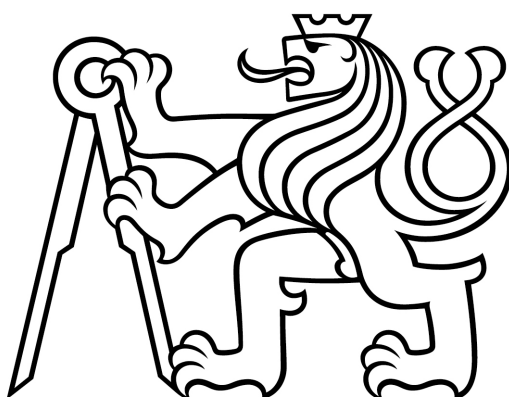


České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie
Studijní obor: Jaderná chemie



Chemické metody detekce singletového kyslíku

Bakalářská práce

Vypracovala: Kristýna Havlinová

Vedoucí práce: Ing. Iveta Terezie Pelikánová

Konzultantka: Ing. Lenka Procházková, Ph.D.

Praha 2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Kristýna Havlinová**

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Jaderná chemie

Název práce: **Chemické metody detekce singletového kyslíku**
(česky)

Název práce: **Chemical tools for the detection of singlet oxygen**
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

1. Literární rešerše s ohledem na současný stav problematiky detekce singletového kyslíku s důrazem na nepřímé metody detekce
2. Popis různých chemických metod detekce singletového kyslíku
3. Detekce singletového kyslíku vybranými chemickými metodami
4. Zhodnocení vlivu RTG či UV záření na použitelnost daných chemických metod
5. Vyhodnocení naměřených dat a sepsání práce

Doporučená literatura:

- [1] Lang, K., Mosinger, J., and Wagnerová, D. M., 'Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku', *Chem. List.*, vol. 99, no. 4, pp. 211–221, 2005.
- [2] Mosinger, J. and Mosinger, B., 'Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement', *Experientia*, vol. 51, no. 2, pp. 106–109, 1995.
- [3] Price, M., Reiners, J. J., Santiago, A. M., and Kessel, D., 'Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy', *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1177–1181, 2009.

- [4] Liu, H., Carter, P. J. H., Laan, A. C., Eelkema, R., and Denkova, A. G., 'Singlet Oxygen Sensor Green is not a Suitable Probe for $^{1}O_2$ in the Presence of Ionizing Radiation', *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 8, 2019.
- [5] LI, B., LIN, H., CHEN, D., WILSON, B. C., and GU, Y., 'Singlet Oxygen Detection During Photosensitization', *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 06, no. 01, p. 1330002, 2013.
- [6] Rabello, B. R., *et al.*, 'Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation', *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 238, pp. 53–62, Jun. 2012.
- [7] Belluš, D., 'Physical Quenchers of Singlet Molecular Oxygen', *Advances in Photochemistry*. pp. 105–205, 01-Jan-1979.

Jméno a pracoviště vedoucího práce:

Ing. Iveta Terezie Pelikánová, Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Jméno a pracoviště konzultanta:

Ing. Lenka Procházková, Ph.D., Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Datum zadání bakalářské práce: 21. 10. 2019

Termín odevzdání bakalářské práce: 7. 7. 2020

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.

.....
Garant oboru

prof. Ing. Jan John, CSc.

.....
Vedoucí katedry



prof. Ing. Igor Jex, DrSc.

.....
Děkan

V Praze dne: 21. 10. 2019

Prohlášení

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

V Praze dne 12.8.2020

Handlová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Ivetě Terezií Pelikánové, vedoucí mé bakalářské práce, za cenné rady, pomoc a čas, který mi byl věnován. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lence Procházkové, Ph.D za věcné připomínky a rady k mé bakalářské práci.

Kristýna Havlinová

Abstrakt

- Název práce: **Chemické metody detekce singletového kyslíku**
- Autor: Kristýna Havlinová
- Obor: Jaderná chemie
- Druh práce: Bakalářská práce
- Vedoucí práce: Ing. Iveta Terezie Pelikánová
- Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
České vysoké učení technické v Praze
- Konzultant: Ing. Lenka Procházková, Ph.D.
Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
České vysoké učení technické v Praze
- Text: Teoretická část této práce představuje rešerši zaměřenou na obecné poznatky o singletovém kyslíku. Zmiňuje jeho charakteristiku, princip vzniku fotosenzibilizačními reakcemi a využití, zvláště ve formě fotodynamické a rentgenem buzené fotodynamické terapie. Část je rovněž zaměřena na fotosenzibilizátory využitelné pro produkci singletového kyslíku. Zvláštní pozornost je věnována metodám detekce, především absorpčním sondám. Experimentální část je věnována studiu jodidové absorpční sondy a 9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonové kyseliny (ABDA) v roztocích s bengálskou červení a to při ozařování viditelným světlem, nebo rentgenovým zářením.
- Klíčová slova: singletový kyslík, detekce, absorpční sondy, bengálská červen

Abstract

Title **Chemical tools for the detection of singlet oxygen**

Author: Kristýna Havlinová

Study Nuclear Chemistry

specialization:

Supervisor: Ing. Iveta Terezie Pelikánová
 Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
 České vysoké učení technické v Praze

Consultant: Ing. Lenka Procházková, Ph.D.
 Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
 České vysoké učení technické v Praze

Text: The theoretical part of this work is comprised of a review focused on general knowledge of singlet oxygen. The work mentions its characteristics, principles of its production by photosensitized reactions and its uses, especially in the form of photodynamic therapy and X-ray induced photodynamic therapy. One part is also dedicated to photosensitizers which can be used to produce singlet oxygen. Special attention is given to the means of detection, especially to absorption probes. The experimental part is dedicated to the study of iodide absorption probe and of 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) in solutions with rose bengal, irradiated with visible light or X-rays.

Key words: singlet oxygen, detection, absorption probes, rose bengal

Obsah

Seznam zkratk a označení	9
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Singletový kyslík	11
2.1.1 Charakteristika singletového kyslíku	11
2.1.2 Vznik singletového kyslíku	12
2.1.3 Fyzikální zhášení	14
2.1.3.1 Přechod indukovaný přenosem náboje	14
2.1.3.2 Elektronicky-vibrační přechod	14
2.1.3.3 Elektronický přechod	14
2.1.4 Využití singletového kyslíku	15
2.2 Metody detekce singletového kyslíku	17
2.2.1 Chemické metody	17
2.2.1.1 Absorpční sondy	18
2.2.1.2 Chemiluminiscenční sondy	22
2.2.2 Fyzikální metody	24
2.3 Fotosenzibilizátory	24
2.3.1 Methylenová modř	25
2.3.2 Bengálská červeň	26
2.3.3 Merocyanin 540	27
2.3.4 Porfyriny a ftalocyaniny	28
2.3.5 Akridinová oranž	29
3 Experimentální část	31
3.1 Použité chemikálie	31
3.2 Příprava zásobních roztoků	32
3.2.1 Příprava Frickeho dozimetru	32
3.2.2 Příprava jodid-jodičnanového aktinometru	32
3.2.3 Příprava ferrioxalátového aktinometru	32

3.2.4	Příprava zásobního roztoku fenantrolinu	32
3.2.5	Příprava octanového pufru	32
3.2.6	Příprava zásobního roztoku RB	32
3.2.7	Příprava zásobního roztoku sondy ABDA	33
3.2.8	Příprava zásobního roztoku jodidové absorpční sondy	33
3.3	Využité přístroje	33
3.3.1	Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus spektrofluorimetr	33
3.3.2	Rentgenová trubice Siemens	34
3.3.3	Varian Cary 100 UV-VIS spektrofotometr	34
3.3.4	Thermo Scientific Genesys 20 spektrofotometr	34
3.4	Stanovení charakteristik zdrojů záření	34
3.4.1	Stanovení toku fotonů Xe lampy spektrofluorimetru Fluoro- Max Plus	34
3.4.2	Stanovení dávkového příkonu RTG zdroje	35
3.5	Experimenty s bengálskou červení a jodidovou absorpční sondou	35
3.5.1	Měření změn absorpce roztoku jodidové absorpční sondy	35
3.5.2	Měření změn absorpce roztoku RB a jodidové absorpční sondy	35
3.6	Experimenty s bengálskou červení a sondou ABDA	35
3.6.1	Měření změn absorpce roztoku RB	35
3.6.2	Měření změn absorpce roztoku sondy ABDA	36
3.6.3	Měření změn absorpce roztoku RB a sondy ABDA	36
3.6.4	Měření změn absorpce sondy ABDA v závislosti na koncentraci RB	36
3.6.5	Měření změn absorpce roztoku RB a azidu sodného	37
3.6.6	Měření změn absorpce roztoku sondy ABDA, RB a azidu sodného	37
3.6.7	Měření změn absorpce roztoku sondy ABDA po ozařování RTG	37
3.6.8	Měření změn absorpce roztoku sondy ABDA a RB po ozařování RTG	37
4	Vyhodnocení a diskuze	38
4.1	Charakterizace zdrojů záření	38
4.1.1	Stanovení toku fotonů Xe lampy při 254 nm a 546 nm	38
4.1.2	Stanovení dávkového příkonu RTG zdroje	40
4.2	Experimenty s RB a jodidovou absorpční sondou	42
4.3	Experimenty s RB a absorpční sondou ABDA	45
4.3.1	Absorpce roztoku RB a roztoku ABDA po ozáření	45
4.3.2	Absorpce sondy ABDA v závislosti na koncentraci RB	49
4.3.3	Absorpce roztoků RB a sondy ABDA po přidání NaN_3	54
4.3.4	Absorpce roztoků RB a sondy ABDA po ozařování RTG	56
5	Závěr	59

