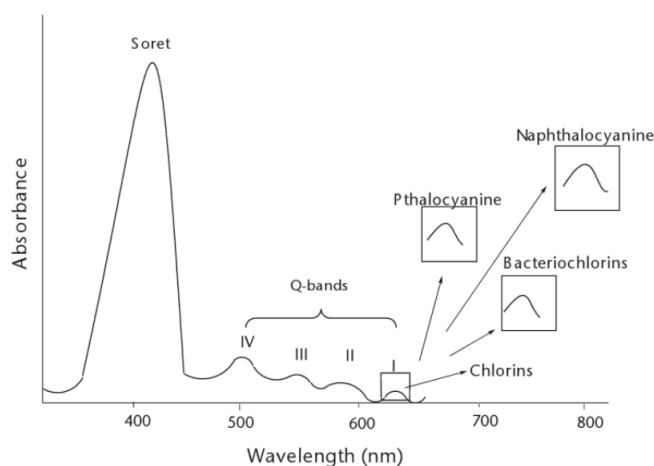
Fotosenzibilizátory třetí generace představují základ tvořený fotosenzibilizáto-



Obr. 2.5: Obecné strukturní vzorce fotosenzibilizátorů první a druhé generace (Mfouo-Tynga et al., 2021)

rem druhé generace, který je konjugován s látkami jako jsou protilátky, aminokyseliny nebo peptidy, nebo je obalen nosiči, jako jsou nanočástice, micely nebo lipozomy. Cílem fotosenzibilizátorů třetí generace je zmírnění negativních efektů PDT na zdravé buňky volbou konjugované, nebo obalovací látky umožňující selektivní akumulaci v konkrétních typech nádorových buňek (Mfouo-Tynga et al., 2021).

Smrt nádorových buněk způsobená reaktivními formami kyslíku může probíhat, především v závislosti na koncentraci fotosenzibilizátoru a dopadajícího toku fotonů, procesem nekrózy nebo apoptózy. Při vysokých intenzitách absorbovaného světla dochází ke smrti buněk primárně nekrózou, při které dochází k porušení buněčné membrány a uvolnění cytokinů a dalších látek tvořících obsah buňky. Uvolněné látky mohou mít negativní efekt na buňky okolní a mohou vyvolat odpověď imunitního systému. Na rozdíl od nekrózy, apoptóza je programovaná buněčná smrt a dochází k ní při nižších intenzitách ozařování. V případě apoptózy nedochází k uvolnění obsahu buňky a odpověď imunitního systému není očekávána. Mimo přímé působení na buňky může PDT vytvářet poškození prostřednictvím porušení cévního zásobení



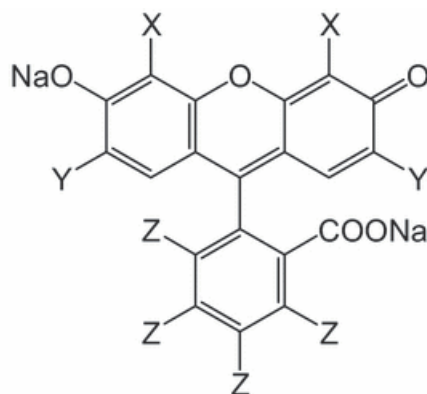
Obr. 2.6: Obecná reprezentace absorpčních spekter několika skupin fotosenzibilizátorů (Hamblin a Mroz, 2008)

nádorů, což je i přednostním cílem mnoha léčebných protokolů. Nutno je rovněž zmínit, že samotná odlišná stavba cévního systému nádorů může hrát roli v přednostní akumulaci fotosenzibilizátorů v těchto útvarech (Hamblin a Huang, 2017; Fitzgerald, 2017).

Limity pro aplikaci fotosenzibilizátorů pro fotodynamickou terapii vychází ze samotných principů metody – světelné záření nutné k excitaci fotosenzibilizátorů má v lidském těle dosah v řádu milimetrů. Rozšíření možného rozsahu využití nabízí metoda nazývaný rentgenem buzená fotodynamická terapie, jejíž výhoda je oproti konvenční fotodynamické terapii zjevná – rentgenové záření vykazuje větší pronikavost tkáněmi v porovnání s viditelným nebo blízkým infračerveným zářením. Mimo výhodu širší možnosti aplikace můžeme vidět i výhodu v porovnání s konvenční radioterapií. Podíváme-li se na rentgenem buzenou fotodynamickou terapii jako na kombinaci fotodynamické terapie a radioterapie uvidíme, že pro vyvolání léčivého efektu stačí pacienta vystavit nižším dávkám ionizujícího záření. Jeden z přístupů pro generování  $^1\text{O}_2$  pomocí rentgenového záření je využití nanočástic. Tyto nanočástice obvykle obsahují scintilátor, který zajišťuje konverzi rentgenového záření na záření z viditelného spektra, které je absorbováno konvenčním fotosenzibilizátorem vázaným v nanočástici. Nevýhodou nanočástic může být obtížně popsatelná farmakokinetika a metabolické vylučování. Novějším přístupem je hledání vhodných radiosenzibilizátorů schopných absorbovat rentgenové záření a generovat  $^1\text{O}_2$ , nebo další reaktivní formy kyslíku přímo. Problémem řady systémů, které jsou schopny produkovat  $^1\text{O}_2$ , potažmo i další reaktivní formy kyslíku, je jejich toxicita a tedy nevhodnost pro aplikaci v živých systémech (Takahashi a Misawa, 2009; Toyama et al., 2018; Wang et al., 2016).

### 2.3.1 Bengálská červeň

Bengálská červeň (RB) je jedním z aniontových xantenových barviv, které lze využít jako fotosenzibilizátory. Mezi další zástupce této skupiny barviv, které jsou rovněž fotosenzibilizátory, řadíme například erythrosin B, eosin Y nebo fluorescein. Obecná struktura vybraných zástupců xantenových barviv je uvedena na obrázku 2.7. RB, podobně jako řada xantenových barviv, byla po svém objevu používána pro svou výraznou barvu na barvení textilu. Vzhledem k tomu, že vlivem procesů spojených s absorpcí světla dochází k jejímu odbarvování a degradaci, není jako permanentní barvivo příliš vhodná. Disodná sůl RB, což je forma, ve které je nejčastěji využívána, je rozpustná v polárních rozpouštědlech (Neckers a Valdes-Aguilera, 1993).



Xanthene dye	X	Y	Z
Rose bengal	I	I	Cl
Phloxine B	Br	Br	Cl
Erythrosine B	I	I	H
Eosin B	Br	NO <sub>2</sub>	H

Obr. 2.7: Obecná struktura xantenových barviv (Kato et al., 2012)

Poloha absorpčního a emisního maxima RB je závislá na použitém rozpouštědle. Ve vodě má RB výrazné absorpční maximum kolem vlnové délky 550 nm, s méně výrazným bočním ramenem při 525 nm. Nárůst absorbance RB s koncentrací se řídí Lambert-Beerovým zákonem pouze pro koncentrace  $10^{-6}$  M a nižší, při vyšších koncentracích dochází ke vzniku dimerů, případně vyšších agregátů RB, které ovlivňují absorpční spektra (Neckers a Valdes-Aguilera, 1993). Obdobně jako na podobu absorpčních a emisních spekter, má volba rozpouštědla vliv i na velikost kvantového výtěžku  $^1\text{O}_2$ , konkrétní hodnoty kvantového výtěžku pro vybraná rozpouštědla jsou uvedeny v tabulce 2.1.  $^1\text{O}_2$  není jedinou reaktivní formou kyslíku, kterou je RB schopna produkovat. S nezanedbatelným, ale oproti  $^1\text{O}_2$  menším, kvantovým výtěžkem 0,2 dochází rovněž ke vzniku  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Lee a Rodgers, 1987).

Vzhledem k vysokým kvantovým výtěžkům  $^1\text{O}_2$  vykazovala RB vysoký potenciál pro využití v PDT, avšak její další vlastnosti tento potenciál limitují. Největším

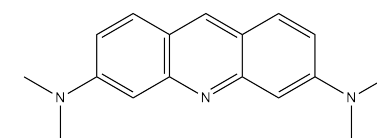
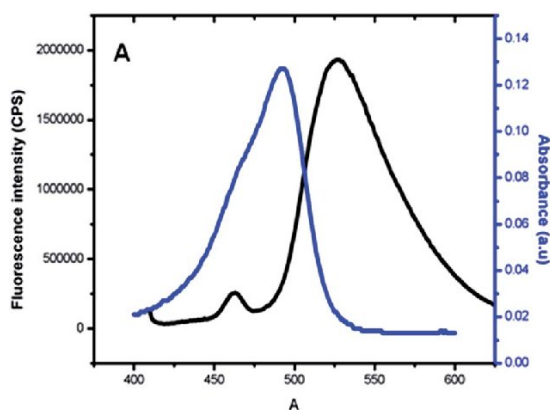
Tab. 2.1: Kvantové výtěžky  $^1\text{O}_2$  RB pro různá rozpouštědla (Redmond a Gamlin, 1999)

Rozpouštědlo	$\Phi_{\Delta}$
H <sub>2</sub> O	0,75
D <sub>2</sub> O	0,76
EtOH	0,68
CH <sub>3</sub> OH	0,76
DMSO	0,162
DMF	0,47

problémem je její vylučování v rychlém sledu po podání a akumulace v játrech. Rovněž její absorpční maximum neleží v oblasti s nejvyšší pronikavostí záření tkáněmi a je tedy vhodná spíše pouze pro aplikaci na povrchové oblasti (Buck et al., 2017)

### 2.3.2 Akridinová oranž

Schopnost akridinových barviv produkovat reaktivní formy kyslíku je známa již od počátku 20. století, kdy byla pozorováno usmrcení trepky inkubované s akridinovou oranží po vystavení vzorku slunečnímu záření (Shi a Sadler, 2021).



(b) Strukturální vzorec akridinové oranže

(a) Absorpční a emisní spektrum akridinové oranže (Pitchaimani et al., 2014)

Mimo zmíněný fotodynamický efekt je akridinová oranž použitelná pro značení buněčných struktur a nukleových kyselin. Při akumulaci v lyzozomech lze sledovat



fluorescenci oranžové barvy, v případě vazby na DNA a RNA fluorescenci zelené, respektive červené, barvy, její fluorescence je rovněž využitelná při operačních zákrocích pro vizualizaci nádoru. Pozitivní vlastností akridinové oranži s ohledu na PDT představuje její selektivní akumulace ve vybraných typech tumorů. V určité míře dochází k její akumulaci i ve zdravých svalových buňkách a buňkách tukové tkáně, nicméně z těchto buněk je, na rozdíl od buněk nádorových, vylučována. Důvodem zvýšené akumulace v zhoubných nádorech je pravděpodobně jejich acidita, respektive rozdíl v pH v a mimo buňku. Má se za to, že v buňkách zhoubných nádorů dochází k produkci  $H^+$  iontů, vlivem přítomnosti laktátu a  $CO_2$ , avšak procesy uvnitř buněk vyžadují pH v úzkém intervalu přibližně 7,2–7,4 a  $H^+$  ionty tedy musí být transportovány mimo buňku do extracelulární tekutiny (Matsubara et al., 2006). Z obecných požadavků na fotosenzibilizátor, uvedených v kapitole 2.3, je pro akridinovou oranž uváděn relativně nízký kvantový výtěžek  $^1O_2$  0,18 (Cáceres et al., 2017). Skutečnost, která odlišuje akridinovou oranž od dalších fotosenzibilizátorů, jako je bengálská červeň nebo methylenová modř, je její uváděná schopnost působit cytotoxicky po ozáření rentgenovým zářením (Kusuzaki, Murata, Matsubara, Satonaka, Wakabayashi, Matsumine, a Uchida, Kusuzaki et al.). V literatuře je ale rovněž popsána reakce AO s hydratovanými elektrony, které jsou produkty radiolýzy vody (Guha a Mittal, 1995). Tento proces může být konkurenční k radiosenzibilizační produkci  $^1O_2$ .

# 3 Experimentální část

## 3.1 Použité chemikálie

Tab. 3.1: Chemikálie použité při experimentech

Název	Sumární vzorec	Výrobce	Čistota	$M_r$
Kyselina 9,10-antracendiyl-bis (methylen)dimalonová (ABDA)	$C_{22}H_{18}O_8$	Sigma-Aldrich	$\geq 90\%$	410,37
Bengálská červeň (RB)	$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$	Sigma-Aldrich	95%	1017,64
Azid sodný	$NaN_3$	Sigma-Aldrich	$\geq 99,5\%$	65,01
Tris(oxalato)železitan draselný	$K_3[Fe(C_2O_4)_3]$	-	-	381,35
1,10-fenantrolin monohdrát	$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$	Merck	p.a.	198,24
Octan sodný	$CH_3COONa$	Sigma-Aldrich	$\geq 99,0\%$	82,03
Akridinová oranž (AO)	$C_{17}H_{19}N_3$	Carl Roth	-	265,35
Reineckova sůl	$NH_4[Cr(SCN)_4(NH_3)_2]$	Sigma-Aldrich	$>93\%$	336,43
Kyselina dusičná 65%	$HNO_3$	Penta	p.a.	63,01
Dusičnan železitý nonahdrát	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$	Penta	p.a.	404
Hydroxid draselný	$KOH$	Lach-Ner	p.a.	56,11
Tetrahydrofuran	$C_4H_8O$	Penta	p.a.	72,11

## 3.2 Použité přístroje

### 3.2.1 Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus spektrofluorimetr

Pro měření emisních a absorpčních spekter a ozařování vzorků byl využíván spektrofluorimetru FluoroMax Plus. Excitační záření v přístroji je zajištěno 150 W xenonovou výbojkou. Přístroj obsahuje dva Czerny-Turner monochromátory, každý z monochromátorů je vybaven vstupní a výstupní štěrbinou s upravitelnou šířkou v rozsahu 0 – 30 nm bandpass. Taktéž je vybaven třemi detektory, referenčním detektorem skládajícím se z křemíkové fotodiody pro korekce na fluktuaci výkonu xenonové výbojky, detektorem snímajícím signál ze vzorku, který je tvořen fotonásobičem R928P s rozsahem odezvy 180–850 nm a detektorem na měření absorbance, který je rovněž tvořen křemíkovou fotodiudou.

### 3.2.2 Varian Cary 100 UV-VIS spektrofotometr

Primárně byla měření absorbance a absorpčních spekter prováděna na spektrofotometru Varian Cary 100. Jedná se o dvoupaprskový přístroj schopný měřit v rozsahu vlnových délek 190 – 900 nm. Přístroj je vybaven Czerny-Turner monochromátorem, difrakční mřížkou s rozměry 30x35 mm s 1200 vrypů/mm a detektorem R928 PMT. Měření byla prováděna v křemenných kyvetách, jako referenční roztok byla využívána voda.

### 3.2.3 Preparativní rentgen Sciox Beam

Ozařování vzorků rentgenovým zářením bylo prováděno pomocí na zakázku vyráběného systému Sciox Beam. Jedná se o přístroj vybavený nízkonapěťovou a vysokonapěťovou wolframovou rentgenkou, u nichž lze nastavit pracovní napětí v rozsahu 4–350 kV a proud v rozsahu 0,1–30,0 mA. V ozařovací komoře je umístěna výškově nastavitelná polička s orbitální třepačkou, umožňující umístění 12 vzorků (Hošnová et al., 2022).

## 3.3 Příprava zásobních roztoků

### Příprava zásobního roztoku akridinové oranže

Vodný roztok AO o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  M byl připraven v odměrné baňce o objemu 50 ml.

## **Příprava zásobního roztoku bengálské červeně**

Vodný roztok RB o koncentraci  $10^{-4}$  M byl připraven rozpuštěním příslušné navážky ve vodě v odměrné baňce o objemu 50 ml.

## **Příprava zásobního roztoku sondy ABDA**

Vodný roztok sondy ABDA o koncentraci  $10^{-3}$  M byl připraven v odměrné baňce o objemu 50 ml. Pro rozpuštění sondy byl přidán 0,4769 M NaOH a poté byla baňka po rysku doplněna deionizovanou vodou.