Seznam zkratek a označení

ABDA	9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina
ALA	δ -aminolevulová kyselina
AO	Akridinová oranž
CLA	Cypridina luciferin
CT	Přenos náboje
DPBF	1,3-difenyilizobenzofuran
EET	Přenos elektronové energie
EPR	Efekt zvýšené propustnosti a retence
e-v	Elektronově vibrační přenos energie
FMN	Flavinmononukleotid
HpD	Deriváty hematoporfyrinu
LDL	Nízkodenzitní lipoproteiny
LIOAS	Laserem indukovaná optoakustická spektroskopie
MB	Methylenová modř
MC540	Merocyanin 540
PDT	Fotodynamická terapie
PDTX	Rentgenem buzená fotodynamická terapie
PNS	1-H fenalenon
PPIX	Protoporfyrin IX
RB	Bengálská červeň
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RTG	Rentgenové záření
TPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin
TRTL	Časově rozlišené teplotní čočkování
UV	Ultrafialové záření
VIS	Záření z viditelné části spektra
Xe lampa	Xenonová lampa

1 Úvod

Singletový kyslík, excitovaný stav standardně se vyskytující molekuly kyslíku, je z hlediska potenciálu pro využití v chemii, biologii či medicíně velmi zajímavá molekula. Z portfolia aplikací, které byly pro singletový kyslík nalezeny, strhují velkou pozornost především aplikace v medicíně, zvláště pak fotodynamická terapie.

Je-li naším cílem studovat procesy zahrnující singletový kyslík, je nezbytné mít k dispozici nástroje pro detekci této molekuly. Ač je pro detekci singletového kyslíku popsáno několik druhů metod, každá z těchto metod má své specifické nevýhody.

Tato práce prezentuje obecné poznatky o singletovém kyslíku a možnosti nepřímé detekce pomocí chemických reakcí této molekuly. Hlavní pozornost je věnována absorpčním sondám. Vlastností absorpčních sond, u nichž jsou pro detekci sledovány změny absorbance, nelze obecně sumarizovat. Sondy se odlišují svojí citlivostí a specificitou pro singletový kyslík. Pro experimenty je rovněž nutno brát v úvahu rozpustnost sondy ve vybraném rozpouštědle.

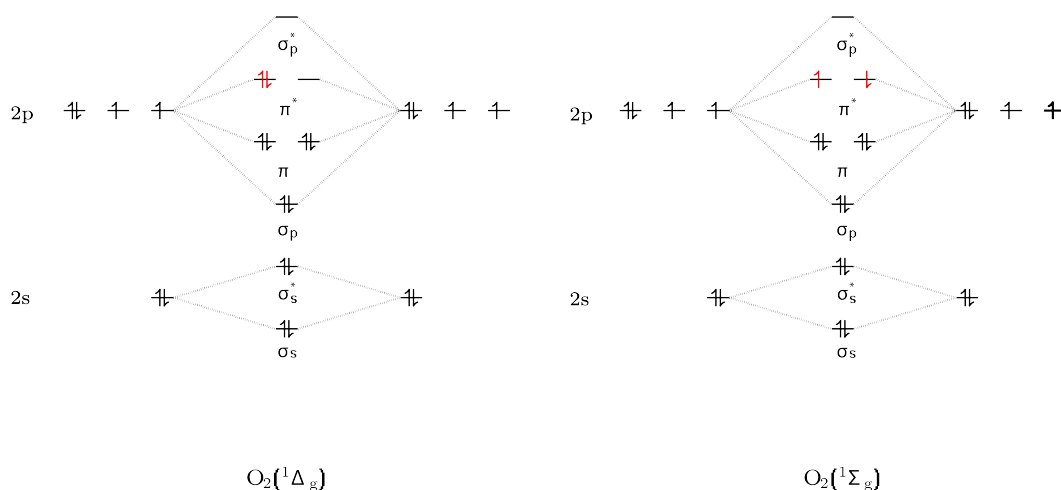
Experimenty v rámci této práce byly zaměřeny na studium jodidové absorpční sondy a sondy ABDA (9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina), s výhledem jejich použití při produkci singletového kyslíku pomocí rentgenového záření.

2 Teoretická část

2.1 Singletový kyslík

2.1.1 Charakteristika singletového kyslíku

V základním energetickém stavu je molekula kyslíku charakterizována dvěma nepárovými elektrony s paralelními spiny v nejvyšším antivazebném π -orbitalu. Takto popsaná částice má tedy multiplicitu 3 a je označována jako triplet. Přejde-li molekula kyslíku do excitovaného stavu, může se vyskytovat v singletovém stavu, tedy s multiplicitou 1. Rozeznáváme singletové stavy označované jako $^1\Delta_g$ a $^1\Sigma_g$ rozlišené uspořádáním elektronů v antivazebných orbitalech π^* . Jako $^1\Delta_g$ označujeme stav částice, jejíž dva elektrony v π^* orbitalu jsou spárovány, naopak stav $^1\Sigma_g$ je charakterizován dvěma nepárovými elektrony opačného spinu v π^* orbitalu, tyto skutečnosti zobrazuje obrázek 2.1 (Lang et al., 2005).



Obr. 2.1: Schéma molekulových orbitalů kyslíku v singletových stavech $^1\Delta_g$ a $^1\Sigma_g$

Vzhledem ke spinovému zákazu, který platí pro reakce tripletového kyslíku s běžnými látkami v singletovém stavu, probíhají reakce s vysokými aktivačními energiemi (Lang et al., 2005). Naopak reakce singletového kyslíku s většinou látek jsou spinově dovolené, což je příčinou vysoké reaktivity kyslíku v tomto stavu (Lang et al., 2005).

Přechod stavu $^1\Delta_g$ na stav $^3\Sigma_g$ je spinově zakázaný, z tohoto plyne poměrně

dlouhá doba života stavu $^1\Delta_g$ – 45 minut v plynné fázi a 10^{-6} – 10^{-3} s v roztocích (DeRosa, 2002).

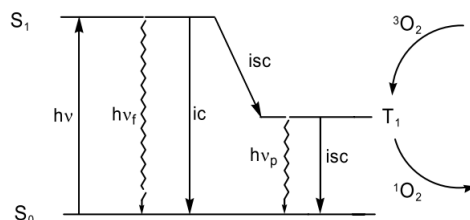
Přechod $^1\Sigma_g \rightarrow ^3\Sigma_g$ je také spinově zakázaný (Lang et al., 2005). Naopak stav $^1\Sigma_g$ se vyznačuje krátkou dobou života a to 7–12 s v plynné fázi a 10^{-11} – 10^{-9} s v roztocích, přechod tohoto stavu na stav $^1\Delta_g$ je totiž spinově dovolený (DeRosa, 2002).

2.1.2 Vznik singletového kyslíku

Ke vzniku singletového kyslíku vede řada fyzikálních, chemických, fotochemických nebo biologických reakcí (Lang et al., 2005). Příkladem chemické reakce produkující singletový kyslík je reakce H_2O_2 s $\text{O}_2^{\bullet-}$ vedoucí ke vzniku reaktivních forem kyslíku jako $^1\text{O}_2$ nebo $\bullet\text{OH}$. Obdobně lze k disproportionaci H_2O_2 využít ClO^- nebo $[\text{MoO}_4]^{2-}$. V živých soustavách může docházet k tvorbě singletového kyslíku při procesech katalyzovaných peroxidázami nebo oxygenázami. (You, 2018).

Fotosenzibilizační reakce

Využití fotosenzibilizátorů představuje jednoduchou a kontrolovatelnou metodu pro generování $^1\text{O}_2$, která vyžaduje pouze kyslík, světlo příslušné vlnové délky a fotosenzibilizátor schopný absorpce tohoto světla a využití jeho energie pro excitaci kyslíku do jeho singletového stavu (DeRosa, 2002).