## **Příprava zásobního roztoku azidu sodného**

Vodný roztok  $\text{NaN}_3$  o koncentraci  $10^{-2}$  M byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml, 1 M vodný roztok byl připraven v odměrné baňce o objemu 5 ml.

## **Příprava zásobního roztoku $\beta$ -karotenu**

5 ml  $10^{-4}$  M roztoku  $\beta$ -karotenu bylo připraveno rozpuštěním příslušné navážky v tetrahydrofuranu (THF),  $10^{-2}$  M roztok byl připraven stejným způsobem v odměrné baňce o objemu 1 ml.  $\beta$ -karoten není rozpustný ve vodě, proto byl na základě údajů o jeho rozpustnosti z práce Craft a Soares (1992) vybrán THF, jakožto rozpouštědlo, v němž je  $\beta$ -karoten dobře rozpustný a zároveň se jedná rozpouštědlo mísitelné s vodou.

### **3.3.1 Příprava roztoků pro aktinometrii**

#### **Příprava ferrioxalátového aktinometru**

Roztok 0,15 M ferrioxalátového aktinometru byl připraven v 50ml odměrné baňce rozpuštěním  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$  ve vodě přidáním 5 ml 0,5M roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a baňka byla doplněna po rysku vodou.

#### **Příprava octanového pufru**

Octanový pufr byl připraven smícháním 120 ml 1 M roztoku octanu sodného a 72 ml 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v odměrné baňce o objemu 200 ml.

## Příprava zásobního roztoku fenantrolinu

Ve 100 ml odměrné baňce byl připraven zásobní roztok fenantrolinu o koncentraci 0,005 M rozpuštěním 0,1 g fenantrolinu ve vodě.

## Příprava aktinometru z Reineckovy soli

Nejprve byla zakoupená Reineckova sůl rekrystalizována z vodného roztoku při 35 °C. V odměrné baňce o objemu 25 ml byl připraven 0,1 M zásobní roztok KOH. Pro přípravu roztoku aktinometru Reineckovy soli o koncentraci 0,015 M bylo odpovídající množství rekrystalizované Reineckovy soli rozpuštěno v zásobním roztoku KOH a baňka byla doplněna po rysku vodou. Takto získaný roztok byl 30 minut protřepáván. Před samotným ozařováním roztoku bylo přidán 32  $\mu\text{l}$  98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tak, aby se pH roztoku aktinometru pohybovalo kolem hodnoty 4. V tabulce 3.2 jsou uvedeny hodnoty pH aktinometru pro jednotlivá stanovení.

Tab. 3.2: Hodnoty pH roztoku aktinometru před ozářením (po přidavku 32  $\mu\text{l}$  98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Stanovení	Hodnota pH
1.	4,080
2.	4,107
3.	4,069
4.	4,002

## Příprava zásobního roztoku $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

Roztok obsahující 0,1 M  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 M  $\text{HNO}_3$  byl připraven do 50ml odměrné baňky. 2,02000 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  bylo rozpuštěno ve vodě, bylo přidáno 866  $\mu\text{l}$  65%  $\text{HNO}_3$  a baňka byla doplněna vodou po rysku.

## 3.4 Stanovení charakteristik zdrojů záření

### 3.4.1 Stanovení toku fotonu Xe lampy při 545 nm

Tok fotonů xenonové lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 545 nm, při nastavení štěrbin excitačního monochromátoru přístroje na 2 nm bandpass, byl určován pomocí aktinometru tvořeného roztokem Reineckovy soli. Metodika byla převzata z práce Radjagobalou et al. (2019). V křemenné kyvetě za stálého míchání byly ozařovány vždy 3 ml roztoku aktinometru po dobu 0, 5, 10, 20, 30 a 45 minut. Po ozáření byl aktinometr ředěn roztokem  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  v  $\text{HNO}_3$ . Roztoky pro měření absorbance byly připraveny do alobalem pokrytých plastových ampulí smícháním 0,5 ml ozářeného roztoku, 1,5 ml roztoku  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  a 10 ml deionizované vody. Následně byla měřena absorpční spektra vzorků v křemenných kyvetách na spektrofotometru Cary 100.

### 3.4.2 Stanovení toku fotonu Xe lampy při 480 nm

Tok fotonů xenonové lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 480 nm, při nastavení štěrbin excitačního monochromátoru přístroje na 1 nm bandpass, byl určován pomocí ferrioxalátového aktinometru. Za stálého míchání byly ozařovány vždy 3 ml aktinometru v křemenné kyvetě. Roztoky pro vyhodnocení byly připraveny do 25ml odměrných baněk smícháním 2,5 ml ozářeného roztoku, 1,25 ml octanového pufru, 4 ml 0,1% vodného roztoku fenantrolinu a vody. Takto připravené roztoky byly ponechány 1 hodinu ve tmě. Následně byla na spektrofotometru Cary 100 měřena jejich absorpční spektra.

## 3.5 Měření vlivu koncentrace na absorpční a emisní spektra sondy ABDA

Pro popsání vlivu rostoucí koncentrace sondy na její absorpční a emisní spektra byly ze zásobního roztoku sondy o koncentraci  $10^{-3}$  M připraveny v křemenné kyvetě postupně roztoky o koncentraci  $10^{-6}$  M,  $5 \cdot 10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $3 \cdot 10^{-5}$  M,  $5 \cdot 10^{-5}$  M,  $7 \cdot 10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Absorpční spektra roztoků byla měřena na spektrofotometru Cary 100. Emisní spektra byla měřena na spektrofluorimetru FluoroMax Plus s emisní štěrbinou nastavenou na 0,5 nm bandpass.. Excitační vlnová délka byla 388 nm a štěrbin excitačního monochromátoru byla nastavena na 0,5 nm bandpass.

### 3.6 Měření vlivu pH na absorpční a emisní spektra sondy ABDA

Pro sledování vlivu pH na absorpční a emisní spektra bylo do plastové ampule připraveno 10 ml roztoku sondy ABDA o koncentraci přibližně  $5,8 \cdot 10^{-5}$  M. Pomocí pH metru bylo změřeno pH a teplota roztoku a následně byla pomocí spektrofluorimetru FluoroMax Plus měřena absorpční a emisní spektra. Prostřednictvím přidávků 0,4680 M HCl a 0,4769 M NaOH bylo upravováno pH, za udržování konstantní koncentrace sondy v roztoku. Pro každou hodnotu pH byla měřena absorpční a emisní spektra. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Cary 100. Emisní spektra byla měřena na spektrofluorimetru FluoroMax Plus s emisní šterbinou nastavenou na 0,5 nm bandpass. Excitační vlnová délka byla 388 nm a šterbina excitačního monochromátoru byla nastavena na 0,5 nm bandpass.

### 3.7 Úbytek sondy ABDA při ozařování bez fotosenzibilizátoru

Pro ověření, zda rychlost poklesu absorpance sondy ABDA závisí na její výchozí koncentraci, bylo, mimo použití dat z předchozí práce (Havlinová, 2020), provedeno ozařování pomocí Xe lampy spektrofluorimetru. 3 ml roztoků  $10^{-5}$  M a  $5 \cdot 10^{-5}$  M sondy ABDA bylo ozářeno vlnovou délkou 549 nm s šířkou šterbiny excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm.

### 3.8 Vliv rentgenového záření na sondu ABDA

Ozařování roztoku 10 ml  $10^{-4}$  M sondy ABDA rentgenovým zářením, pomocí vysokoenergetické rentgenky nastavené na 130 kV a 20 mA, bylo prováděno v plastových ampulích, po dobu 0 až 90 minut za stálého třepání.

## 3.9 Produkce singletového kyslíku bengálskou červení

### 3.9.1 Použití $\text{NaN}_3$

Před samotným ozařováním vzorků s přídavkem  $\text{NaN}_3$  bylo provedeno ozařování vzorku obsahující  $10^{-5}$  M RB a  $10^{-4}$  M sondu ABDA. Tento vzorek byl připraven smícháním  $300 \mu\text{l}$  zásobního roztoku sondy ABDA a  $300 \mu\text{l}$  zásobního roztoku RB s  $2400 \mu\text{l}$  vody v křemenné kyvetě. Obdobně byl připraven vzorek obsahující pouze  $10^{-4}$  M sondu ABDA smícháním  $2600 \mu\text{l}$  vody a  $300 \mu\text{l}$  roztoku sondy. Tyto roztoky byly ozařovány pomocí Xe lampy spektrofluorimetru vlnovou délkou  $549 \text{ nm}$ , se šířkou štěrbinu excitačního monochromátoru nastavenou na  $2 \text{ nm}$  bandpass. Tato šířka štěrbinu byla zvolena jako kompromis, poté co bylo zjištěno, že štěrbinu o šířce  $1 \text{ nm}$  bandpass nepropouští dostatečnou intenzitu záření proto, aby byly v nepřiliš dlouhých ozařovacích časech sledovány výsledky. Roztoky byly ozařovány po maximální dobu  $180 \text{ min}$ . Po každém ozařovacím intervalu byla na spektrofotometru Cary 100 měřena absorpční spektra a na spektrofluorimetru FluoroMax Plus byla měřena emisní spektra sondy ABDA při excitaci vlnovou délkou  $388 \text{ nm}$ , za nastavení štěrbinu excitačního monochromátoru na  $0,5 \text{ nm}$  bandpass a emisního monochromátoru na  $1 \text{ nm}$  bandpass. Tato měření byla prováděna pro možnost srovnání těchto spekter a posouzení efektu  $\text{NaN}_3$  na tyto systémy.

Vzorky obsahující  $\text{NaN}_3$  o koncentracích  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M a  $10^{-2}$  M byly připraveny v křemenných kyvetách smícháním odpovídajících objemů zásobního roztoku  $\text{NaN}_3$  s  $300 \mu\text{l}$  zásobního roztoku sondy ABDA,  $300 \mu\text{l}$  zásobního roztoku RB a doplněny vodou do objemu  $3 \text{ ml}$ . Vzorky byly ve spektrofluorimetru FluoromaxPlus ozařovány po dobu  $0$  až  $120$  minut. Vlnová délka a nastavení štěrbinu excitačního monochromátoru bylo stejné jako při ozařování vzorků bez  $\text{NaN}_3$ . Po každém ozařovacím intervalu byla opět měřena absorpční a emisní spektra.

### 3.9.2 Použití $\beta$ -karotenu

Pro možnost srovnání účinnosti zhasěče bylo nejprve provedeno ozařování roztoků obsahujících  $10^{-4}$  M sondu ABDA spolu s  $300 \mu\text{l}$  THF a  $10^{-5}$  M RB, a  $10^{-4}$  M sondu ABDA spolu s  $300 \mu\text{l}$  THF. Ozařování bylo prováděno v křemenné kyvetě, vlnovou délkou  $549 \text{ nm}$ , pomocí spektrofluorimetru FluoroMax Plus, s šířkou štěrbinu excitačního monochromátoru nastavenou na  $1 \text{ nm}$  bandpass. Ozařování bylo prováděno po dobu  $0$  až  $90$  minut v případě vzorku obsahujícího sondu ABDA spolu s THF a  $0$  až  $120$  minut v případě vzorku se sondou ABDA, RB a THF. Pro určení, s jakým trendem klesá absorbance sondy ABDA v přítomnosti RB, i bez ní, v roztocích obsahujících THF, bylo ozařování provedeno také se šířkou štěrbinu excitačního monochromátoru nastavenou na  $29 \text{ nm}$  bandpass.



Samotné vzorky s  $\beta$ -karotenem byly připravovány smícháním 300  $\mu$ l zásobního roztoku sondy ABDA, 300  $\mu$ l RB a příslušným ředěním zásobních roztoků  $\beta$ -karotenu tak, aby jeho výsledná koncentrace v 3 ml roztoku byla  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M, nebo  $10^{-4}$  M. Aby naměřená spektra byla srovnatelná, každý roztok vždy obsahoval přesně 300  $\mu$ l THF a do 3 ml byl doplněn vodou. Roztoky byly pomocí spektrofluorimetru FluoroMax Plus ozařovány obdobným způsobem, jako v případě roztoků s  $\text{NaN}_3$ , tedy vlnovou délkou 549 nm, se šířkou štěrby excitačního monochromátoru nastavenou na 1 nm bandpass.

Pro možnost zhodnocení úbytku sondy ABDA během ozařování a určení molárního extinkčního koeficientu sondy ABDA ve směsném rozpouštědle byla měřena absorpční spektra roztoků obsahujících  $5 \cdot 10^{-6}$  M až  $10^{-4}$  M sondu ABDA, spolu s 300  $\mu$ l THF, v celkovém objemu 3 ml.

## 3.10 Produkce singletového kyslíku akridinovou oranží

### 3.10.1 Použití $\text{NaN}_3$

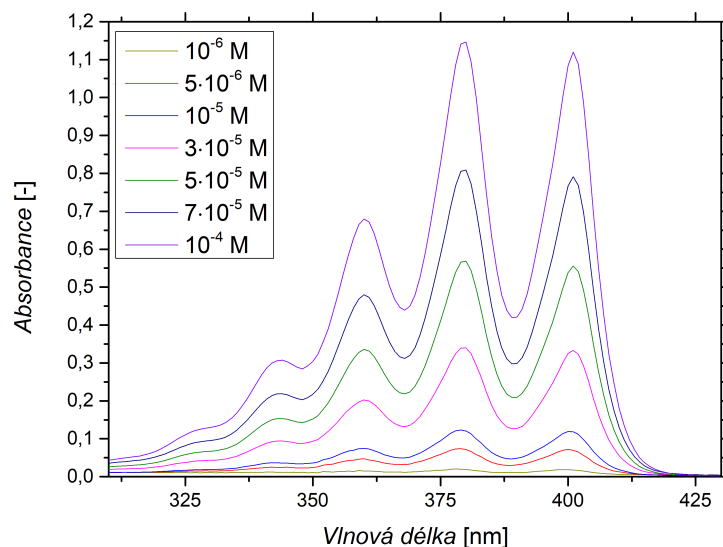
Dalším použitým fotosenzibilizátorem v kombinaci se sondou ABDA byla akridinová oranž. Pro volbu optimální koncentrace AO byla nejprve změřena absorpční spektra roztoků obsahující AO v rozsahu koncentrací  $10^{-4}$  M až  $10^{-6}$  M. Koncentrace AO, zvolená pro experimenty s  $10^{-4}$  M sondou ABDA, byla  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Pro ověření chování systému při ozařování vyššími toky fotonů a zároveň širším rozsahem vlnových délek bylo provedeno ozařování roztoku Xe lampou spektrofluorimetru vlnovou délkou 490 nm po dobu 0 až 180 minut, se šířkou štěrby excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm bandpass. Následné experimenty již byly prováděny se šířkou štěrby excitačního monochromátoru nastavenou na 1 nm bandpass. Provedeno bylo ozařování 3 ml roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO, v křemenné kyvetě, vlnovou délkou 490 nm po dobu 0 až 180 minut. Po každém ozařovacím intervalu byla měřena absorpční a emisní spektra roztoku. Obdobně jako se systémem RB se sondou ABDA bylo rovněž provedeno ozařování výše popsaného roztoku AO a sondy ABDA s přídávkem  $10^{-2}$  M,  $10^{-3}$  M a  $10^{-4}$  M  $\text{NaN}_3$ , po dobu 0 až 90 minut za použití stejného nastavení spektrofluorimetru, jako bylo popsáno výše. Po každém dílčím ozařování byla měřena absorpční a emisní spektra.