Obr. 2.2: Mechanismus fotosenzibilizační produkce $^1\text{O}_2$ Lang et al. (2005)

Dále popsané procesy ilustruje obrázek 2.2. Absorpce světelného kvanta se fotosenzibilizátor dostává ze základního stavu S_0 do excitovaného singletového stavu S_n , z nějž rychle přechází do nejnižšího singletového stavu S_1 . Ze stavu S_1 je deexcitace možná vnitřní konverzí ic , fluorescencí, nebo mezisystémovým přechodem isc za vzniku tripletového stavu T_1 . Zhášení stavu T_1 může probíhat dvěma typy reakcí a to v závislosti na formě zhášeče. Nedochází-li vlivem absence kyslíku, nebo jiného zhášeče k žádné reakci můžeme dobu života excitovaného stavu fotosenzibilizátoru v tripletovém stavu τ_T vyjádřit v závislosti na rychlostních konstantách pro mezisystémový přechod k_{isc} a deaktivaci fosforescencí k_{fosf} .

$$\tau_T = \frac{1}{k_{fosf} + k_{isc}} = \frac{1}{k^T} \quad (2.1)$$

Je-li v systému přítomen kyslík je rychlostní konstanta zhášení tripletového fotosenzibilizátoru k_{obs} reprezentována vztahem 2.2, kde konstanta $k_q[O_2]$ představuje součet rychlostních konstant bimolekulárních reakcí u nichž dochází ke zhášení kyslíkem (Lang et al., 2005, 2004).

$$k_{obs} = k^T + k_q[O_2] \quad (2.2)$$

Reakce typu I a II

Reakce typu I představuje zhášení tripletového stavu fotosenzibilizátoru molekulami substrátu, nebo rozpouštědla za tvorby radikálů, které mohou dále vstupovat do reakcí s molekulami kyslíku vedoucích ke vzniku reaktivních forem kyslíku.

Je-li excitovaný stav fotosenzibilizátoru zhášen molekulou kyslíku mluvíme o reakcích typu II. Tyto reakce mohou probíhat přenosem energie za vzniku 1O_2 nebo přenosem elektronu za vzniku $O_2^{\bullet-}$, tyto děje popisují rovnice 2.3 a 2.4, kde k_{en} a k_{et} označují rychlostní konstanty příslušných dějů (Lang et al., 2004; DeRosa, 2002).



Reakci vedoucí ke vzniku singletového kyslíku konkurují mimo reakce poskytující superoxidový anion-radikál a reakce typu I také již dříve zmíněné zářivé a nezářivé přechody nebo deaktivace molekulárním kyslíkem, tyto procesy reprezentují rovnice 2.5 – 2.7, kde k_{fosf} , k_{isc} a k_{dO_2} představují příslušné rychlostní konstanty (DeRosa, 2002).



Samotnou schopnost fotosenzibilizátoru generovat singletový kyslík kvantifikuje veličina zvaná kvantový výtěžek Φ_Δ , který definujeme jako podíl počtu přeměněných molekul ku počtu absorbovaných světelných kvant. Taktéž lze kvantový výtěžek popsat vztahem 2.8, kde Φ_T představuje kvantový výtěžek tripletového stavu fotosenzibilizátoru, Φ_{en} představuje účinnost přenosu energie a k_{en} představuje rychlostní konstantu přenosu energie (DeRosa, 2002).

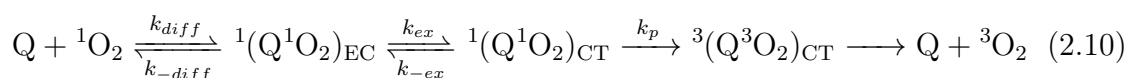
$$\Phi_\Delta = \Phi_T \Phi_{en} = \Phi_T \frac{k_{en}[O_2]}{k_{fosf} + k_{isc} + k_q[O_2]} \quad (2.8)$$

2.1.3 Fyzikální zhášení

Fyzikálním zhášením nazýváme proces interakce $^1\text{O}_2$ se zhášečem vedoucí pouze k deaktivaci $^1\text{O}_2$, bez chemické změny zhášeče. Tento proces ilustruje rovnice 2.9, kde Q reprezentuje molekulu zhášeče a k_p představuje rychlostní konstantu fyzikálního zhášení (DeRosa, 2002). Fyzikální zhášení může probíhat energetickými přechody označovanými jako přechod indukovaný přenosem náboje, elektronicky-vibrační přechod a čistě elektronický přechod, jejichž mechanismy jsou popsány níže.



2.1.3.1 Přechod indukovaný přenosem náboje



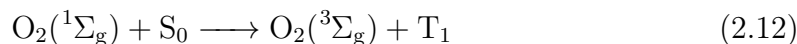
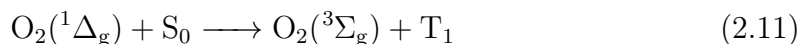
Při deaktivaci prostřednictvím přenosu náboje (CT) dochází při kontaktu molekuly $^1\text{O}_2$ a zhášeče Q ke tvorbě singletového srážkového komplexu jež přechází na singletový exciplex $^1(\text{Q}^1\text{O}_2)_{\text{CT}}$, který se stabilizuje přenosem náboje ze zhášeče na $^1\text{O}_2$. Tento komplex přechází převážně mezisystémovým přechodem do základního tripletového stavu $^3(\text{Q}^1\text{O}_2)_{\text{CT}}$, který nakonec disociuje na finální produkty Q a $^3\text{O}_2$, schema tohoto procesu uvádí rovnice (2.10). Pro vyjádření celkové rychlostní konstanty zhášení je nutno zmínit, že komplex $^1(\text{Q}^1\text{O}_2)_{\text{CT}}$ může mimo deaktivace mezisystémovým přechodem podléhat i chemickým reakcím a tedy výsledná rychlostní konstanta je součtem fyzikální a chemické komponenty. Zhášení přenosem náboje představuje hlavní způsob deaktivace $^1\text{O}_2$ pomocí mimo jiné alifatických a aromatických aminů, organických komplexů niklu a chlorofylů (Schweitzer and Schmidt, 2003).

2.1.3.2 Elektronicky-vibrační přechod

Elektronicky-vibrační přechod (e-v) je proces deaktivace transformující excitační energii molekuly $^1\text{O}_2$ na vibrační energii $^3\text{O}_2$ a zhášeče. Tento způsob deaktivace byl pozorován pouze u zhášečů s vysokým oxidačním potenciálem a dostatečně vysokou energií tripletového stavu, vzhledem k tomu, že pro zhášeče s nízkými energiemi tripletových stavů je preferován přenos náboje, nebo elektronický přechod. (Schweitzer and Schmidt, 2003).

2.1.3.3 Elektronický přechod

Pro deaktivaci singletového kyslíku elektronickým přechodem (EET) je nutné, aby energie excitovaného stavu molekuly zhášeče byla nižší než energie singletového stavu kyslíku (nižší než 94 kJ mol^{-1} v případě singletového stavu kyslíku $^1\Delta_g$, nebo 157 kJ mol^{-1} v případě stavu $^1\Sigma_g$). Tento proces vede ke vzniku excitovaného stavu molekuly zhášeče.



Rovnice 2.11 a 2.12 popisují dva spinově dovolené elektronické přechody. Rovnice 2.11 popisuje zhášeč se základním singletovým stavem S_1 a tripletovým stavem s energií nižší než 94 kJ mol^{-1} , takovými zhášeči jsou například karotenoidy, ftalocyaniny, nebo azo-methinová barviva. Druhá rovnice 2.12 popisuje částice se základním singletovým stavem S_0 a tripletovým stavem T_1 s energií nižší než 157 kJ mol^{-1} což jsou například fullereny (Schweitzer and Schmidt, 2003).

2.1.4 Využití singletového kyslíku

Pro singletový kyslík lze nalézt řadu praktických aplikací, ať už to jsou oxidační vlastnosti využívané v syntéze, nebo fototoxicita využívaná k ničení mikroorganismů pro dezinfekci nebo při čištění odpadních vod. Významné využití nachází singletový kyslík také v medicíně – ve fotodynamické terapii (Lang et al., 2006).

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je metoda léčby nádorových a také řady nenádorových onemocnění, jako jsou například kožní léze nebo degenerativní choroby oka. Tato metoda spočívá v podání fotosenzibilizátoru pacientovi, a to intravenózně či lokálně. Fotosenzibilizátor je následně akumulován v nádorové tkáni, selektivita tohoto procesu je způsobena fyziologickou odlišností nádorových a zdravých tkání. Na odlišných charakteristikách těchto tkání je založen tzv. EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) efekt vysvětlující princip akumulace fotosenzibilizátoru s nosičem pouze v nádorové tkáni na základě velikosti částic a rozdílné stavby především cévního a lymfatického systému, například, zatímco nanočástice nejsou schopny ve zdravých tkáních proniknout mimo cévní systém, stavba cévního systému nádorové tkáně jim toto umožňuje. Další vlastnosti odlišující nádorovou tkáň jsou například nízké pH, způsobené zvýšenou glykolytickou aktivitou vedoucí k vyšší koncentraci laktátu, dále také vyšší počet receptorů nízkodenzitních lipoproteinů (LDL) nebo obsah makrofágů schopných pohlcovat a monomerizovat fotosenzibilizátory stejně jako léčiva vázaná na lipoproteiny.

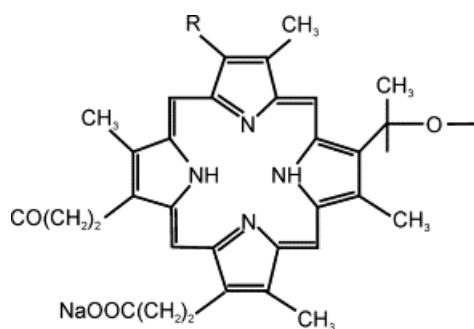
Ozáření pacienta světlem vhodné vlnové délky vede k procesům blíže popsaným v 2.1.2. Teoreticky využitelný rozsah vlnových délek je od 600 nm , což je vlnová délka položená výše než jsou absorpční pásy hemu, do 1300 nm , vzhledem k tomu, že při delších vlnových délkách již silně absorbuje voda. Prakticky využitelné jsou však jen vlnové délky do přibližně 850 nm , protože je nutné, aby záření mělo dostatečnou energii pro vybuzení fotosenzibilizátoru do stavu schopného produkce $^1\text{O}_2$ (Juzeniene et al., 2007; Golombek et al., 2018).

Singletový kyslík, vznikající přenosem energie z excitovaného fotosenzibilizátoru na kyslík rozpuštěný v tkáních, je cytotoxický, rakovinné buňky může ničit přímo, nebo nepřímo poškozením mikrovaskulatury tumoru, což poškozuje jeho výživu. Způsob, jakým dochází k buněčné smrti, je závislý na druhu použitého fo-

tosenzibilizátoru, jeho dávice a také na genotypu buněk. Doba života singletového kyslíku je krátká a tím je i jeho dosah limitovaný, což vede k selektivitě této metody léčby (Lang et al., 2006; Juzeniene et al., 2007). Mimo reakcí vedoucích ke vzniku singletového kyslíku mohou v prostředích s nízkým obsahem kyslíku probíhat také reakce typu I. V tomto případě reaguje excitovaný fotosenzibilizátor s organickým substrátem. Přenosem elektronu vzniká oxidovaný substrát a redukovaný fotosenzibilizátor. Redukovaný fotosenzibilizátor může reagovat s kyslíkem za vzniku dalších reaktivních forem kyslíku, které rovněž přispívají k destrukci rakovinných buněk (Macdonald and Dougherty, 2001).

Fotosenzibilizátory využívané pro PDT musí mít řadu vlastností. Zjevně je nutné, aby kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ byl dostatečně vysoký. Také je třeba, aby fotosenzibilizátor měl absorpční maxima v takzvaném terapeutickém okně, tedy v intervalu vlnových délek 600 – 850 nm a aby naopak byla jeho absorpce co nejnižší v oblasti maxima denního světla, tedy ve vlnových délkách 400 – 600 nm, absorpce v této oblasti by totiž mohla vést k fotosenzitizaci kůže. Fotosenzibilizátor by také měl vykazovat minimální toxicitu při nepřítomnosti záření ("temná" toxicita) a po dobu ozařování by měl být fotostabilní (Lang et al., 2006).

Obecně lze fotosenzibilizátory využitelné pro PDT rozdělit do tří generací. První generaci představují deriváty hematoporfyrinu (HpD), komerčně využívané například pod názvem Photofrin[®]. Fotosenzibilizátory této generace nepředstavují přesně definované látky, jedná se o směs monomerů, dimerů a oligomerů jež jsou vázány esterovými, nebo etherovými vazbami. Mezi nevýhody této generace fotosenzibilizátorů patří až 8 týdnů trvající fotosenzitivita kůže pacientů, dále absence použitelných absorpčních pásů při vlnových délkách větších než 650 nm, konkrétně pro Photofrin[®] je využívána vlnová délka 630 nm a jejich selektivita pro tumory není optimální (Castano et al., 2004; Allison et al., 2004). Fotosenzibilizátory druhé generace řadu nevýhod první generace eliminují, jedná se o chemicky čisté látky s vysokou absorbancí ve vlnových délkách 650-850 nm, které způsobují fotosenzitivitu trvající kratší dobu. Do této generace se řadí látky patřící mimo jiné mezi ftalocyaniny, naftalocyaniny, porfyriny a chloriny. Jako fotosenzibilizátory třetí generace jsou označovány fotosenzibilizátory druhé generace, jež jsou vázány na nosiče, což jim dává schopnost selektivní akumulace (Juzeniene et al., 2007).



Obr. 2.3: Strukturální vzorec Photofrinu[®] (Allison et al., 2004)

Rentgenem buzená fotodynamická terapie

Je zjevné, že fotodynamická terapie, jak byla popsána výše, může být využita pouze k léčbě nádorů a dalších onemocnění, k nimž se dostane světlo. Světlo v intervalu vlnových délek terapeutického okna však není schopné průchodu k hlouběji lokalizovaným cílům. Tuto nevýhodu eliminuje metoda zvaná rentgenem buzená fotodynamická terapie (PDTX), tedy metoda využívající rentgenové záření pro buzení PDT. Fotosenzibilizátory běžně využívané pro PDT však nejsou excitovány rentgenovým zářením, proto je nutné toto záření konvertovat. Tato konverze je zajišťována nanoscintilátory vázanými na fotosenzibilizátory. Obdobně jako u fotosenzibilizátorů je nutné, aby tyto nanočástice byly netoxické a snadno biodegradovatelné, ale zároveň stabilní po dobu ozařování. Fotosenzibilizátor pro takovouto aplikaci je nutno volit s ohledem na emisní spektrum nanoscintilátoru, tedy pro co největší efektivitu je nutné, aby se absorpční spektrum fotosenzibilizátoru překrývalo s emisním spektrem nanočástic (Sun et al., 2020). Nanoscintilátory zkoumané pro jejich využitelnost při PDTX jsou mimo jiné LuAG:Pr³⁺ – lutecito-hlinitý granát dopovaný praseodymem (Popovich et al., 2018), CeF₃:Tb³⁺ – fluorid ceritý dopovaný terbiem (Popovich et al., 2016), nebo ZnO:Ga – oxid zinečnatý dopovaný galliem (Procházková et al., 2019).

Jiný přístup, bez nutnosti použití nanoscintilátoru pro PDTX, nabízí vývoj nanočástic přímo schopných produkce ¹O₂ při ozáření rentgenovým zářením. Tuto schopnost mají například nanočástice založené na komplexech molybdenu Mo₆ (Kirakci et al., 2018).

2.2 Metody detekce singletového kyslíku

Metody použitelné k detekci singletového kyslíku lze rozdělit na metody fyzikální a chemické. Obdobně lze detekci klasifikovat jako přímou a nepřímou, kde přímou detekci představují metody fyzikální, nepřímou potom metody chemické.

2.2.1 Chemické metody

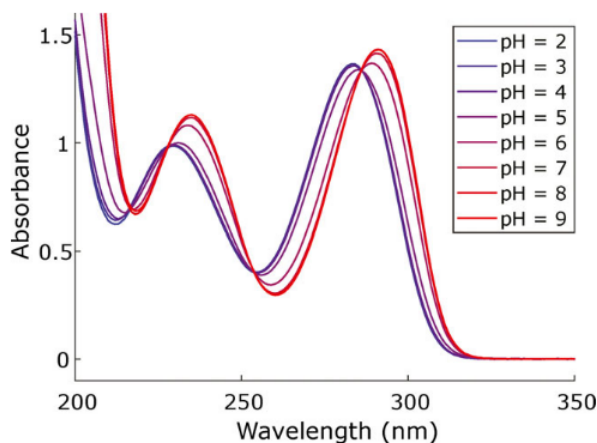
Chemické metody detekce singletového kyslíku využívají jeho reakcí vedoucích k charakteristickým produktům primární či sekundární fotooxidace. Nepřímé metody nejsou ve srovnání s těmi přímými experimentálně náročné a sondy, především fluorescenční, vykazují vysokou citlivost. Nevýhodou těchto metod je naopak fakt, že samotnou detekcí dochází ke spotřebě přítomného ¹O₂ a výše zmíněné reakce, jež jsou podstatou samotné detekce, nemusí být specifické pouze pro ¹O₂, ale také pro další reaktivní formy kyslíku. Pro spolehlivost těchto metod je také podstatná lokalizace sondy v místě tvorby ¹O₂ (Lang et al., 2005; Li et al., 2013).