## 4 Vyhodnocení a diskuze

### 4.1 Charakteristika sondy ABDA

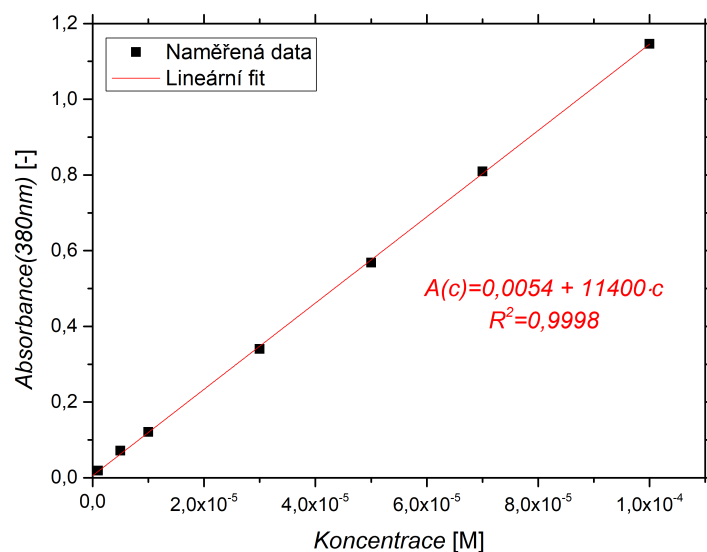
#### 4.1.1 Závislost absorbance na koncentraci

Absorpční spektra roztoků sondy ABDA s koncentracemi v rozmezí  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M jsou uvedena v grafu na obrázku 4.1. Dle očekávání s rostoucí koncentrací dochází k nárůstu absorbance.



Obr. 4.1: Závislost absorbance na vlnové délce pro různé koncentrace sondy ABDA

Z grafu na obrázku 4.2, který znázorňuje závislost absorbance při 380 nm na koncentraci, je zjevné, že ve zkoumaném rozsahu je nárůst absorbance s koncentrací lineární. Vzhledem k tomu, že optická dráha byla v tomto případě rovná 1 cm, představuje směrnice přímky, jíž byla proložena data, molární extinkční koeficient. Hodnota tohoto koeficientu  $11400 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  je blízká hodnotě  $11990 \pm 60 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , která je uváděna v článku Entradas et al. (2020).

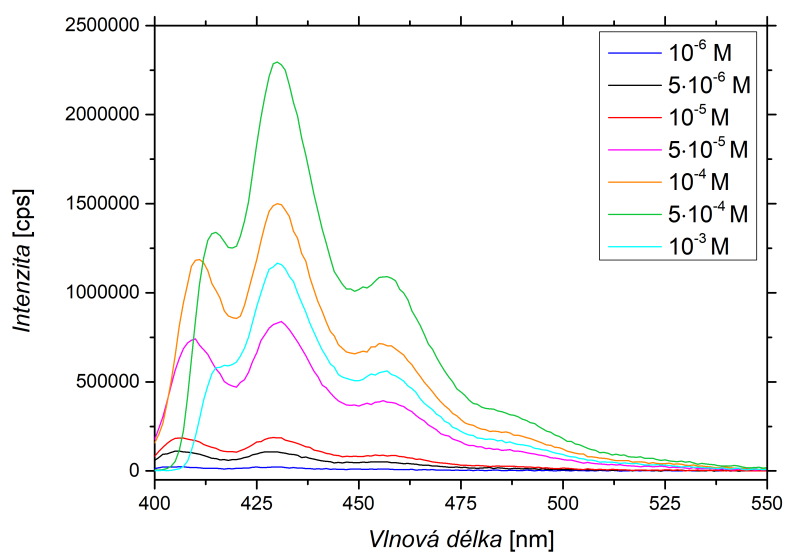


Obr. 4.2: Závislost absorbance při 380 nm na koncentraci sondy ABDA

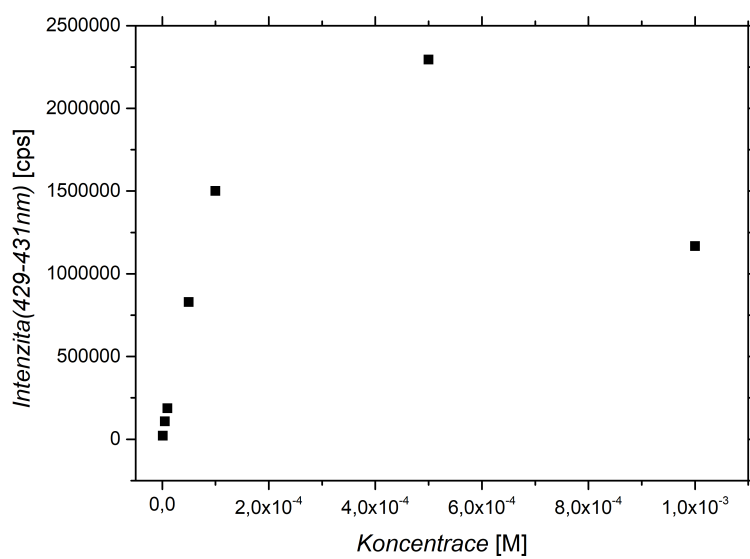
#### 4.1.2 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci

V grafu na obrázku 4.3 jsou uvedena emisní spektra roztoků sondy ABDA o koncentracích  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  M. Z grafu je zřetelné, že se s rostoucí koncentrací zvyšuje intenzita fluorescence a současně dochází k posunu maxima při 410 nm. K posunu maxima dochází u koncentrací vyšších než  $5 \cdot 10^{-4}$  M a nové maximum je při 415 nm. S tímto posunem se také mění poměr intenzit prvního a druhého maxima vůči sobě.

Z grafu na obrázku 4.4 je zřetelné, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci jen pro koncentrace nižší než  $10^{-4}$  M. Při vyšších koncentracích sondy dochází k výrazným odchylkám od lineární závislosti. Tyto odchylky mohou být způsobeny koncentračním samozhášením či reabsorpcí fluorescence spojenou s vysokými absorbancemi roztoků.



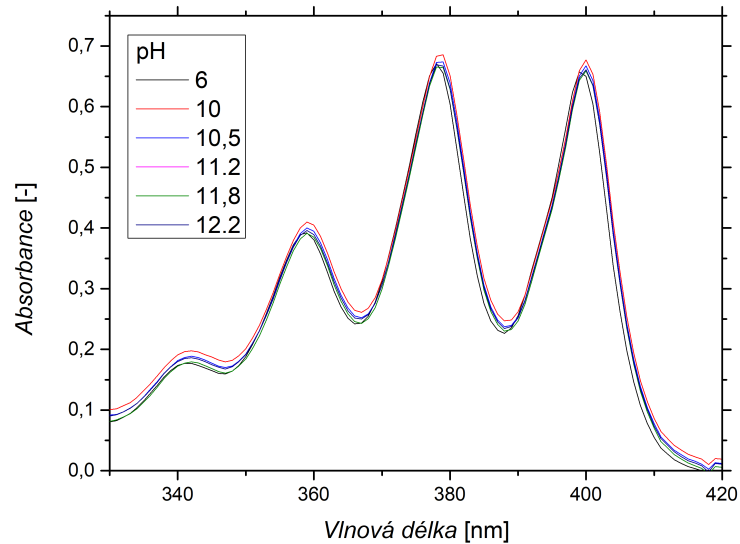
Obr. 4.3: Závislost intenzity fluorescence sondy ABDA na vlnové délce pro různé koncentrace



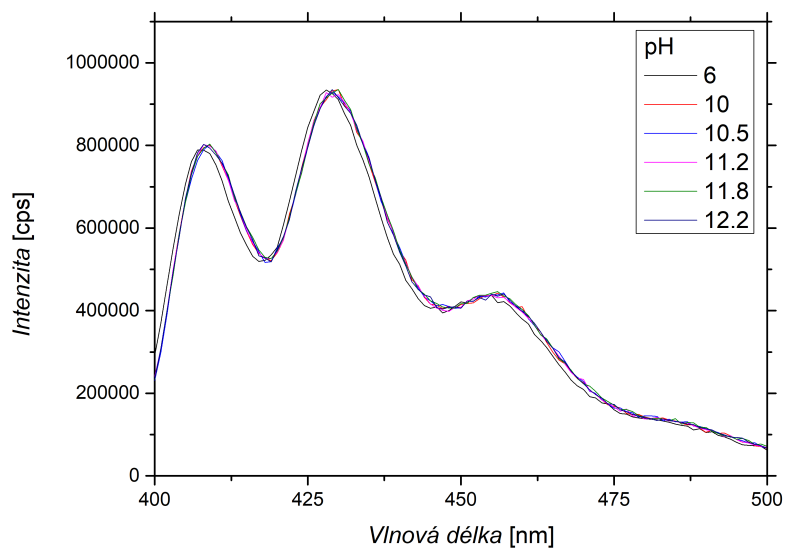
Obr. 4.4: Závislost intenzity fluorescence sondy ABDA při vlnové délce 429–431 nm na koncentraci

### 4.1.3 Vliv pH na absorpční a emisní spektra

Z grafů na obrázcích 4.5 a 4.6 vyplývá, že přidavky roztoku NaOH, a tedy zvyšování pH až do hodnoty 12,2, mají zcela minimální vliv na absorpční i emisní spektrum sondy ABDA. V zásadité oblasti tedy zjevně nedochází ke změnám sondy, které by se projevíly na jejích absorpčních a emisních spektrech.

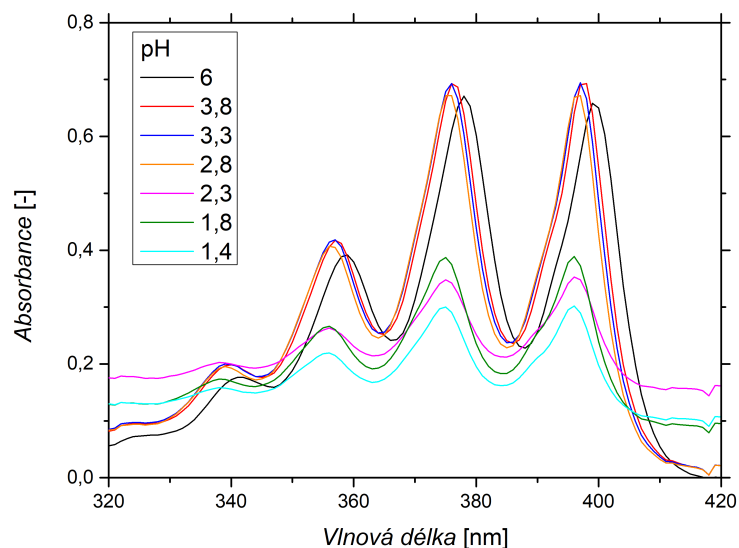


Obr. 4.5: Závislost absorbance sondy ABDA na vlnové délce pro zásadité hodnoty pH

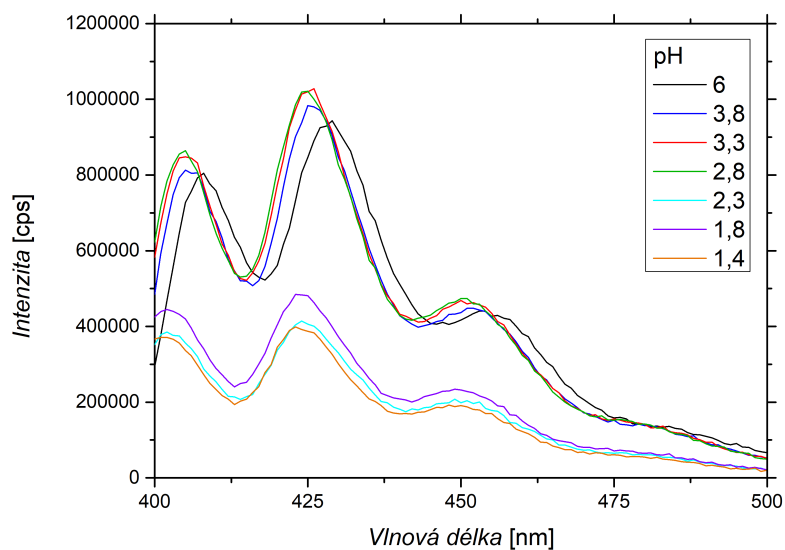


Obr. 4.6: Závislost intenzity fluorescence sondy ABDA na vlnové délce pro zásadité hodnoty pH

Naopak při poklesu pH nedochází k výrazným změnám jen do hodnoty pH 2,8. Při nižších hodnotách pH již dochází k výraznému poklesu absorbance i intenzity emise a v případě emisních spekter dochází k mírnému posunu prvního maxima ke kratším vlnovým délkám. Při nízkých hodnotách pH tedy zjevně dochází k určité „degradaci“ sondy. Tyto skutečnosti prezentují grafy na obrázcích 4.7 a 4.8.

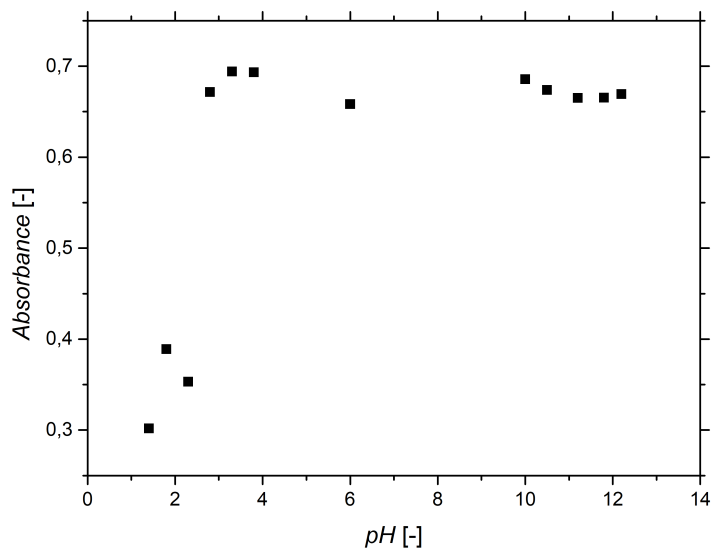


Obr. 4.7: Závislost absorbance sondy ABDA na vlnové délce pro kyselé pH



Obr. 4.8: Závislost intenzity fluorescence sondy ABDA na vlnové délce pro kyselé pH

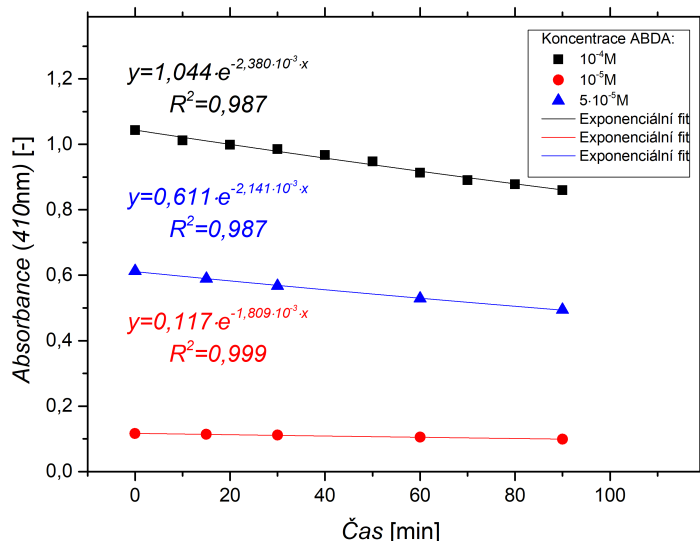
Průběh závislosti absorpance při 380 nm na pH, uvedené v grafu na obrázku 4.9, připomíná sigmoidální křivku. Vzhledem k tomu, že sonda ABDA je kyselinou, mělo by být možné z obdobné závislosti určit její disociační konstanty, avšak vzhledem k velikosti kroku mezi jednotlivými hodnotami pH nelze toto z tohoto stanovení provést.



Obr. 4.9: Závislost absorpance sondy ABDA při vlnové délce 380 nm na hodnotě pH

#### 4.1.4 Úbytek sondy ABDA při ozařování

Další charakteristikou, která byla u sondy ABDA sledována, byla její degradace během ozáření při nepřítomnosti fotosenzibilizátoru. Protože během ozařování vlnovou délkou 549 nm docházelo k minimálnímu rozkladu sondy ABDA, byla studována rychlost poklesu absorbance při ozařování v závislosti na počáteční koncentraci sondy. Vzhledem k nepřítomnosti dalších zjevných reaktantů v systému a zdánlivě lineárnímu poklesu absorbance, a tedy koncentrace sondy, byla tato reakce v minulosti popisována jako reakce nultého řádu. Reakce nultého řádu se vyznačují lineárním poklesem koncentrace reaktantu a nezávislostí rychlosti tohoto poklesu na počáteční koncentraci. Během experimentů bylo zjištěno, že rychlost poklesu absorbance zjevně závisí na původní koncentraci sondy ABDA v roztoku, což je prezentováno v grafu na obrázku 4.10. Na základě těchto faktů je pravděpodobnější, že reakce rozkladu sondy ABDA je reakcí prvního řádu a během provedených experimentů byla pozorována pouze počáteční část exponenciální závislosti.



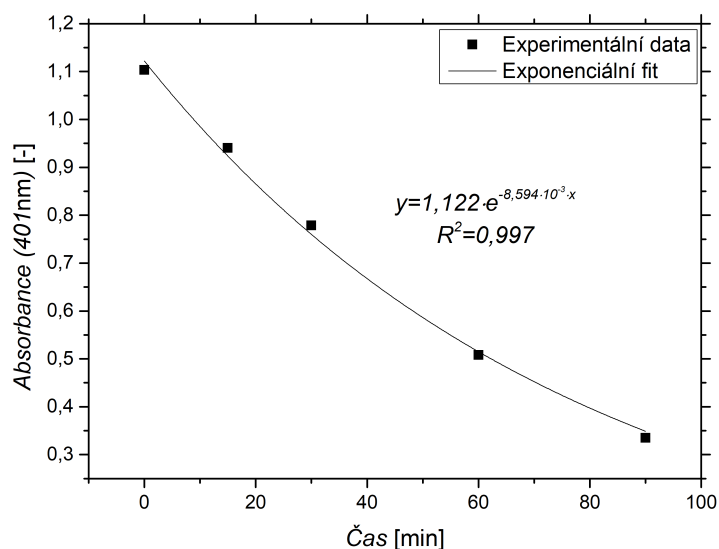
Obr. 4.10: Závislost absorbance sondy ABDA při 401 nm na čase ozařování vlnovou délkou 549 nm s šířkou štěrbinou excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm bandpass pro různé koncentrace

#### 4.1.5 Vliv rentgenového záření na sondu ABDA

Jak je zjevné ze všech zde uvedených informací, akridinová oranž má ve srovnání s dalšími konvenčně užívanými fotosenzibilizátory, jako je například v této práci uváděná bengálská červeň, výrazně horší vlastnosti pro produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Z tohoto důvodu byl zájem o ni vyvolán především možností jejího využití jakožto radiosenzibilizátoru. Pro vyhodnocení výsledků ozařování roztoku sondy ABDA a AO rentgenovým



zářením byla nejprve vyhodnocena vhodnost sondy pro detekci  $^1\text{O}_2$  generovaného tímto způsobem. Dávkový příkon při ozařování činil přibližně 160 Gy/h (Hošnová et al., 2022). Závislost absorpance při 401 nm, roztoku sondy, v závislosti na délce ozařování jsou uvedena v grafu na obrázku 4.11. Jak z grafu zřejmé, k významnému poklesu absorpance sondy při ozařování rentgenovým zářením dochází i při absenci radiosenzibilizátoru v roztoku. Je možné, že v roztoku dochází procesem radiolýzy vody ke vzniku řady reaktivních částic, z nichž některé pravděpodobně reagují se sondou ABDA, za poskytnutí stejné odezvy, jako v případě její reakce s  $^1\text{O}_2$ . Snaha detekovat  $^1\text{O}_2$  sondou ABDA za těchto podmínek tedy bude značně komplikována touto skutečností.



Obr. 4.11: Závislost absorpance při 401 nm, roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA, na době ozařování RTG zářením

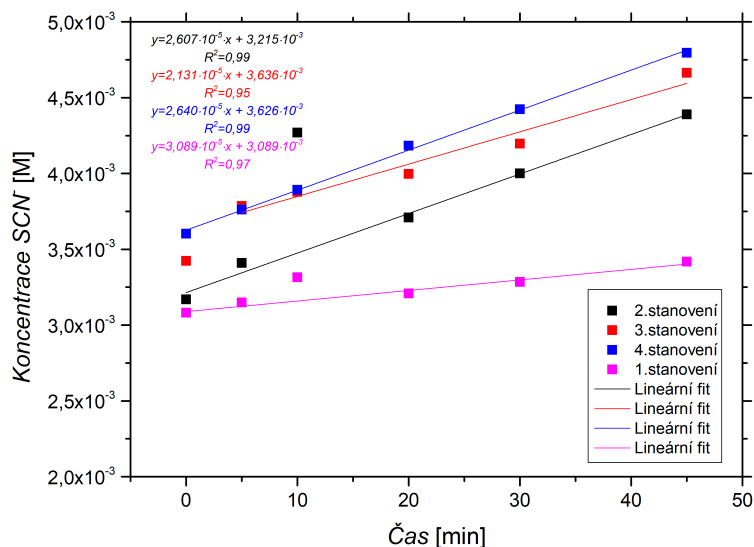
## 4.2 Stanovení charakteristik zdrojů záření

### 4.2.1 Stanovení toku fotonů Xe lampy při 545 nm

Protože 0,15 M ferrioxalátový aktinometr má velmi nízkou absorpaci při vlnové délce 546 nm, nebylo možné tento aktinometr použít ke stanovení toku fotonů. Proto byl zvolen aktinometr využívající Reineckovu sůl ( $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2]$ ), který je založen na reakci popsané rovnicí 4.1. Koncentrace vzniklých  $\text{SCN}^-$  iontů je stanovována spektrofotometricky za pomoci přídatku  $\text{Fe}^{3+}$  iontů, což vede ke vzniku červeně zbarvených komplexů (Radjagobalou et al., 2019).



Kvantový výtěžek 0,286 aktinometru pro vlnovou délku 545 nm byl převzat z práce Wegner et al. (1958), molární extinkční koeficient měřeného roztoku  $3400 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  potom z práce Radjagobalou et al. (2019). Hodnoty absorbance při vlnové délce 450 nm byly prostřednictvím výše uvedeného molárního extinkčního koeficientu, s přihlédnutím na zředění původně ozařovaného roztoku, přepočítány na koncentraci  $\text{SCN}^-$  iontů.



Obr. 4.12: Závislost koncentrace  $\text{SCN}^-$  iontů na době ozařování

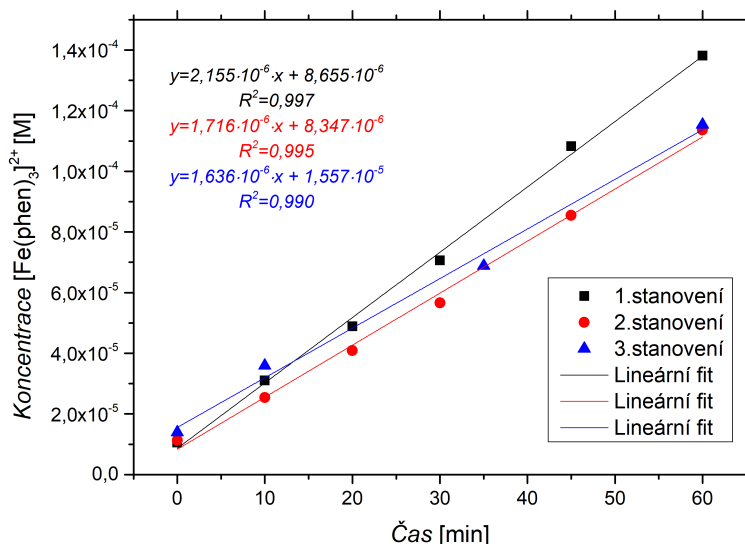
Hodnoty závislosti koncentrace  $\text{SCN}^-$  iontů na době ozařování byly vyneseny do grafu, viz obrázek 4.12. Data byla proložena přímkami. Pomocí směrnic těchto přímk a kvantového výtěžku byly vypočteny toky fotonů pro jednotlivá stanovení. Výsledek prvního ze čtyř stanovení byl natolik odlišný, že nebyl započítán do výsledného průměru. Pro větší správnost vypočítané hodnoty bylo nutné provést korekci na skutečnost, že aktinometr z Reineckovy soli absorbuje při vlnové délce 545 nm 98 % dopadajícího záření. Průměrný tok fotonů Xe lampy při 545 nm po provedení korekce na absorbanci roztoku aktinometru byl určen jako  $(2,760 \pm 0,083) \cdot 10^{15}$  fot/s.

Tab. 4.1: Toky fotonů při 545 nm určené pomocí aktinometru z Reineckovy soli

Stanovení	Tok fotonů [fot/s]	Průměr	chyba
1.	$7,515 \cdot 10^{14}$	-	-
2.	$2,836 \cdot 10^{15}$	$2,760 \cdot 10^{15}$	$8,308 \cdot 10^{13}$
3.	$2,594 \cdot 10^{15}$		
4.	$2,849 \cdot 10^{15}$		

#### 4.2.2 Stanovení toku fotonů Xe lampy při 480 nm

Stanovení toku fotonů při vlnové délce 480 nm bylo provedeno pomocí ferrioxalátového aktinometru. Princip aktinometru spočívá ve spektrofotometrickém sledování nárůstu koncentrace  $\text{Fe}^{2+}$  iontů, které jsou vázány v barevném komplexu s fenantrolinem  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ . Závislost koncentrace  $\text{Fe}^{2+}$  vypočtená pomocí Lambert-Beerova zákona na době ozařování byla vynesena do grafu zobrazeném na obrázku 4.13.



Obr. 4.13: Závislost koncentrace komplexu  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  na době ozařování

Hodnota molárního extinkčního koeficientu  $\epsilon([\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+})^{510\text{nm}} = 11100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  měřeného roztoku byla převzata z Čuba et al. (2018), hodnota kvantového výtěžku 0,93 byla převzata z práce Heath (1956). Pomocí těchto hodnot byly vypočteny toky fotonů uvedené v tabulce

4.2. Změřením absorpance neozářeného roztoku 0,15 M ferrioxalátového aktinometru bylo zjištěno, že aktinometr absorbuje při vlnové délce 480 nm pouze 39% celkového světla produkovaného lampou. Hodnota průměrného toku fotonů při 480 nm  $(1,521 \pm 0,134) \cdot 10^{14}$  fot/s představuje hodnotu korigovanou na absorpaci roztoku aktinometru.

Tab. 4.2: Toky fotonů při 480 nm určené pomocí ferrioxalátového aktinometru

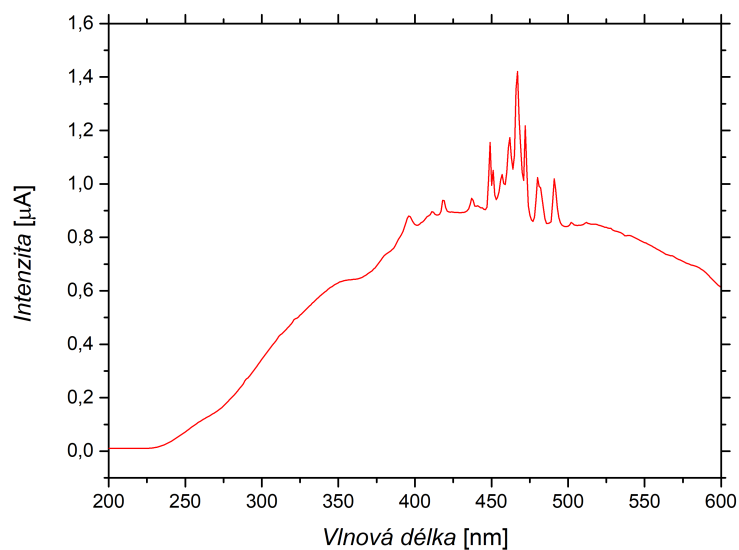
Stanovení	Tok fotonů [fot/s]	Průměr	chyba
1.	$1,356 \cdot 10^{14}$	$1,521 \cdot 10^{14}$	$1,337 \cdot 10^{13}$
2.	$1,786 \cdot 10^{14}$		
3.	$1,422 \cdot 10^{14}$		

### 4.2.3 Stanovení toku fotonů Xe lampy při 490 nm a při 549 nm

Chemické aktinometry využívané v této práci mají v literatuře kvantové výtěžky pro dané vznikající specie určené pouze pro určité diskrétní vlnové délky. Z tohoto důvodu nebyla aktinometrická stanovení prováděna přímo pro vlnové délky využívané pro ozařování vzorků, nýbrž pro vlnové délky jim blízké, pro něž jsou definovány kvantové výtěžky. V případě bengálské červeně je ozařování prováděno vlnovou délkou 549 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu tohoto fotosenzibilizátoru. V případě akridinové oranže potom 490 nm, což odpovídá jejímu absorpčnímu maximu.

#### Stanovení toku fotonů Xe lampy při 549 nm

Pro možnou kvantifikaci množství vznikajícího  $^1\text{O}_2$  bylo tedy nutno vzít v potaz skutečnost, že ozařování vzorků bylo prováděno vlnovou délkou 549 nm. Spektrum záření použité Xe lampy, zaznamenané referenčním detektorem spektrofluorimetru, je na obrázku 4.14. Při vlnové délce 549 nm je tok fotonů přibližně o 1,55 % nižší než při vlnové délce 545 nm, pro kterou byla provedena aktinometrie. Na základě těchto údajů lze tedy z velikosti toku fotonů při 545 nm určit hodnotu toku fotonů při 549 nm jako  $(2,704 \pm 0,081) \cdot 10^{15}$  fot/s.



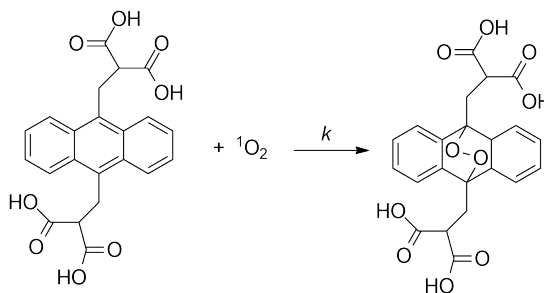
Obr. 4.14: Spektrum záření Xe lampy spektrofluorimetru naměřené jeho referenčním detektorem

#### Stanovení toku fotonů Xe lampy při 490 nm

Stejným způsobem, jako pro 549 nm, byla vypočítána velikost toku fotonů při 490 nm na základě hodnoty získané pomocí ferrioxalátového aktinometru. Na základě spektra na obrázku 4.14 lze předpokládat, že tok fotonů při 490 nm bude o 8,74% menší, než tok fotonů při 480. Takto byla hodnota toku fotonů při 490 nm určena jako  $(1,388 \pm 0,122) \cdot 10^{13}$  fot/s.

### 4.3 Kinetika reakce sondy se singletovým kyslíkem

Sonda ABDA reaguje s  $^1\text{O}_2$  za vzniku příslušného endoperoxidu, tuto reakci znázorňuje schema na obrázku 4.15.



Obr. 4.15: Schema reakce  $^1\text{O}_2$  se sondou ABDA

Na základě tohoto schematu lze časovou změnu koncentrace sondy ABDA popsat rovnicí 4.2. Pokles koncentrace, a tedy i absorpance sondy, by tedy měl záviset na koncentraci obou reagujících komponent.

$$\frac{d[\text{ABDA}]}{dt} = -k[\text{ABDA}][{}^1\text{O}_2] \quad (4.2)$$

Předpokládáme, že na vzorek dopadal po celou dobu ozařování každou sekundu stejný počet fotonů. Zároveň počet dopadajících fotonů za sekundu byl menší než počet molekul RB či AO dostupných pro excitaci. Počet molekul fotosenzibilizátoru byl vyšší po celou dobu ozařování, vzhledem k tomu, že za daných podmínek bylo odbarvování molekul fotosenzibilizátorů minimální. Na základě těchto faktů se tedy zdá, že koncentrace  ${}^1\text{O}_2$  v systému byla konstantní, vzhledem k tomu, že  ${}^1\text{O}_2$  deaktivovaný sondou, rozpouštědlem, nebo fosforescencí byl průběžně nahrazován fotosenzibilizační reakcí. Za tohoto předpokladu by reakce sondy ABDA s  ${}^1\text{O}_2$  byla pseudomonomolekulární a řídila by se kinetikou prvního řádu. Koncentrace sondy by pak, tak jak bylo pozorováno, klesala s exponenciální závislostí, což popisuje rovnice 4.3.

$$\frac{d[\text{ABDA}]}{dt} = -k'[\text{ABDA}], \text{ kde } k' = k[{}^1\text{O}_2] \quad (4.3)$$

Na základě těchto úvah je zřejmé, že rychlostní konstanty vyplývající z fitů experimentálních dat v grafu 4.16, nejsou skutečnými rychlostními konstantami, ale součiny skutečných rychlostních konstant s koncentrací  ${}^1\text{O}_2$ .