2.2.1.1 Absorpční sondy

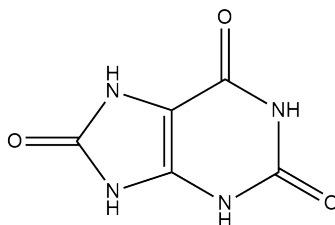
Detekce pomocí absorpčních sond je založena na změnách v absorpčních spektrech, konkrétně na posunu vlnové délky absorpčního pásu nebo snížení absorbance (You, 2018).

Kyselina močová

Kyselina močová je absorpční sonda využitelná pro detekci $^1\text{O}_2$ ve vodném prostředí. Pro určování kvantových výtěžků $^1\text{O}_2$ je sledováno odbarvování (*bleaching*) – tedy pokles absorbance především při vlnové délce 292 nm. Absorpční spektrum vykazuje závislost na pH, jak demonstruje obrázek 2.4. Toto je způsobeno disociací kyseliny močové (ve vodných roztocích $pK_{a1} = 5,30$; $pK_{a2} = 10,72$) kdy spektra aniontů kyseliny močové jsou vůči neutrální molekule posunuta směrem k vyšším vlnovým délkám (Bregnhøj et al., 2019; Rabello et al., 2012).



Obr. 2.4: Absorpční spektrum kyseliny močové ve vodném roztoku jako funkce pH (Bregnhøj et al., 2019)



Obr. 2.5: Strukturální vzorec kyseliny močové

Mezi výhody této sondy patří, jak již bylo zmíněno, její rozpustnost ve vodě, nenáročnost provedení měření. Také je biokompatibilní a sama nefunguje jako fotosenzibilizátor produkující $^1\text{O}_2$. Využití této sondy však provází i jisté nevýhody.

Kyselina močová není specifická pouze pro $^1\text{O}_2$, není tedy možné s jistotou říci, zda pozorované odbarvení bylo způsobeno $^1\text{O}_2$, nebo jinými reaktivními formami kyslíku. Kyselina močová taktéž může zhášet excitované stavy jiných látek přítomných v systému, například může docházet ke zhášení tripletového stavu fotosenzibilizátoru a tedy ovlivnění výsledného kvantového výtěžku $^1\text{O}_2$. Srovnání kvantových výtěžků pro dvě rozdílné koncentrace kyseliny močové v systému za použití fotosenzibilizátorů: flavinmononukleotid (FMN), 1-H fenalenon (PNS), bengálská červeň (RB), methylenová modř (MB) a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin (TPPS), uvádí tabulka 2.1 (Bregnhøj et al., 2019).

Tab. 2.1: Energie tripletových stavů fotosenzibilizátorů E_T , rychlostní konstanty zhášení tripletových stavů kyselinou močovou k_T , a srovnání kvantových výtěžků $^1\text{O}_2$ pro dvě různé koncentrace kyseliny močové (Bregnhøj et al., 2019)

Sensitizer	Triplet state energy, E_T (kJ mol $^{-1}$)	Rate constant of triplet state quenching by UA, k_T (10 9 M $^{-1}$ s $^{-1}$) [*]	Quantum yield of O $_2$ (a $^1\Delta_g$) production, ϕ_{Δ}^*	
			[UA] = 0 μM	[UA] = 200 μM
FMN	209 †	1.6 \pm 0.2	0.67 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03
PNS	182 ‡	1.5 \pm 0.2	0.97 \pm 0.06	0.51 \pm 0.04
RB	164 §	1.4 \pm 0.2	0.76 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04
MB	138 ¶	3.9 \pm 0.3	0.52 \pm 0.05	0.26 \pm 0.03
TPPS	138 ¶	< 0.05	0.73 \pm 0.06	0.72 \pm 0.06

^{*}Data were recorded in D $_2$ O-PBS at pD = 7.8 and thus reflect the effects of UA $^{\text{ma}}$. [†]Data for riboflavin (42). [‡]Data for unsulfonated 1H-phenalenone (PN) (43). [§]From reference (42). [¶]Data for unsulfonated tetraphenyl-porphyrin (TPP) (42).

DPBF

1,3-difenylyzobenzofuran (DPBF) je ve vodě nerozpustná spektroskopická sonda využitelná k detekci $^1\text{O}_2$. Absorpční maximum má při 410 nm, což je ilustrováno na obrázku 2.6. Samotná detekce je založena na reakci DPBF s $^1\text{O}_2$ vedoucí ke vzniku endoperoxidu, jehož rozpadem vzniká 1,2-dibenzoylbenzen. Ztráta π -systému izobenzofuranu vede ke ztrátě charakteristických spektroskopických vlastností, tedy snížení absorbance při 410 nm. DPBF může při fotoexcitaci fungovat sám jako fotosenzibilizátor produkující $^1\text{O}_2$, není tedy příliš vhodný pro použití v případech, kdy je využívána excitační vlnová délka kratší než 450 nm.

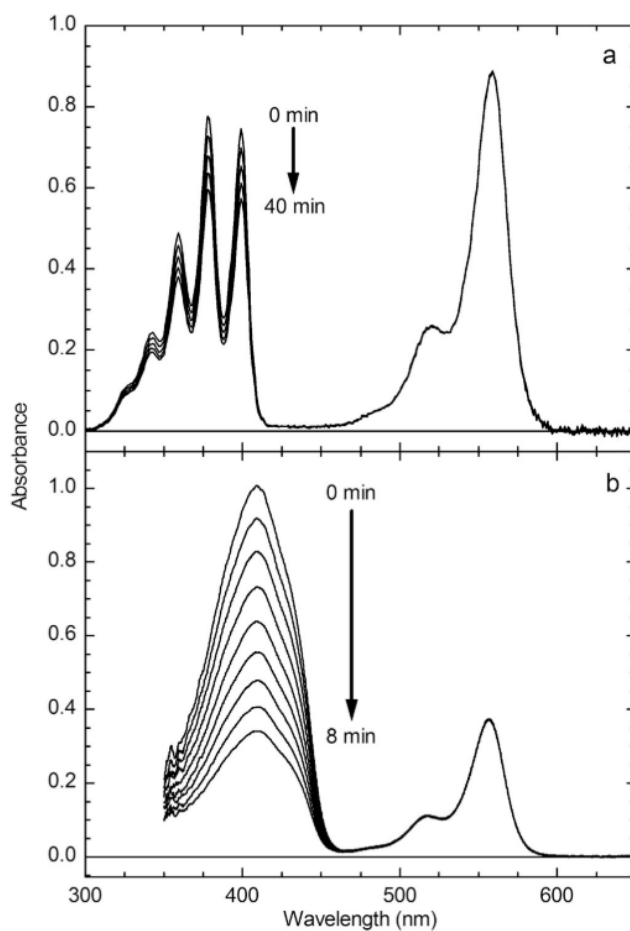
Obdobně jako kyselina močová nedisponuje DPBF specificitou pro $^1\text{O}_2$ a ochotně reaguje i s dalšími reaktivními formami kyslíku, především s $\text{O}_2^{\bullet-}$. DPBF se vyznačuje vysokou citlivostí, což tuto sondu činí vhodnou pro využití v systémech, kde je produkováno pouze malé množství $^1\text{O}_2$. Při použití této sondy je také nutno dbát na volbu rozpouštědla, ač se vlastnosti sondy v různých rozpouštědlech příliš neliší, výjimku tvoří rozpouštědla obsahující halogeny, v nichž DPBF podléhá fotooxidaci a takovýto systém tedy není vhodný pro kvantifikaci vzniklého singletového kyslíku (Entradas et al., 2020; Zhang and Li, 2011).

Mimo použití jako absorpční sondy lze DPBF použít také jako fluorescenční sondu s maximální intenzitou fluorescence při 453 nm. Obdobně jako v případě sledování poklesu absorbance je sledován pokles intenzity fluorescence (Zhang and Li, 2011).

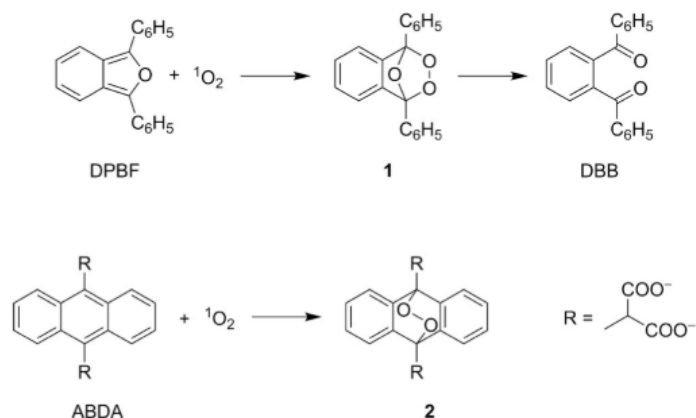
ABDA

9,10-antracendiyl-bis(methylen)dimalonová kyselina (ABDA) je derivát antracenu jež může sloužit jako ve vodě rozpustná absorpční sonda. Absorpční maxima má při 380 nm a 400 nm. Obdobně jako DBPF je detekce založena na reakci vedoucí na endoperoxid a tedy na snížení absorbance v maximech. Strukturu této sondy a tuto reakci znázorňuje obrázek 2.7.

Mezi výhody této sondy patří již dříve zmíněná rozpustnost ve vodě a na rozdíl od dříve zmíněných absorpčních sond specificita pro $^1\text{O}_2$, naopak ve srovnání s DPBF vykazuje značně menší citlivost a obdobně jako předchozí zmíněná sonda může ABDA být fotosenzibilizátorem produkujícím $^1\text{O}_2$ (Entradas et al., 2020).



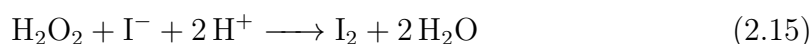
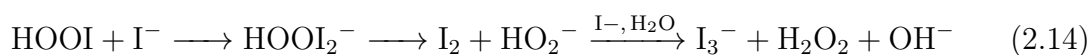
Obr. 2.6: Absorpční spektra (a) ABDA, (b) DPBF při ozařování v přítomnosti fotosenzibilizátoru RB v závislosti na čase (Entradas et al., 2020)

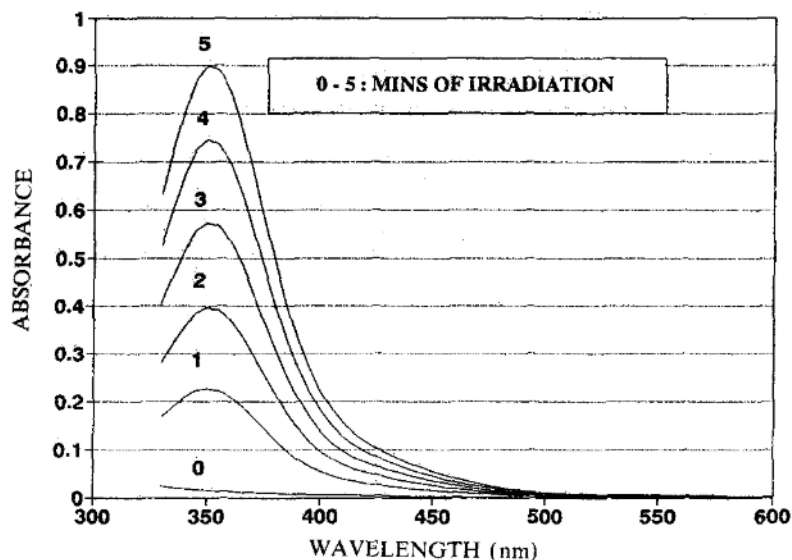


Obr. 2.7: Chemická struktura DPBF a ABDA a schemata reakcí s $^1\text{O}_2$ (Entradas et al., 2020)

Jodometrická detekce

Další z metod využitelných ve vodném prostředí je založena na reakci $^1\text{O}_2$ s I^- vedoucí ke vzniku trijodidových aniontů – průběh této reakce znázorňují rovnice (2.13) a (2.14), je-li reakce prováděna v mírně kyselém prostředí a je přítomen katalyzátor $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, probíhá také reakce znázorněná rovnicemi (2.15) a (2.16). Na rozdíl od předchozích zmíněných metod detekce je tato metoda založena na monitorování nárůstu absorpce, toto znázorňuje obrázek 2.8. Konkrétně je sledován nárůst absorpce I_3^- s absorpčním maximem 355 nm. Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí, avšak není zcela specifická pro $^1\text{O}_2$ (Mosinger and Mosinger, 1995).



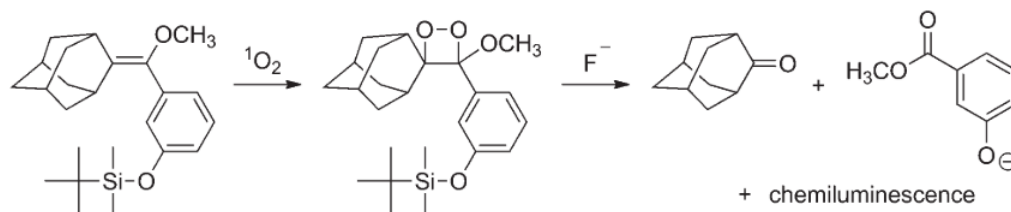


Obr. 2.8: Absorpční spektrum jodometrického roztoku po ozáření v přítomnosti Porfyrynu c. Absorpční spektrum Porfyrynu c bylo odstraněno (Mosinger and Mosinger, 1995)

2.2.1.2 Chemiluminiscenční sondy

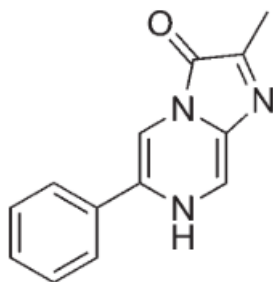
Jedním z dalších druhů sond využitelných pro detekci singletového kyslíku jsou chemiluminiscenční sondy, tedy sondy, u nichž dochází k detekci záření, jež je emitováno jako důsledek reakce sondy se singletovým kyslíkem. Řada těchto sond využívá aktivované alkeny, jejichž reakcí s $^1\text{O}_2$ vznikají 1,2-dioxetany. Takto vzniklý produkt se dále rozpadá za vzniku karbonylové sloučeniny v excitovaném stavu. K samotné emisi záření dochází při deaktivaci excitovaného stavu vzniklé karbonylové sloučeniny zářivým přechodem (You, 2018).

Zástupcem takovýchto sond je například methyl(vinyl)ether substituovaný spiroadamantylem a aryloxy skupinou, strukturní vzorec této sloučeniny a schema reakce s $^1\text{O}_2$ uvádí obrázek 2.9 Jedná se o sondu s časovou prodlevou mezi záchytem $^1\text{O}_2$ a emisí záření, je tedy vhodná i pro aplikace, kdy je $^1\text{O}_2$ generován fotochemicky. Jistou nevýhodou je nutnost přídavku F^- jako spouštěče rozkladu, jež vede k emisi záření. Tato sonda je použitelná ve vodném prostředí, je specifická pro $^1\text{O}_2$ a vykazuje vysokou citlivost (MacManus-Spencer et al., 2005).



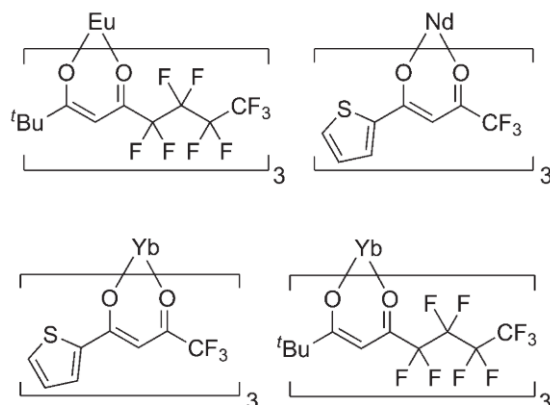
Obr. 2.9: Reakce chemiluminiscenční sondy s 1O_2 za vzniku dioxetanu (You, 2018)

Další skupinou chemiluminiscenčních sond jsou analogy látky zvané Cypridina luciferin (CLA), tyto sondy jsou citlivé, avšak ne specifické pro singletový kyslík, vzhledem k tomu, že jsou uváděny jako sondy pro detekci $O_2^{\bullet-}$. Také nejsou zcela vhodné pro případy, kdy je 1O_2 generován fotochemicky, a to kvůli bezprostřední emisi záření po reakci s 1O_2 (Sugioka et al., 1986; MacManus-Spencer et al., 2005).



Obr. 2.10: CLA chemiluminiscenční sonda (You, 2018)

Jako chemiluminiscenční sondy jsou využitelné také některé komplexy lanthanoidů, konkrétně se jedná o β -diketonátové komplexy Eu^{III} , Nd^{III} a Yb^{III} , jež emitují jak viditelné, tak blízké infračervené záření (Kazakov and Safarov, 2014).



Obr. 2.11: Komplexy Eu^{III} , Nd^{III} a Yb^{III} využitelné jako chemiluminiscenční sondy (You, 2018)

2.2.2 Fyzikální metody

Jedna z přímých metod detekce singletových stavů kyslíku, bez použití sond, je založena na sledování fosforescence, a to při 1270 nm v případě nižšího singletového stavu $^1\Delta_g$ a 765 nm u energeticky bohatšího singletového stavu $^1\Sigma_g$. V porovnání s chemickými metodami nemění tato přímá metoda složení systému, avšak kvantové výtěžky fosforescencí se pohybují v závislosti na použitém rozpouštědle okolo $10^{-4} - 10^{-7}$, z čehož plyne instrumentální náročnost této metody.