## 4.4 Produkce singletového kyslíku bengálskou červení

### 4.4.1 Použití $\text{NaN}_3$

Experimenty byly prováděny s různými koncentracemi  $\text{NaN}_3$  pro posouzení vlivu množství  $\text{NaN}_3$  v roztoku na reakci  ${}^1\text{O}_2$  se sondou ABDA. Na základě informací zprostředkovaných výše v teoretické části práce lze předpokládat, že  $\text{NaN}_3$  významně nevstupuje do procesu vzniku  ${}^1\text{O}_2$ . Všechna naměřená data v souladu s literaturou indikují schopnosti  $\text{NaN}_3$  zabránit reakci sondy ABDA s  ${}^1\text{O}_2$  prostřednictvím zhášení  ${}^1\text{O}_2$ . Konkrétně efekt různých koncentrací  $\text{NaN}_3$  na ozařovaný systém RB a sondy ABDA představuje graf na obrázku 4.16. Ač není z grafu zjevné, s jakou závislostí koncentrace sondy klesá, byla pro vzorky obsahující RB zvolena exponenciální závislost. Tato volba byla učiněna na základě předchozí práce s tímto systémem, jak ilustruje graf na obrázku 4.17.

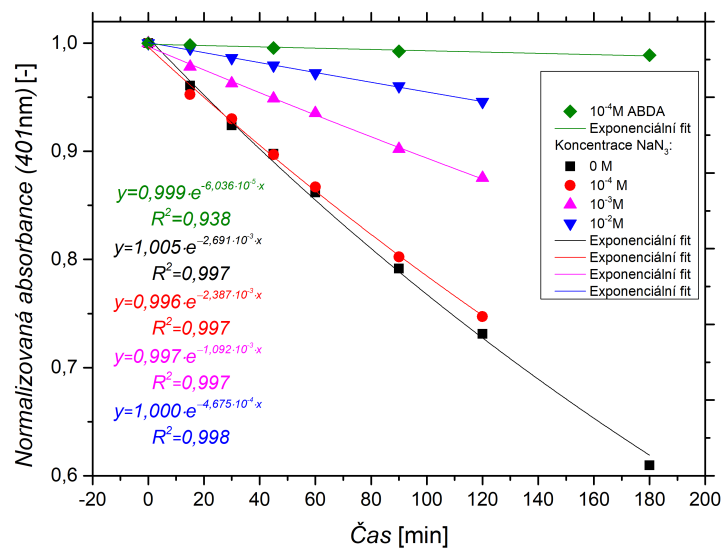
Z grafu na obrázku 4.16 je zjevné, že nejnižší koncentrace  $10^{-4}$  M  $\text{NaN}_3$  nemá velký zhášecí účinek. Naopak  $10^{-2}$  M  $\text{NaN}_3$  má značený zhášecí účinek ačkoliv zhá-

šení není 100%, protože absorbance sondy klesá stále rychleji, než je tomu u vzorku bez fotosenzibilizátoru RB.

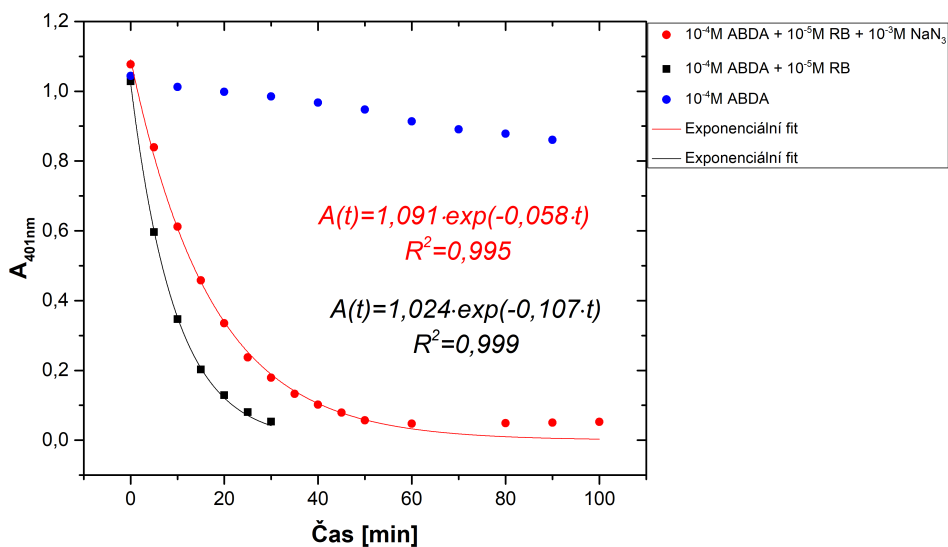
Na základě výsledků aktinometrie lze předpokládat, že na roztoky během 2 hodin ozařování dopadlo přibližně  $1,931 \cdot 10^{19}$  fotonů. Zároveň za využití molárního extinkčního koeficientu sondy ABDA ( $11990 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Entradas et al., 2020)), lze pomocí úbytku její absorbance vypočítat úbytek její koncentrace. Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v tabulce 4.3. Jak je zjevné, při ozařování roztoku obsahujícího pouze sondu ABDA po 120 minut, byl zaznamenán úbytek menší než 1 %. Naopak přítomnost fotosenzibilizátoru RB, při stejných podmínkách ozařování, vede k téměř čtvrtinovému úbytku sondy. Podobný výsledek je zaznamenán u roztoku, který obsahuje  $10^{-4} \text{ M NaN}_3$  a tato koncentrace je tedy zjevně příliš nízká pro efektivní zhášení  $^1\text{O}_2$ .

Tab. 4.3: Úbytek absorbance při 401 nm po 120 minutách ozařování, úbytek koncentrace sondy ABDA vypočítaný z úbytku absorbance a úbytek koncentrace sondy oproti výchozí koncentraci, vyjádřený v procentech

Složení roztoku	$\Delta A_{401 \text{ nm}} [-]$	$\Delta c [\text{M}]$	% c ABDA (zreagované)
$10^{-5} \text{ M RB} + 10^{-4} \text{ M ABDA}$	$2,94 \cdot 10^{-1}$	$2,45 \cdot 10^{-5}$	24,50
$10^{-5} \text{ M RB} + 10^{-4} \text{ M ABDA} + 10^{-4} \text{ M NaN}_3$	$2,77 \cdot 10^{-1}$	$2,31 \cdot 10^{-5}$	23,12
$10^{-5} \text{ M RB} + 10^{-4} \text{ M ABDA} + 10^{-3} \text{ M NaN}_3$	$1,42 \cdot 10^{-1}$	$1,18 \cdot 10^{-5}$	11,80
$10^{-5} \text{ M RB} + 10^{-4} \text{ M ABDA} + 10^{-2} \text{ M NaN}_3$	$6,26 \cdot 10^{-2}$	$5,22 \cdot 10^{-6}$	5,22
$10^{-4} \text{ M ABDA}$	$9,00 \cdot 10^{-3}$	$7,51 \cdot 10^{-7}$	0,75



Obr. 4.16: Závislost absorbance při 401 nm roztoků obsahujících  $10^{-4}$  M sondu ABDA a  $10^{-4}$  M sondu ABDA spolu s  $10^{-5}$  M RB, s různými koncentracemi  $\text{NaN}_3$



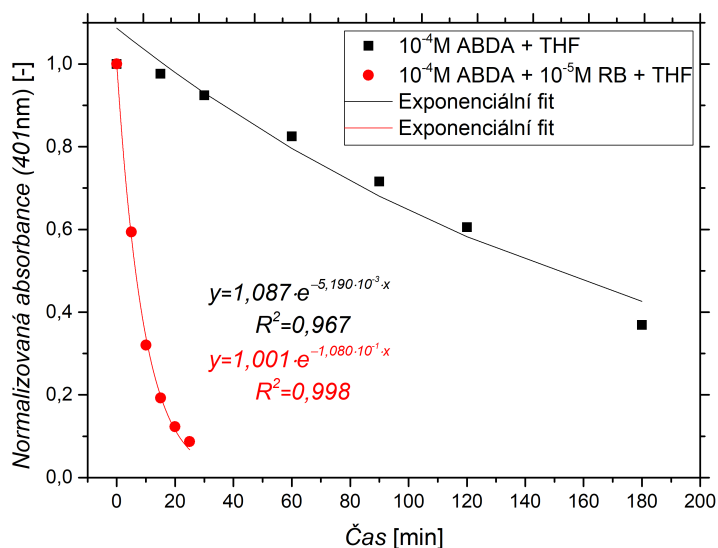
Obr. 4.17: Srovnání závislostí absorbance při 401 nm roztoků  $10^{-4}$  M ABDA a  $10^{-5}$  M RB,  $10^{-4}$  M ABDA,  $10^{-5}$  M RB a  $10^{-3}$  M  $\text{NaN}_3$  a  $10^{-4}$  M ABDA na délce ozařování (Havlinová, 2020)



## 4.4.2 Použití $\beta$ -karotenu

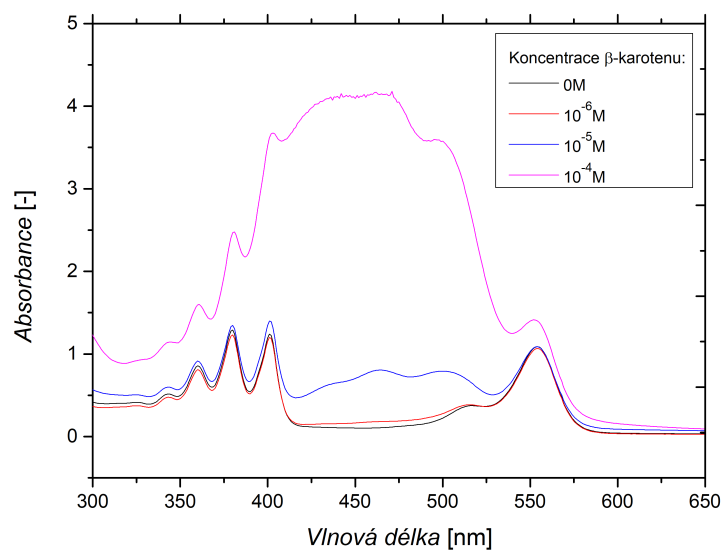
Na rozdíl od  $\text{NaN}_3$   $\beta$ -karoten absorbuje ve viditelné části spektra, což omezuje koncentrace použitelné v kombinaci s chemickými sondami. Současně  $\beta$ -karoten není rozpustný ve vodě, proto pro experimenty s tímto zhasěčem byla místo vody použita směs vody s THF.

Experimenty s roztoky sondy ABDA a RB spolu s THF a šterbinou excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm bandpass ukázaly, že absorbance sondy klesá se stejnými trendy jako v případě absence THF. Tento fakt prezentuje graf na obrázku 4.18.



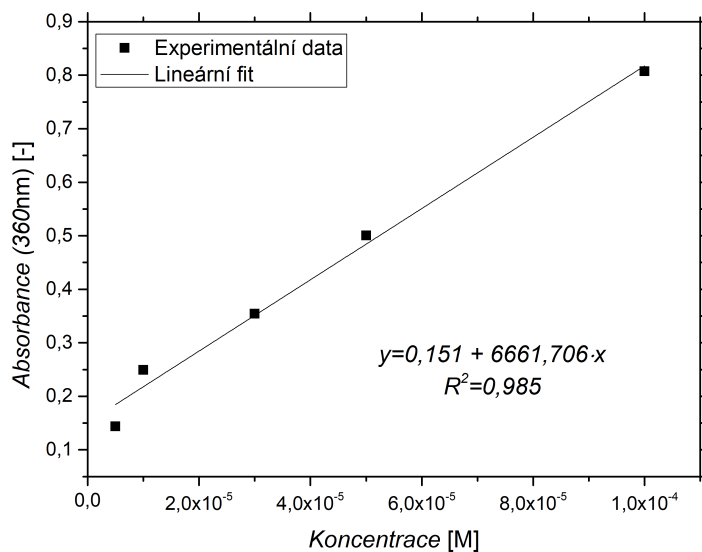
Obr. 4.18: Závislost absorbance sondy ABDA na délce ozařování pro roztoky  $10^{-4}$  M sondy ABDA s  $300 \mu\text{l}$  THF a  $10^{-4}$  M sondy ABDA s  $10^{-5}$  M RB a  $300 \mu\text{l}$  THF, při šířce štěrbinu 29 nm bandpass

V případě  $\beta$ -karotenu bylo zvoleno pro sledování reakce  $^1\text{O}_2$  se sondou ABDA maximum sondy při 360 nm, protože v roztoku obsahujícím  $10^{-4}$  M  $\beta$ -karoten zakrývalo jeho výrazné absorpční maximum dvě zbylá maxima sondy, což je zřetelné z absorpčních spekter uvedených na obrázku 4.19.



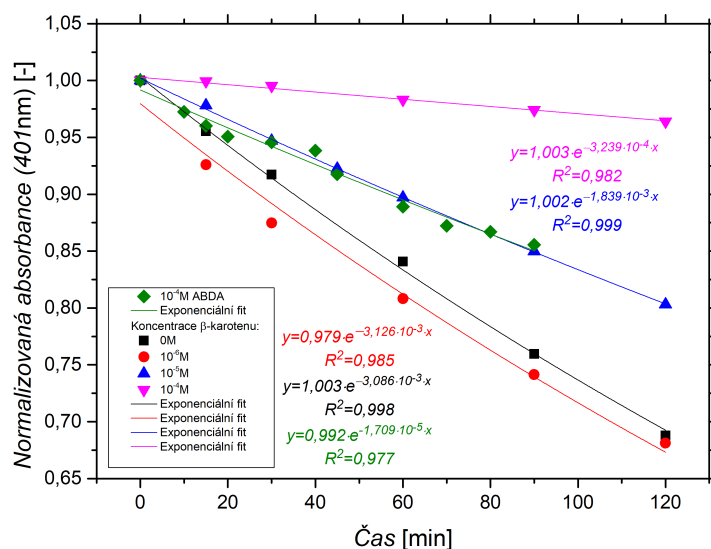
Obr. 4.19: Absorpční spektra roztoků 10<sup>-4</sup> M sondy ABDA a 10<sup>-5</sup> M RB obsahující různé koncentrace β-karotenu

Pro srovnání úbytku sondy ABDA, obdobně jako to bylo provedeno v případě experimentů s NaN<sub>3</sub>, bylo nutné určit molární extinkční koeficient sondy ABDA pro 360 nm pro použitou směs rozpouštědel. Naměřené hodnoty absorbance pro různé koncentrace sondy byly proloženy přímkou, což je zobrazeno v grafu na obrázku 4.20. Z předpisu této přímky byl molární extinkční koeficient pro 360 nm určen jako 6661,706 ± 410,869 dm<sup>3</sup> · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>.



Obr. 4.20: Závislost absorbance sondy ABDA při 360 nm na její koncentraci

Průběh závislosti absorbance sondy ABDA na době ozařování v roztocích obsahujících různé koncentrace  $\beta$ -karotenu je uveden v grafu na obrázku 4.21. Pro srovnání jsou v tomto grafu rovněž uvedeny závislosti absorbance sondy v roztocích, které obsahovaly pouze sondu ABDA a sondu ABDA s RB ve stejné směsi rozpouštědel. Kvantifikaci úbytků absorbance, a tedy i koncentrace sondy ABDA, po 90 minutách ozařování shrnuje tabulka 4.4.