$^1\text{O}_2$ je také možné detekovat pomocí kalorimetrických metod a to za použití metody TRTL (*time resolved thermal lensing*) založené na měření změny indexu lomu v důsledku uvolnění tepla při vzniku a reakcích $^1\text{O}_2$ nebo LIOAS (*laser-induced optoacoustic spectroscopy*) jež detekuje tlakové rázy (Lang et al., 2005).

2.3 Fotosenzibilizátory

Aplikace singletového kyslíku ve fotomedicíně, především ve fotodynamické terapii vedly v posledních letech ke studiu fotosenzibilizátorů produkujících $^1\text{O}_2$. Jako fotosenzibilizátory označujeme řadu barviv, aromatických a heterocyklických sloučenin a barevných kovových komplexů (Lang et al., 2005). Vhodný fotosenzibilizátor by měl mít následující vlastnosti (DeRosa, 2002):

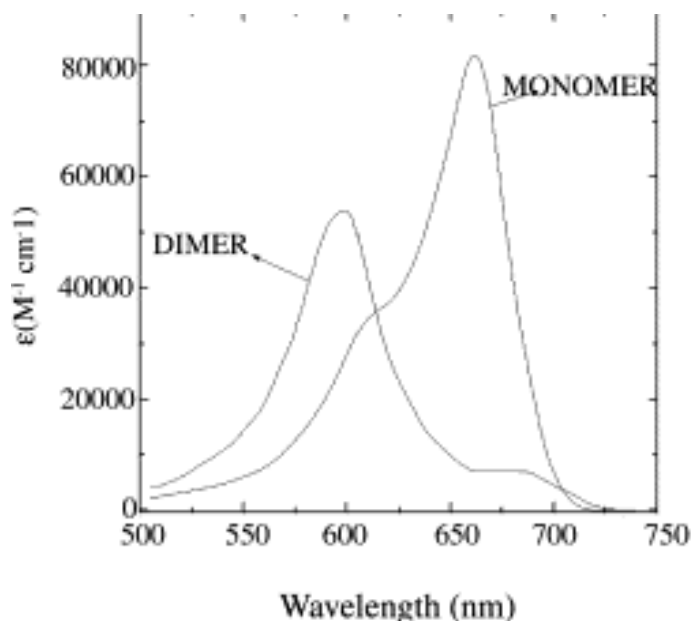
- Vysoký absorpční koeficient ve spektrální oblasti použitého excitačního světla
- Tripletový stav vhodné energie ($E_T \geq 95 \text{ kJ mol}^{-1}$) pro zajištění účinného přenosu energie na kyslík v základním stavu
- Vysoký kvantový výtěžek tripletového stavu ($\phi_T = 0,4$) a dlouhou dobu života tohoto stavu ($\tau_T > 1 \mu\text{s}$)

- Vysokou fotostabilitu

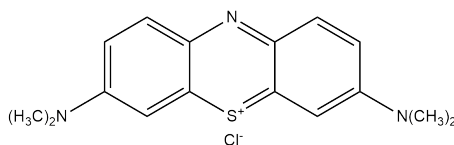
Samotné procesy vedoucí ke vzniku singletového kyslíku při fotosenzitizovaných reakcích byly blíže popsány v kapitole 2.1.2.

2.3.1 Methylenová modř

Methylenová modř je barvivo řadící se mezi fenothiazinové sloučeniny. Její charakteristické zbarvení je způsobeno silným absorpčním pásem v oblasti 550 – 700 nm. Absorpční spektrum methylenové modři je závislé na koncentraci, vzhledem ke tvorbě dimerů ve vodných roztocích. Monomery mají absorpční maximum při 664 nm, dimery pak při 590 nm. V etanolových nebo zředěných vodných roztocích, ve kterých se nenacházejí dimery, dosahuje kvantový výtěžek tripletového stavu methylenové modři ϕ_T hodnoty 0,52 a kvantový výtěžek $^1O_2 - \phi_\Delta \sim 0,5$ (Tardivo et al., 2005). Noimark et al. uvádí, že excitace dimerů methylenové modři nevede k výrazné tvorbě singletového kyslíku, vzhledem k příliš krátké době života těchto excitovaných stavů.



Obr. 2.12: Absorpční spektrum monomeru a dimeru methylenové modři (Tardivo et al., 2005)



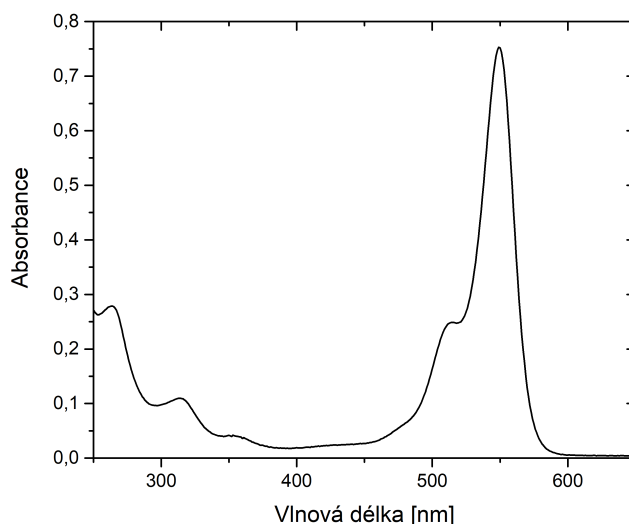
Obr. 2.13: Strukturální vzorec methylenové modři

2.3.2 Bengálská červeň

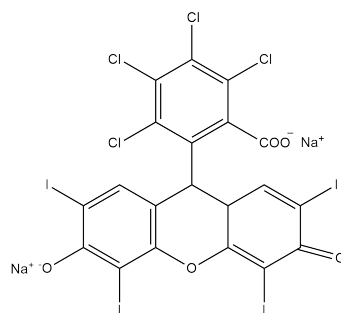
Bengálská červeň je tetrajodo-substituovaný derivát xantenu využitelný jako fotosenzibilizátor produkující $^1\text{O}_2$ jak ve vodném prostředí tak v prostředí nižších alkoholů. Absorpční maximum tohoto barviva se nachází v zelené oblasti viditelného spektra, konkrétní vlnová délka, při níž dosahuje absorpce maxima, je pak závislá na použitém rozpouštědle (DeRosa, 2002; Rauf et al., 2009). Dle Xu and Neckers (1987) dochází ve vodných a methanolových roztocích RB s koncentrací vyšší než $2 \cdot 10^{-6}$ M ke vzniku agregátů RB. Produkce $^1\text{O}_2$ těmito agregáty je dle Bilski et al. (1991) potlačena, vlivem blízkosti molekul, která snižuje dobu života tripletového stavu fotosenzibilizátoru.

Tab. 2.2: Kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ pro bengálskou červeň v různých rozpouštědlech (DeRosa, 2002)

Rozpouštědlo	ϕ_Δ
D ₂ O	0,76
H ₂ O	0,75
EtOH	0,68
CH ₃ OH	0,76



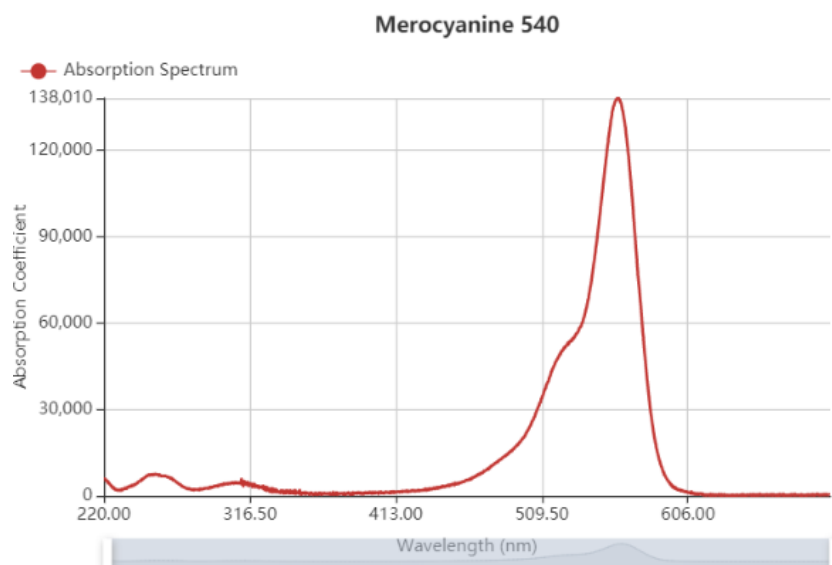
Obr. 2.14: Absorpční spektrum 10^{-5} M bengálské červeně



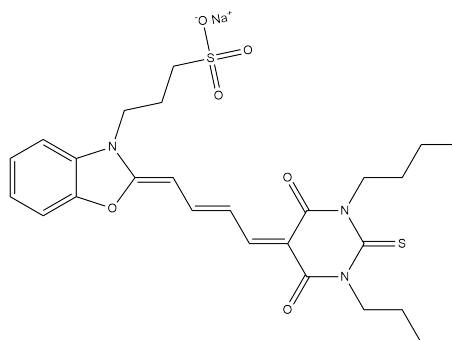
Obr. 2.15: Strukturální vzorec bengálské červeně

2.3.3 Merocyanin 540

Merocyanin 540 (MC540) je aniontové polymethinové barvivo. Absorpční maxima tohoto fotosenzibilizátoru se pohybují v rozmezí 530 – 568 nm. Oproti předchozím zmíněným barvivům dosahují kvantové výtěžky $^1\text{O}_2$ značně nižších hodnot, například Hoebeke et al. uvádí kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ v etanolu 0,007. Jako i další cyaniny může totiž toto barvivo podléhat fotoizomeraci, což je kompetitivní proces k samotné produkci $^1\text{O}_2$ a probíhá s výrazně vyššími kvantovými výtěžky (Hoebeke et al., 1988; Čunderlíková and Šikurová, 2001).