Obr. 4.21: Závislost absorbance při 401 nm roztoků obsahujících  $10^{-4}$  M sondu ABDA,  $10^{-5}$  M RB,  $300 \mu\text{l}$  THF a různé koncentrace  $\beta$ -karotenu

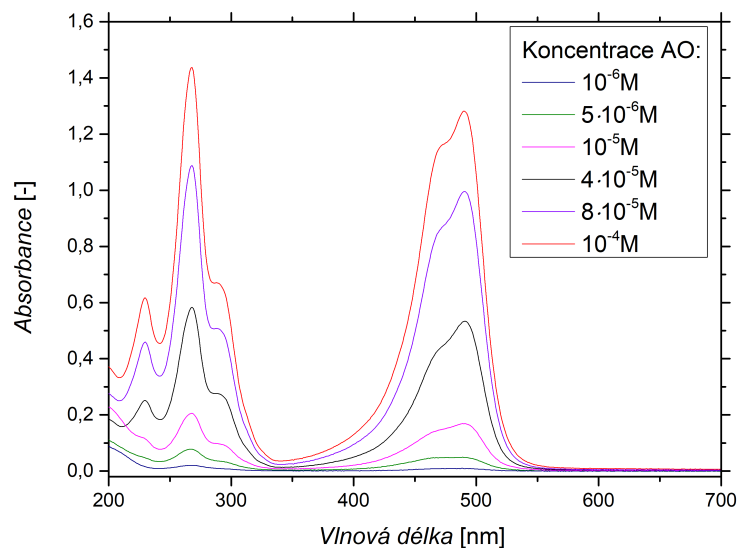
Tab. 4.4: Úbytek absorbance při 360 nm po 90 minutách ozařování, úbytek koncentrace sondy ABDA vypočítaný z úbytku absorbance a úbytek koncentrace sondy oproti výchozí koncentraci, vyjádřený v procentech

Složení roztoku	$\Delta A_{360 \text{ nm}} [-]$	$\Delta c [\text{M}]$	% c ABDA (zreagované)
$10^{-5}$ RB + $10^{-4}$ ABDA	$2,99 \cdot 10^{-1}$	$4,48 \cdot 10^{-5}$	44,84
$10^{-5}$ RB + $10^{-4}$ ABDA + $10^{-6}$ $\beta$ -karoten	$2,09 \cdot 10^{-1}$	$3,14 \cdot 10^{-5}$	31,40
$10^{-5}$ RB + $10^{-4}$ ABDA + $10^{-5}$ $\beta$ -karoten	$1,37 \cdot 10^{-1}$	$2,06 \cdot 10^{-5}$	20,61
$10^{-5}$ RB + $10^{-4}$ ABDA + $10^{-4}$ $\beta$ -karoten	$4,12 \cdot 10^{-2}$	$6,18 \cdot 10^{-6}$	6,18
$10^{-4}$ ABDA	$9,26 \cdot 10^{-2}$	$1,39 \cdot 10^{-5}$	13,90

Vezmeme-li v potaz úvahu z kapitoly 4.3, potom rychlostní konstanty vycházející z exponenciálních fitů experimentálních dat opět představují součin skutečných rychlostních konstant a koncentrace  $^1\text{O}_2$ . Vzhledem ke stejnému použitému fotosenzibilizátoru a stejnému nastavení ozařování, lze předpokládat, že vznikající množství  $^1\text{O}_2$  v systému bylo stejné, jako v případě experimentů s  $\text{NaN}_3$ . Rozdílným faktorem u roztoků obsahujících  $\beta$ -karoten je přítomnost THF. Pro THF je udávána doba života  $^1\text{O}_2$   $20 \mu\text{s}$ , zatímco pro vodu jsou uváděny  $2 \mu\text{s}$  (Sagadevan et al., 2017). Vzhledem k tomu, že u vzorků je majoritním rozpouštědlem stále voda a obsahují pouze  $300 \mu\text{l}$  THF v 3 ml, nebude rozdíl doby života takto významně odlišný od doby života  $^1\text{O}_2$  ve vodě, jako je doba života v čistém THF. Čistě srovnáním poklesu absorbance sondy v přítomnosti  $\text{NaN}_3$  a  $\beta$ -karotenu je zjevné, že  $\beta$ -karoten chrání sondu před oxidací efektivněji než  $\text{NaN}_3$  a to i při nižších koncentracích. Nevýhodou  $\beta$ -karotenu oproti  $\text{NaN}_3$  je jeho nerozpustnost ve vodě. Na rozdíl od  $\beta$ -karotenu je však  $\text{NaN}_3$  nevhodný pro aplikace v živých systémech vzhledem k jeho toxicitě.

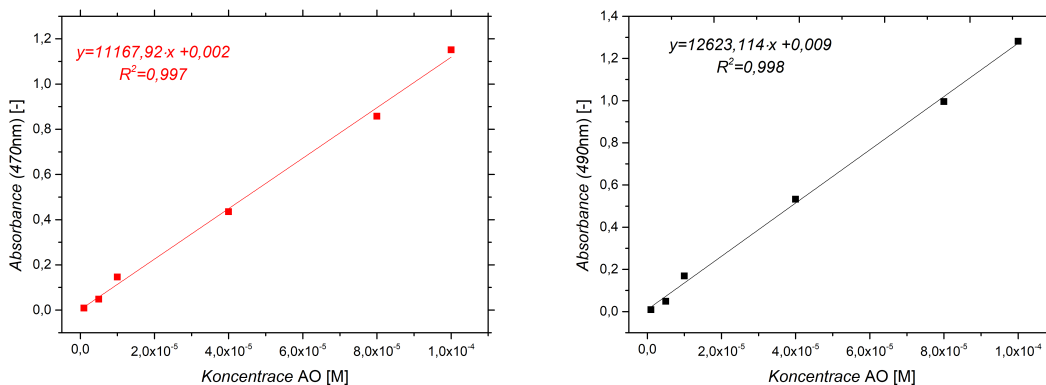
## 4.5 Produkce singletového kyslíku akridinovou oranží

V absorpčních spektrech akridinové oranže, uvedených v grafu na obrázku 4.1, je viditelné maximum při 490 nm. Méně výrazné boční maximum při vlnové délce 470 nm představuje její dimer (Bhattacharjee et al., 2013).



Obr. 4.22: Absorpční spektra AO pro různé koncentrace

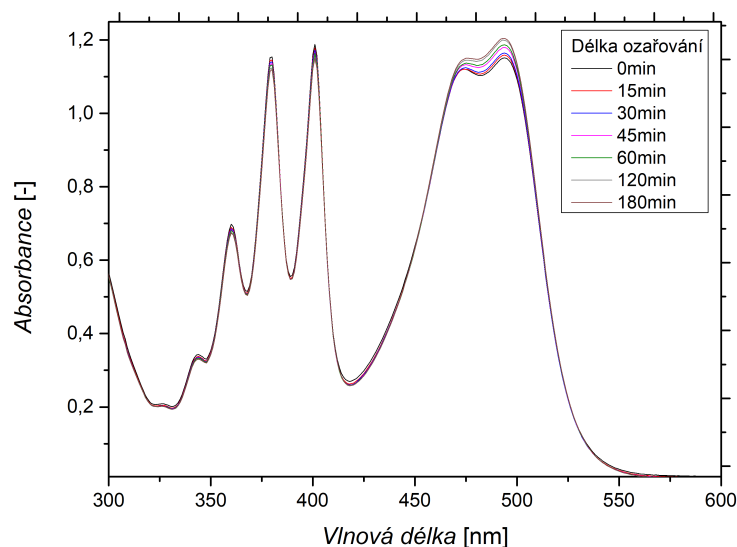
Absorbance při 490 nm i 470 nm roste lineárně, což je zřetelné z grafů na obrázcích 4.23a a 4.23b. Z proložení těchto dat přímkami lze získat hodnoty molárních extinkčních koeficientů pro dané vlnové délky a formy akridinové oranže. Pro 490 nm a tedy monomer AO hodnota tohoto koeficientu činí  $12623,13 \pm 284,27 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pro 470 nm a tedy dimer AO potom  $11167,92 \pm 331,12 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .



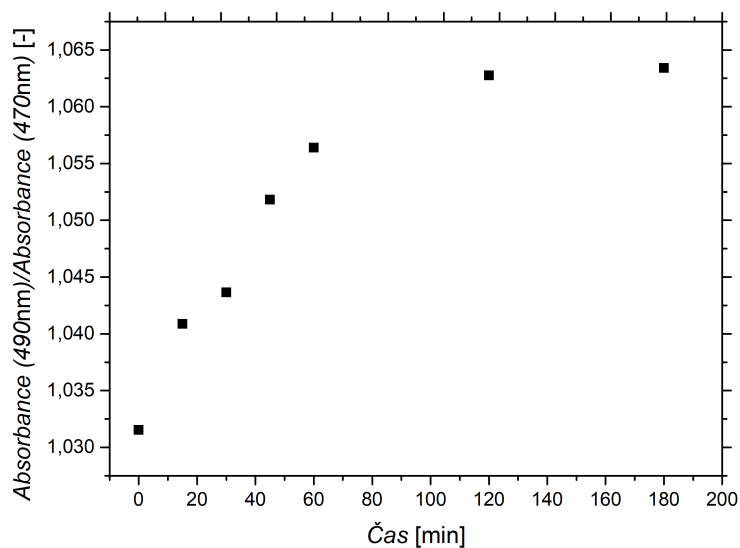
(a) Závislost absorbance AO při 470 nm na koncentraci AO  
 (b) Závislost absorbance AO při 490 nm na koncentraci AO

Obr. 4.23: Závislost absorbance AO při 470 a 490 nm na koncentraci AO

Jak je zřetelné z grafu na obrázku 4.24, který znázorňuje absorpční spektra roztoku AO a sondy ABDA v závislosti na době ozařování, nelze vyloučit existenci interakce mezi touto sondou a fotosenzibilizátorem, protože maximum dimeru AO je v těchto roztocích značně výraznější, než-li u roztoků obsahujících pouze AO. Rovněž oproti očekáváním dochází s prodlužujícím se časem ozařování k nárůstu absorbance AO. Poměr absorbance monomeru a dimeru, tedy poměr absorbancí při 490 nm a 470 nm s rostoucí dobou ozařování roste ve prospěch monomeru, což lze vidět v grafu na obrázku 4.25.

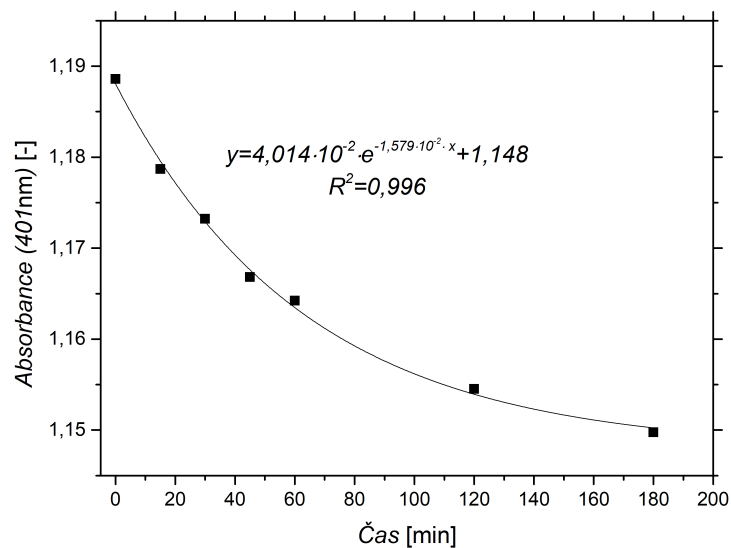


Obr. 4.24: Absorpční spektra ozařovaného roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO v závislosti na délce ozařování



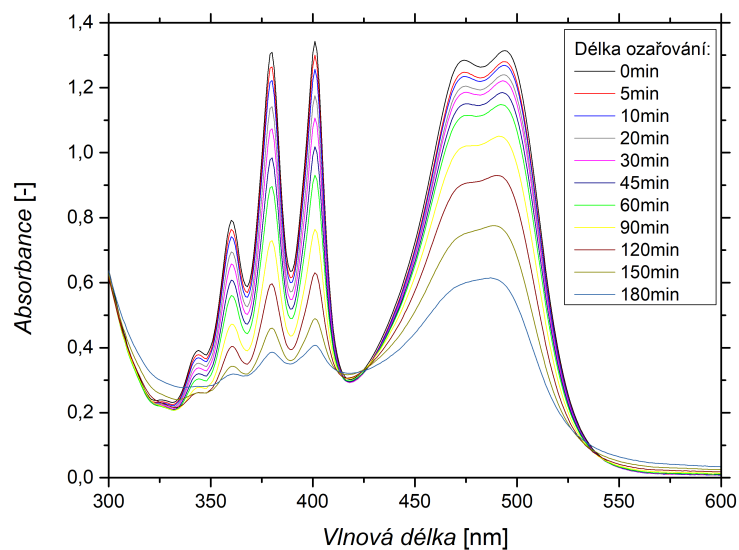
Obr. 4.25: Závislost poměru absorpance při 490 nm ku absorpaci při 470 nm na délce ozařování roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO

Samotná absorpance sondy ABDA při 401 nm klesá dle očekávání s exponenciální závislostí, jak je zřetelné z grafu uvedeného na obrázku 4.26. V porovnání s experimenty s RB a sondou ABDA je tento pokles pomalejší, což lze očekávat, vzhledem k výrazně nižšímu kvantovému výtěžku AO.

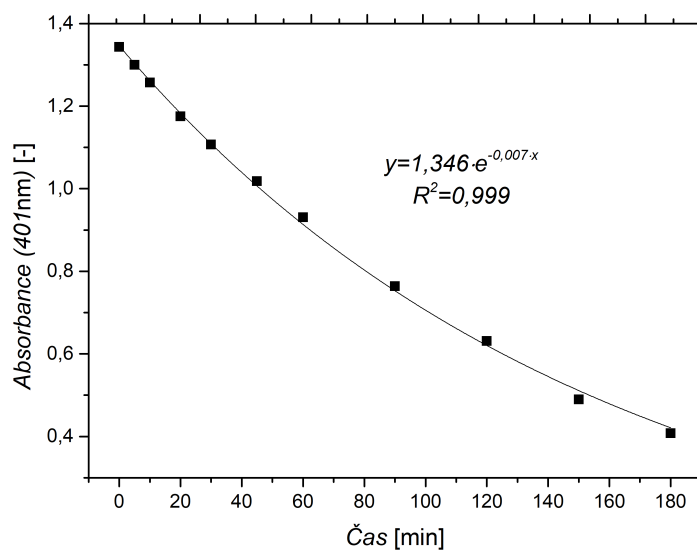


Obr. 4.26: Závislost absorpance při 401 nm na délce ozařování roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO

Obdobně jako bylo v minulosti provedeno s roztokem RB a sondy ABDA, byl i roztok AO a sondy ABDA ozařován se štěrbinou excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm bandpass pro pozorování vlivu vyšších toků fotonů na vzorek. Absorpční spektra tohoto roztoku v závislosti na době ozařování jsou uvedeny na obrázku 4.27. Z grafu na obrázku 4.28 je zřejmé, že absorbance sondy klesá rovněž s exponenciální závislostí. V tomto případě nebyl pozorován nárůst absorbance AO s ozařováním a její absorbance s rostoucí dobou ozařování dle očekávání klesala. Vyšší tok fotonů a tedy větší množství produkovaného  $^1\text{O}_2$  zjevně tento jev potlačil.



Obr. 4.27: Absorpční spektra roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO v závislosti na době ozařování, při štěrbině excitačního monochromátoru nastavené na 29 nm

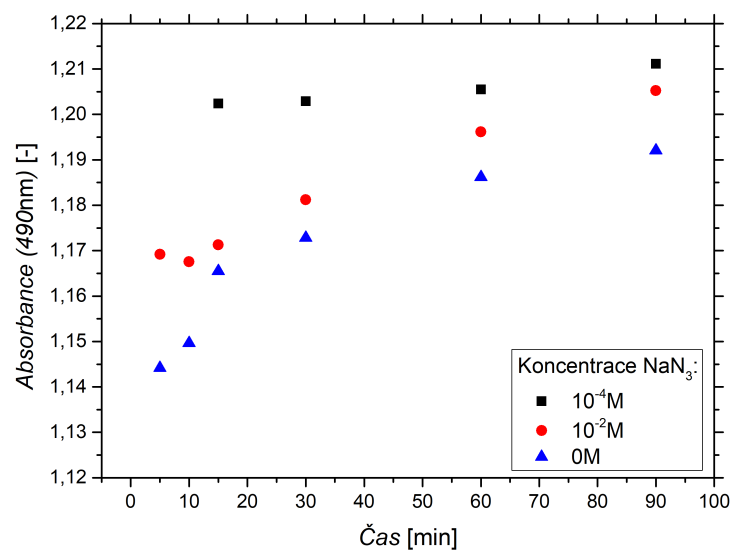


Obr. 4.28: Závislost absorpce při 401 nm, roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO, na čase, při ozařování se štěrbinou excitačního monochromátoru nastavenou na 29 nm

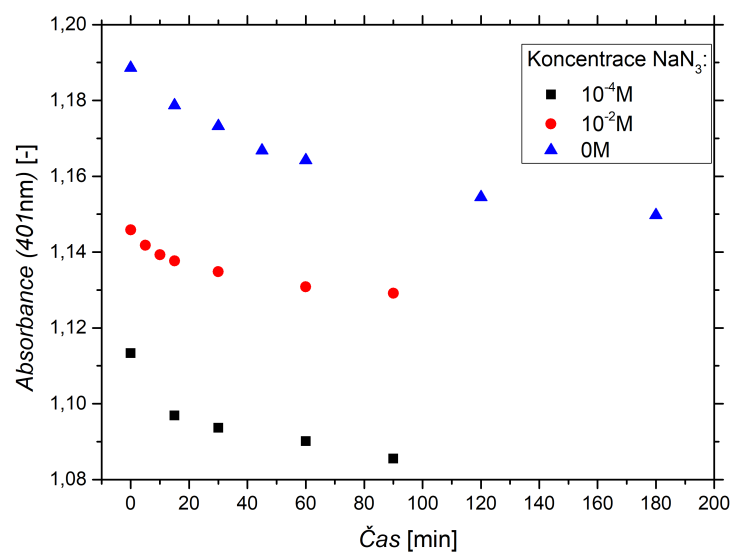
#### 4.5.1 Použití $\text{NaN}_3$

Pro srovnání s experimenty provedenými s RB, sondou ABDA a  $\text{NaN}_3$  byly provedeny experimenty s AO, sondou ABDA a s  $\text{NaN}_3$ . Graf uvedený na obrázku 4.29 znázorňuje změnu absorpce při 490 nm, tedy v absorpčním maximu AO, při ozařování. Jak je zjevné, přídavek  $\text{NaN}_3$  neeliminuje nárůst absorpce AO při ozařování, který byl pozorován u roztoků obsahujících pouze AO společně se sondou ABDA. Rovněž přídavkem  $\text{NaN}_3$  zjevně dochází k zvýšení absorpce neozářených vzorků. K obdobnému jevu dochází i u absorpce při 401 nm, která s ozařováním klesá, avšak přídavek  $\text{NaN}_3$  k neozářenému vzorku vede ke vzrůstu maximální absorpce, což znázorňuje graf na obrázku 4.30.





Obr. 4.29: Závislost absorbance při 490 nm na době ozařování roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO, obsahujícího různé koncentrace  $\text{NaN}_3$



Obr. 4.30: Závislost absorbance při 401 nm na době ozařování roztoku  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO, obsahujícího různé koncentrace  $\text{NaN}_3$

## 4.6 Zhodnocení produkce singletového kyslíku

Stanovení toku fotonů Xe lampy provedené pomocí aktinometrů a v literatuře dostupné kvantové výtěžky  $^1\text{O}_2$  obou používaných fotosenzibilizátorů umožňují orientačně kvantifikovat množství  $^1\text{O}_2$  vznikající v jednotlivých systémech. Vzhledem k absorbanci fotosenzibilizátorů nelze ztotožnit hodnoty toku fotonů s fotony absorbovanými fotosenzibilizátory.

### Bengálská červeň

Vzhledem ke své absorbanci absorbovala  $10^{-5}$  M RB 89,33 % dopadajícího záření, tedy  $2,416 \cdot 10^{15}$  fot/s. Tato hodnota je nižší, než je počet molekul RB ( $1,807 \cdot 10^{16}$  molekul) dostupných v roztoku. Zároveň úbytek počtu molekul RB v průběhu 120 minut ozařování je nejvyšší ve vzorku neobsahující  $\text{NaN}_3$  a představuje 2,52 %. Použijeme-li dříve uvedený kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$  RB ve vodě 0,75 a výše uvedený teoretický počet absorbovaných fotonů, získáme hodnotu  $1,812 \cdot 10^{15}$  molekul  $^1\text{O}_2$  vytvořených za 1 s.

Obdobně je možné se pokusit usuzovat množství vzniklého  $^1\text{O}_2$  na základě úbytku sondy ABDA. Jak je uvedeno v tabulce 4.3, za 120 minut ozařování roztoku obsahujícího RB a sondu ABDA se koncentrace sondy snížila o  $2,450 \cdot 10^{-5}$  M. Zreagovalo tedy  $4,427 \cdot 10^{16}$  molekul a probíhaly-li reakce sondy s  $^1\text{O}_2$  stechiometricky dle schématu na obrázku 4.15, měla by tato hodnota zároveň reprezentovat počet molekul  $^1\text{O}_2$ . Z hodnoty počtu molekul  $^1\text{O}_2$  vytvořených za 1 s, získané na základě chemické aktinometrie, lze určit počet molekul  $^1\text{O}_2$  vzniklých za 120 minut jako  $1,304 \cdot 10^{19}$  molekul. Hodnota počtu molekul vypočítaných na základě úbytku molekul sondy tvoří pouze 0,34 % hodnoty získané na základě aktinometrie.

V případě roztoku obsahujícího  $300 \mu\text{l}$  THF se počet molekul sondy zmenšil o  $6,412 \cdot 10^{16}$  za 120 minut. Za stejnou dobu by dle aktinometrického stanovení mělo vzniknout  $1,310 \cdot 10^{19}$  molekul  $^1\text{O}_2$ . V tomto případě činí množství zreagovaných molekul sondy 0,49 % hodnoty získané pomocí aktinometrie. Vyšší hodnota pro roztok obsahující THF je v souladu s předpokladem, že přítomnost THF v roztoku zvyšuje dobu života  $^1\text{O}_2$ . Závěr, že sonda ABDA má nízkou reaktivitu souhlasí se závěry práce Entradas et al. (2020), autoři této práce však uvádějí, že sonda ABDA reagovala s 2 % vznikajícího  $^1\text{O}_2$ . Hodnoty vypočítané pro roztok obsahující THF jsou však platné pouze za předpokladu, že přítomnost THF nemá vliv na hodnotu kvantového výtěžku RB. Tento předpoklad nebyl v této práci ověřován.

### Akridinová oranž

Přepočet toku fotonů na absorbanci AO, která činí 92,69 % poskytne hodnotu  $1,287 \cdot 10^{13}$  fot/s. Vzhledem k výše popsanému nárůstu absorpance AO s dobou ozařování nelze mluvit o jejím úbytku, tak jako to bylo provedeno u RB. S  $9,035 \cdot 10^{16}$

molekulami AO v roztoku představuje dopadající tok fotonů rovněž nižší hodnotu, než je počet molekul fotosenzibilizátoru v roztoku. S využitím výše uvedeného počtu absorbovaných fotonů a kvantového výtěžku 0,18 by teoretický počet vznikajících molekul  $^1\text{O}_2$  měl být  $2,316 \cdot 10^{12}$  molekul za 1 s.

V případě roztoku sondy ABDA a AO za 120 minut zreagovalo  $5,138 \cdot 10^{15}$  molekul sondy. Na základě aktinometrie by za tento časový úsek mělo vzniknout  $1,667 \cdot 10^{16}$  molekul  $^1\text{O}_2$ . Vzhledem k výrazně nižšímu množství  $^1\text{O}_2$ , vznikajícího v tomto systému, tvoří počet zreagovaných molekul sondy 30,82 % hodnoty vypočítané na základě aktinometrie.

Výrazný rozdíl v poměru množství vzniklého  $^1\text{O}_2$  z úbytku sondy a na základě aktinometrie mezi oběma fotosenzibilizátory byl pravděpodobně způsobem výrazným rozdílem poměrů počtu částic sondy ku počtu molekul  $^1\text{O}_2$  vzniklých za 1 sekundu. Zatímco u RB je počet molekul sondy v 100–násobném nadbytku, u AO je sonda v 78012–násobném nadbytku. Rovněž je nutno zvážit, že reakce se sondou je jen jedním z mnoha možných způsobů deaktivace  $^1\text{O}_2$ .

## 5 Závěr

Teoretická část této práce byla zaměřena na literární rešerši shrnující poznatky o singletovém kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ), jeho detekci a fotosenzibilizačních reakcích. Detailněji jsou popsány způsoby zhášení  $^1\text{O}_2$ , tedy fyzikální zhášení a jeho mechanismy a zhášení chemické. Popsán je rovněž azid sodný, jakožto zhášec  $^1\text{O}_2$ , stejně jako karotenoidy, početná skupina sloučenin zahrnující jedny z nejefektivnějších zhášeců  $^1\text{O}_2$ . Poslední část literární rešerše je věnována fotosenzibilizátorům a radiosenzibilizátorům. Popsán je rovněž mechanismus poškození nežádoucích buněk při fotodynamické terapii, stejně jako historický vývoj fotosenzibilizátorů aplikovaných ve fotodynamické terapii a obecné požadavky na takovéto fotosenzibilizátory. Rentgenem buzená fotodynamická terapie je představena, jako metoda eliminující výrazný nedostatek terapie fotodynamické – dosah viditelného záření v lidském těle.

Experimentální část této práce byla věnována studiu vlastností kyseliny 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonové (ABDA). Prostřednictvím přísadků 0,4680 M HCl a 0,4769 M NaOH byl studován vliv změn pH na absorpční a emisní spektra roztoku  $5,8 \cdot 10^{-5}$  M sondy ABDA. Neutrální pH a zásadité pH až do hodnoty 12,2 nemá zásadní vliv na absorpční a emisní spektrum sondy. Naproti tomu při poklesu pH pod hodnotu 2,8 dochází k výraznému snížení maxima absorpce a maxima intenzity fluorescence.

Vliv koncentrace sondy v roztoku na její absorpční a emisní spektra byl studován pro rozmezí koncentrací  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  M. Z lineární závislosti absorpčního maxima při 380 nm bylo možné určit hodnotu molárního extinkčního koeficientu sondy ABDA jako  $11400 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci pouze pro koncentrace nižší než  $10^{-4}$  M, při vyšších koncentracích dochází k výrazným odchylkám od linearitu, způsobeným s nejvyšší pravděpodobností koncentračním zhášením nebo absorpcí fluorescence v roztoku, vzhledem k vysokým absorbancím koncentrovaných roztoků.

Ozařování sondy ABDA rentgenovým zářením s dávkovým příkonem přibližně 160 Gy/h vedlo ke zjištění, že sonda se i v nepřítomnosti radiosenzibilizátoru rozkládá. Přesný mechanismus tohoto děje nebyl studován, nelze však vyloučit, že sonda ABDA nereaguje s produkty radiolýzy vody. Zdá se tedy, že za daných experimentálních podmínek není sonda ABDA vhodná pro detekci  $^1\text{O}_2$ , generovaného rentgenovým zářením. Nicméně se jedná o přípravný experiment a tento systém by

bylo vhodné podrobit dalšímu studiu. Například vzhledem k vysokému dávkovému příkonu by potřebná doba ozařování potřebná k účinné produkci  $^1\text{O}_2$  mohla být dostatečně krátká na to, aby degradace sondy nebyla překážkou.

Dále byly studovány systémy obsahující fotosenzibilizátory bengálskou červeň a akridinovou oranž a zhášeče  $^1\text{O}_2$  azid sodný a  $\beta$ -karoten. Pro charakterizaci Xe lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus, která byla využívána pro ozařování vzorků, byly využity dva chemické aktinometry. Toky fotonů byly určovány pro vlnové délky blízké absorpčním maximům obou využívaných fotosenzibilizátorů. Pro stanovení toku fotonů při vlnové délce 480 nm byl využit ferrioxalátový aktinometr, pomocí něhož byl tok fotonů určen jako  $(1,521 \pm 0,134) \cdot 10^{14}$  fot/s. Pro vlnovou délku 545 nm byl využit aktinometr z Reineckovy soli, pomocí něhož byl tok fotonů stanoven jako  $(2,760 \pm 0,083) \cdot 10^{15}$  fot/s.

Na základě výsledků ozařování roztoků s různými koncentracemi sondy ABDA bez přítomnosti fotosenzibilizátoru byla vznesena hypotéza, že sonda ABDA za těchto podmínek podléhá degradaci, která se řídí kinetikou prvního řádu. Stejně tak byla vznesena hypotéza, že reakce sondy s  $^1\text{O}_2$  je pseudomonomolekulární, vzhledem k předpokládané konstantní koncentraci  $^1\text{O}_2$  v systému během ozařování.

Ozařování roztoků s koncentracemi  $\text{NaN}_3$   $10^{-2}$  M až  $10^{-4}$  M prokázalo schopnost  $\text{NaN}_3$  zhášet  $^1\text{O}_2$ , a tedy limitovat degradaci sondy ABDA. Zatímco  $10^{-4}$  M  $\text{NaN}_3$  poskytoval sondě ABDA minimální ochranu před oxidací,  $10^{-2}$  M  $\text{NaN}_3$  snížil úbytek sondy během 120 minut ozařování o téměř 20 %. Druhým studovaným zhášečem  $^1\text{O}_2$  byl  $\beta$ -karoten. Vzhledem k nerozpustnosti  $\beta$ -karotenu ve vodě byly experimenty prováděny ve směsi vody a THF. V nepřítomnosti zhášeče dochází k rychlejší degradaci sondy v této směsi rozpouštědel, než-li ve vodě. Určitý vliv na toto může mít uváděná delší doba života  $^1\text{O}_2$  v THF, avšak i v roztoku, který obsahoval pouze sondu, docházelo k její rychlejší degradaci, než-li ve vodě.  $\beta$ -karoten se ukázal být efektivnějším zhášečem nežli  $\text{NaN}_3$ , vzhledem k tomu, že již při koncentraci  $10^{-6}$  M došlo k pozorovatelně menší degradaci sondy. Limitujícím faktorem maximální použitelné koncentrace  $\beta$ -karotenu, v kombinaci s absorpčními sondami, se ukázala být jeho absorbance, překrývající absorpční maxima dalších složek systému. Tento systém, obsahující  $\beta$ -karoten rozpuštěný v THF, by rovněž bylo vhodné podrobit dalšímu studiu, za účelem objasnění vlivu přídavku THF na dobu života a kvantový výtěžek singletového kyslíku.

Druhým použitým fotosenzibilizátorem byla akridinová oranž. Na základě naměřené koncentrační řady byly určeny molární extinkční koeficienty pro 490 a 470 nm. Molární extinkční koeficient pro 490 nm byl určen jako  $12623,13 \pm 284,27 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pro 470 nm potom jako  $11167,92 \pm 331,12 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Přídavek sondy ABDA rovněž způsobil nárůst absorbance při 480 nm, což je boční maximum přiřazované dimeru AO. Při ozařování neočekávaně absorbance monomeru i dimeru AO rostla, a poměr absorbancí se v průběhu ozařování zvyšoval ve prospěch monomeru. Ozařování vyššími toky fotonů, vedlo k potlačení tohoto jevu. Přítomnost  $\text{NaN}_3$  v ozařovaných roztocích  $10^{-4}$  M sondy ABDA a  $5 \cdot 10^{-5}$  M AO nevedla k eliminaci dříve pozorovaného jevu

nárůstu absorpce, naopak přidavek  $\text{NaN}_3$  způsobil nárůst maximální absorpce již u neozářených vzorků. Tato pozorování nasvědčují tomu, že dochází k interakci mezi látkami ve vzorku a pro objasnění probíhajících procesů je třeba další studium tohoto systému.

Poslední část práce byla věnována výpočtům produkce  $^1\text{O}_2$ . Na základě určených toků fotonů a známých kvantových výtěžků  $^1\text{O}_2$  obou fotosenzibilizátorů bylo vypočteno teoretické množství vznikajícího  $^1\text{O}_2$ . Pro RB tato hodnota činila  $1,812 \cdot 10^{15}$  molekul  $^1\text{O}_2$  vytvořených za 1 s. Pro AO potom  $2,316 \cdot 10^{12}$  molekul za 1 s. Výpočet počtu vzniklých molekul  $^1\text{O}_2$  na základě úbytku sondy ABDA poskytl hodnotu, která představovala 0,34 % hodnoty vypočtené na základě aktinometrie v případě RB. Stejný výpočet pro AO poskytl hodnotu, která představovala 30,82 % hodnoty vypočtené na základě aktinometrie. Tyto hodnoty představují v podstatě účinnost detekce  $^1\text{O}_2$  v daných systémech. Velký rozdíl v účinnosti je pravděpodobně způsoben několika faktory. Určitě různým nadbytkem molekul sondy v porovnání se vznikajícím  $^1\text{O}_2$  za sekundu – 78012–násobný nadbytek molekul sondy v případě AO a jen 100–násobný nadbytkem u RB. Dalším faktorem také může být rozdílná rychlost produkce  $^1\text{O}_2$ . Oba tyto faktory by bylo vhodné blíže prozkoumat v dalších experimentech a určit tak optimální detekční rozsah sondy ABDA.

Závěrem lze konstatovat, že sonda ABDA je využitelná jako absorpční a luminescenční sonda pro  $^1\text{O}_2$  v roztocích o pH 2,8 až 12,2. Při využívání změn intenzity luminescence, jakožto indikátoru reakce s  $^1\text{O}_2$ , je vhodné pracovat s koncentracemi nižšími než  $10^{-4}$  M. Sonda je poměrně fotostabilní, při ozařování vlnovou délkou 549 nm a 490 nm bez přítomnosti fotosenzibilizátoru tokem fotonů řádově  $10^{13}$  až  $10^{15}$  fot/s degraduje velmi pomalu, tato degradace se pravděpodobně řídí kinetikou prvního řádu. Detekce  $^1\text{O}_2$  pomocí sondy, v přítomnosti zhasiče  $^1\text{O}_2$   $\text{NaN}_3$  a fotosenzibilizátoru RB, se zdá být použitelná bez větších limitujících faktorů. Je třeba však zvolit optimální koncentrace fotosenzibilizátoru a zhasiče s ohledem na použitý tok fotonů. Detekce v systému s  $\beta$ -karotenem a RB je omezoována především výraznou absorpcí  $\beta$ -karotenu nicméně pro nevodná rozpouštědla by mohl tento zhasič být dobrou volbou. Výsledky získané pro systém s fotosenzibilizátorem AO naznačují, že dochází k interakci mezi sondou ABDA a AO. Vzhledem k tomu, že tento fotosenzibilizátor má nízký kvantový výtěžek  $^1\text{O}_2$  je třeba zvážit jeho další použitelnost.

# Literatura

- Abdel-Kader, M. H., 2014. Photodynamic therapy: From theory to application. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*, 1–312.
- Aerssens, D., E. Cadoni, L. Tack, a A. Madder, 2022. A photosensitized singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) toolbox for bio-organic applications: Tailoring  $^1\text{O}_2$  generation for dna and protein labelling, targeting and biosensing. *Molecules* 27(3).
- Atzrodt, J., V. Derdau, W. Kerr, a M. Reid, 2017. Applications of hydrogen isotopes in the life sciences. *Angewandte Chemie International Edition*, 1–26.
- Auten, R. L. a J. M. Davis, 2009. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatric Research* 66(2), 121–127.
- Baier, J., T. Fuß, C. Pöllmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landthaler, a W. Bäuml, 2007. Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87(3), 163–173.
- Baptista, M. S., J. Cadet, P. D. Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni, a T. M. Yoshimura, 2017. Type i and type ii photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and Photobiology* 93, 912–919.
- Baskaran, R., J. Lee, a S.-G. Yang, 2018. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomaterials Research*, 22:25.
- Beutner, S., B. Bloedorn, T. Hoffmann, a H.-D. Martin, 2000. [22] synthetic singlet oxygen quenchers. In *Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone*, Volume 319 of *Methods in Enzymology*, pp. 226–241. Academic Press.
- Bhattacharjee, J., S. A. Hussain, a D. Bhattacharjee, 2013. Control of h-dimer formation of acridine orange using nano clay platelets. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116, 148–153.
- Böhm, F., R. Edge, a G. Truscott, 2012. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. *Molecular Nutrition and Food Research* 56(2), 205–216.

- Bregnhøj, M., M. Westberg, F. Jensen, a P. R. Ogilby, 2016. Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *18*, 22946–22961.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* *9*(15), 1551–1558.
- Buck, S. T. G., F. Bettanin, E. Orestes, P. Homem-De-Mello, H. Imasato, R. B. Viana, J. R. Perussi, a A. B. F. D. Silva, 2017. Photodynamic efficiency of xanthenes dyes and their phototoxicity against a carcinoma cell line: A computational and experimental study. *Journal of Chemistry*, Article ID 7365263.
- Cabrerizo, F. M., J. Arnbjerg, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells, a P. R. Ogilby, 2010. Fluorescence quenching by oxygen: „Debunking“ a classic rule. *ChemPhys-Chem* *11*, 796–798.
- Cáceres, J., J. Robinson-Duggon, A. Tapia, C. Paiva, M. Gómez, C. Bohne, a D. Fuentealba, 2017. Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[*n*] urils and albumins. *Physical Chemistry Chemical Physics* *19*(3), 2574–2582.
- Craft, N. E. a J. H. Soares, 1992. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and  $\beta$ -Carotene in Organic Solvents. *Food Chem* *40*, 431–434.
- DeRosa, M. C. a R. J. Crutchley, 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* *233-234*, 351–371.
- Di Mascio, P., S. Kaiser, a H. Sies, 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *274*(2), 532–538.
- Díaz-Uribe, C., W. Vallejo, a F. Martínez, 2014. Photooxidation of anthracene under visible light with metalloxyphenylporphyrins. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* *1*, 225–230.
- Edge, R., D. J. McGarvey, a T. G. Truscott, 1997. The carotenoids as anti-oxidants - A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* *41*(3), 189–200.
- Edge, R. a T. Truscott, 2018. Singlet Oxygen and Free Radical Reactions of Retinoids and Carotenoids—A Review. *Antioxidants* *7*(1), 5.
- Entradas, T., S. Waldron, a M. Volk, 2020. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* *204*, 111787.
- Farmilo, A. a F. Wilkinson, 1973. On the mechanism of quenching of singlet oxygen in solution. *Photochemistry and Photobiology* *18*(6), 447–450.
- Fitzgerald, F., 2017. *Photodynamic Therapy (PDT)*. Cancer etiology diagnosis and treatments. Nova Science Publishers, Inc.



- Foote, C. S., 1991. Definition of type i and type ii photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* 54, 659–659.
- Foote, C. S. a R. W. Denny, 1968. Chemistry of singlet oxygen. vii. quenching by  $\beta$ -carotene. *Journal of the American Chemical Society* 90(22), 6233–6235.
- Foote, C. S., R. W. Denny, L. Weaver, Y. Chang, a J. Peters, 1970. Quenching of Singlet Oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 171(1), 139–148.
- Guha, S. N. a J. P. Mittal, 1995. Kinetics of one-electron reduction of acridine orange and characterization of its semireduced species in aqueous solutions by pulse radiolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 92(3), 181–188.
- Haag, W. R. a T. Mill, 1987. Rate constants for of  $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$  with azide ion in water. *Photochemistry and Photobiology* 45(3), 317–321.
- Hamblin, M. a P. Mroz, 2008. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*. Artech House.
- Hamblin, M. R. a Y.-Y. Huang, 2017. *Imaging in Photodynamic Therapy* (1 ed.). CRC Press.
- Havlinová, K., 2020. *Chemické metody detekce singletového kyslíku*. Bakalářská práce, České vysoké učení technické, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská.
- Heath, H., 1956. A new sensitive chemical actinometer - II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 235(1203), 518–536.
- Hošnová, I. T., J. Bárta, V. Kazda, B. Nežilová, a K. Havlinová, 2022. Dosimetric characterisation of SCIOX Beam, an X-ray cabinet for experimental radiation chemistry [poster]. *19th Radiochemical Conference - Radchem 2022, 15. - 20. 5. 2022, Mariánské lázně, Czech republic*.
- Huang, L., T. G. St. Denis, Y. Xuan, Y.-Y. Huang, M. Tanaka, A. Zadlo, T. Sarna, a M. R. Hamblin, 2012. Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: Role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 53(11), 2062–2071.
- Jensen, R. L., J. Arnbjerg, a P. R. Ogilby, 2010. Temperature effects on the solvent-dependent deactivation of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 132(23), 8098–8105. PMID: 20491478.
- Kato, H., K. Komagoe, Y. Nakanishi, T. Inoue, a T. Katsu, 2012. Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation. *Photochemistry and Photobiology* 88, 423–431.
- Kou, J., D. Dou, a L. Yang, 2017. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* 8, 81591.

- Kusuzaki, K., H. Murata, T. Matsubara, H. Satonaka, T. Wakabayashi, A. Matsumine, a A. Uchida. Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. *In vivo (Athens, Greece)* 21(2), 205–14.
- Lang, K., J. Mosinger, a D. M. Wagnerová, 2006. Singletový kyslík v praxi - Současnost a perspektiva. *Chemicke Listy* 100(3), 169–177.
- Lee, P. C. a M. A. Rodgers, 1987. Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and dna. *Photochemistry and Photobiology* 45, 79–86.
- Li, M. Y., C. S. Cline, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell, a P. Bilski, 2001. Quenching of Singlet Molecular Oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) by Azide Anion in Solvent Mixtures . Technical Report 6.
- Liebler, D. C., 1993. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691(1), 20–31.
- Lindig, B. A. a M. A. Rodgers, 1981. Rate parameters for the quenching of singlet oxygen by water-soluble and lipid-soluble substrates in aqueous and micellar systems. *Photochemistry and Photobiology* 33, 627–634.
- Lissi, E. A., M. V. Encinas, E. Lemp, a M. A. Rubio, 1993. Singlet oxygen  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  bimolecular processes. solvent and compartmentalization effects. *Chemical Reviews* 93(2), 699–723.
- Mahmoudi, K., K. L. Garvey, A. Bouras, G. Cramer, H. Stepp, J. G. J. Raj, D. Bozec, T. M. Busch, C. G. Hadjipanayis, T. M. Busch, C. G. Hadjipanayis, a C. H. Org, 2019. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 141, 595–607.
- Matsubara, T., K. Kusuzaki, A. Matsumine, K. Shintani, H. Satonaka, a A. Uchida, 2006. Acridine orange used for photodynamic therapy accumulates in malignant musculoskeletal tumors depending on pH gradient. *Anticancer research* 26(1A), 187–93.
- Merkel, P. B. a D. R. Kearns, 1972. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *Journal of the American Chemical Society* 94(21), 7244–7253.
- Merkel, P. B. a D. R. Kearns, 1975. Rate constant for the reaction between 1,3-diphenylisobenzofuran and singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 97(2), 462–463.
- Mfouo-Tynga, I. S., L. D. Dias, N. M. Inada, a C. Kurachi, 2021. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 34.
- Moreno, M. J., E. Monson, R. G. Reddy, A. Rehemtulla, B. D. Ross, M. Philbert, R. J. Schneider, a R. Kopelman, 2003. Production of singlet oxygen by  $\text{ru}(\text{dpp}(\text{so}_3)_2)_3$  incorporated in polyacrylamide pebbles. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 90, 82–89.

- Neckers, D. C. a O. M. Valdes-Aguilera, 1993. Photochemistry of the xanthene dyes. pp. 315–394.
- Nilsson, R., P. B. Merkel, a D. R. Kearns, 1972. Kinetic Properties of the Triplet States of Methylene Blue and other Photosensitizing Dyes. *Photochemistry and Photobiology* 16(2), 109–116.
- Ogilby, P. R., 2010. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* 39, 3181–3209.
- Pitchaimani, A., A. Renganathan, S. Cinthaikinia, a K. Premkumar, 2014. Photochemotherapeutic effects of uv-c on acridine orange in human breast cancer cells: potential application in anticancer therapy. *RSC Adv.* 4, 22123–22128.
- Radjabalou, R., J. F. Blanco, V. Dias da Silva Freitas, C. Supplis, F. Gros, O. Dechy-Cabaret, a K. Loubière, 2019. A revised experimental protocol for implementing the actinometry method with the Reinecke’s salt. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 382.
- Ramel, F., S. Birtic, S. Cuiné, C. Triantaphylidès, J.-L. Ravanat, a M. Havaux, 2012. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants . *Plant Physiology* 158(3), 1267–1278.
- Redmond, R. W. a J. N. Gamlin, 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology* 70, 391–475.
- Rubio, M. A., D. O. Mártire, S. E. Braslavsky, a E. A. Lissi, 1992. Influence of the ionic strength on O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) quenching by azide. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 66(2), 153–157.
- Sagadevan, A., K. C. Hwang, a M. D. Su, 2017. Singlet oxygen-mediated selective c–h bond hydroperoxidation of ethereal hydrocarbons. *Nature Communications* 8.
- Schweitzer, C. a R. Schmidt, 2003. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews* 103(5), 1685–1757.
- Shi, H. a P. J. Sadler, 2021. *Photoactive metallodrugs* (3 ed.). Elsevier Inc.
- Stahl, W. a H. Sies, 1993. Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis-trans Isomerization of Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691(1 Carotenoids i), 10–19.
- Takahashi, J. a M. Misawa, 2009. Characterization of reactive oxygen species generated by protoporphyrin IX under X-ray irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 78(11), 889–898.
- Toyama, M., T. Mori, J. Takahashi, a H. Iwahashi, 2018. Luteolin as reactive oxygen generator by X-ray and UV irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 146, 11–18.
- Triantaphylidès, C. a M. Havaux, 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* 14(4), 219–228.

- Verduin, J., 2020. Photodegradation Products And Their Analysis In Food. *Food Science and Nutrition* 6(3), 1–16.
- Wagnerova, D., 2001. Classification of dioxygen reactions: A unifying view. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 215(1), 133–138.
- Wang, G. D., H. T. Nguyen, H. Chen, P. B. Cox, L. Wang, K. Nagata, Z. Hao, A. Wang, Z. Li, a J. Xie, 2016. X-Ray Induced Photodynamic Therapy: A Combination of Radiotherapy and Photodynamic Therapy. *Theranostics* 6(13), 2295–2305.
- Wasserman, H. H. a R. W. Murray, 1979. *Singlet oxygen / [edited by] Harry H. Wasserman, Robert W. Murray*. Academic Press New York.
- Wegner, E. E., A. W. Adamson, A. W. Adamson, A. H. Sporer, S. T. Spees, J. R. Peru-mareddi, A. D. Liehr, J. N. Pitts, J. D. Margerum, C. G. Hatchard, J. Phys Chem, J. Lee, H. Seliger, a C. Phys, 1958. Photochemistry of Complex Ions. III. Absolute Quantum Yields for the Photolysis of Some Aqueous Chromium(III) Complexes. Chemical Actinometry in the Long Wavelength Visible Region. *Journal of the American Chemical Society* 80(49), 3183.
- Wilkinson, F., W. P. Helman, a A. B. Ross, 1993. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 22(1), 113–262.
- You, Y., 2018. Chemical tools for the generation and detection of singlet oxygen. *Organic Biomolecular Chemistry* 16(22), 4044–4060.
- You, Y., S. L. Gibson, R. Hilf, S. R. Davies, A. R. Oseroff, I. Roy, T. Y. Ohulchansky, E. J. Bergey, a M. R. Detty, 2003. Water soluble, core-modified porphyrins. 3. synthesis, photophysical properties, and in vitro studies of photosensitization, uptake, and localization with carboxylic acid-substituted derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(17), 3734–3747.
- Čuba, V., J. Bárta, a L. Procházková, 2018. *Praktikum z radiační chemie a fotochemie*. V Praze: České vysoké učení technické.