Obr. 2.16: Absorpční spektrum MC540 (Hoebeke et al., 1990)



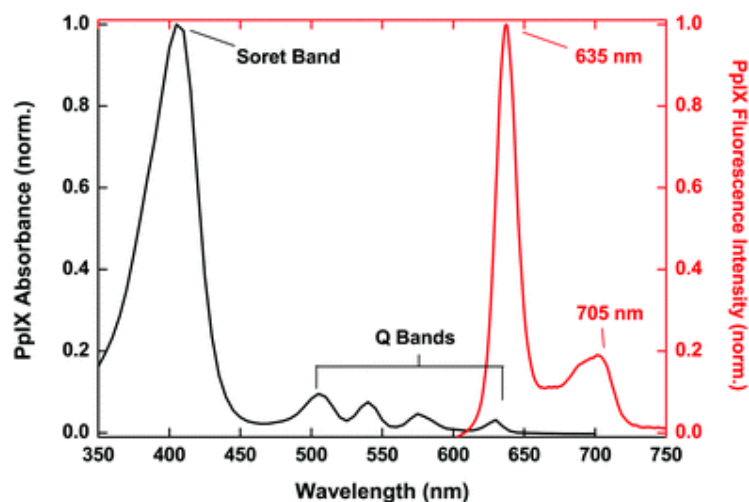
Obr. 2.17: Strukturní vzorec MC540

2.3.4 Porfyriny a ftalocyaniny

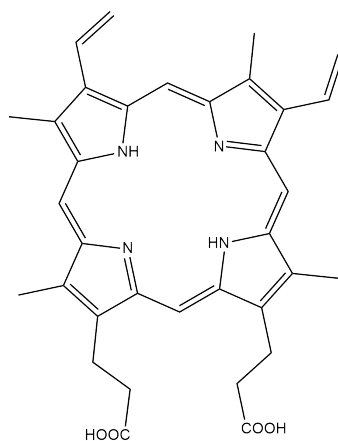
Díky své podobě přirozeně se vyskytujícím sloučeninám v živých soustavách se porfyriny jeví být ideálními kandidáty pro biologické generování singletového kyslíku. Porfyriny a jejich deriváty mají několik absorpčních pásů v UV-VIS části spektra, Soretův pás v modré oblasti a Q-pásky ve žluté a červené oblasti. Dlouhé doby života tripletových stavů mnoha porfyrinů vedou k vysokým kvantovým výtěžkům, avšak pro určité aplikace, mimo ty biologické, kde je rozpad fotosenzibilizátoru po použití nutný, může být problematická náchylnost některých porfyrinů k fotodegradaci vznikajícím $^1\text{O}_2$ (DeRosa, 2002).

Protoporfyrin IX

Protoporfyrin IX (PPIX) je zástupcem biogenních fotosenzibilizátorů, vzhledem k tomu, že představuje poslední meziprodukt při biosyntéze hemu. Akumulace PPIX v lidském těle, vlivem porušení dráhy syntézy hemu, vede k fotosenzitivitě a poškození jater, je-li však cíleně podána kyselina δ -aminolevulová (ALA), která je jedním z prekurzorů PPIX při syntéze hemu, může být nadbytek PPIX v určitých tkáních využit jako základ pro fotodynamickou terapii (Sachar et al., 2016).



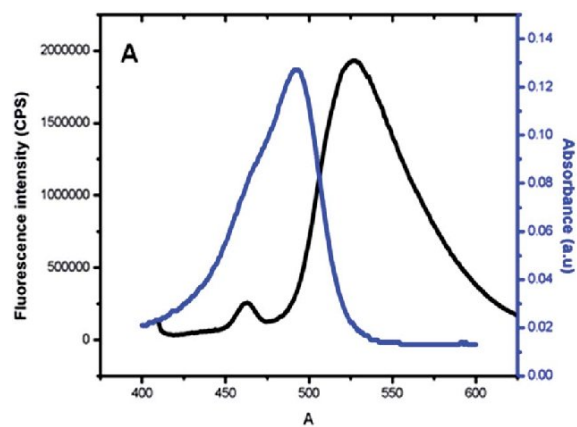
Obr. 2.18: Absorpční a emisní spektrum PPIX (Valentine et al., 2013)



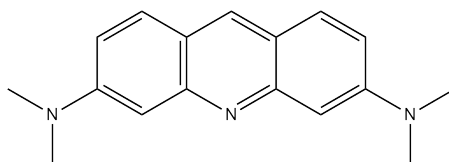
Obr. 2.19: Strukturální vzorec PPIX

2.3.5 Akridinová oranž

Akridinová oranž je fluorescenční barvivo, derivát akridinu, využitelné jako fotosenzibilizátor s absorpčním maximem při 497 nm. Na rozdíl od výše uvedených fotosenzibilizátorů je akridinová oranž využitelná také jako radiosenzibilizátor, tedy je možno ji využít k produkci singletového kyslíku při použití rentgenového záření a představuje tedy látku studovanou pro její možnou aplikaci pro PDTX (Larue et al., 2018).



Obr. 2.20: Absorpční a emisní spektrum akridinové oranže (Pitchaimani et al., 2014)



Obr. 2.21: Strukturální vzorec akridinové oranže

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
Hydroxid sodný	$NaOH$	Penta	p.a.	40
Heptahydrát síranu železnatého	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	Sigma-Aldrich	99-103,4%	278,01
Chlorid sodný	$NaCl$	Roth	$> 99,5\%$	58,44
Kyselina sírová 96%	H_2SO_4	Lach-Ner	p.a.	98,08
Jodičnan draselný	KIO_3	Penta	p.a.	214
Jodid draselný	KI	Lachema	p.a.	166,01
Tetrahydrát molybdenanu amonného	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	-	-	1235,86
Tetraboritan sodný	$Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$	Lachema	p.a.	371,34
Tris(oxalato)železitan draselný	$K_3[Fe(C_2O_4)_3]$	-	-	381,35
1,10-fenantrolin monohydrát	$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$	Penta	p.a.	198,24
Octan sodný trihydrát	$CH_3COONa \cdot 3 H_2O$	Penta	p.a.	136,08

3.2 Příprava zásobních roztoků

3.2.1 Příprava Frickeho dozimetru

Frickeho dozimetr byl připravován o objemu 500 ml ve složení 1 mM FeSO_4 , 1 mM NaCl a 0,4 M H_2SO_4 . V 500ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,13869 g FeSO_4 , 0,02922 g NaCl a 11 ml H_2SO_4 . Baňka byla ponechána v temnu hodinu otevřená pro nasycení kyslíkem.

3.2.2 Příprava jodid-jodičnanového aktinometru

Pro přípravu 100 ml roztoku jodid-jodičnanového aktinometru obsahujícího 0,1 M KIO_3 , 0,6 M KI a 0,01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ bylo v 100ml odměrné baňce rozpuštěno 9,95852 g KI , 2,14446 g KIO_3 a 0,37460 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$.

3.2.3 Příprava ferrioxalátového aktinometru

Pro přípravu 25 ml ferrioxalátového aktinometru obsahujícího 0,15 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ bylo ve 25ml odměrné baňce rozpuštěno 1,842 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$, bylo přidáno 2,5 ml 0,5M roztoku H_2SO_4 a baňka byla doplněna po rysku vodou.

3.2.4 Příprava zásobního roztoku fenantrolinu

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

3.2.5 Příprava octanového pufru

Do 200ml odměrné baňky byl připraven 0,5 M roztok H_2SO_4 smísením vody s 5,3 ml 96% H_2SO_4 . Do druhé 200ml odměrné baňky byl připraven 1 M roztok octanu sodného rozpuštěním 27,2 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Z těchto roztoků byl připraven octanový pufr. Do 200ml baňky bylo odlito 120 ml roztoku octanu sodného, bylo přidáno 72 ml roztoku H_2SO_4 a baňka byla po rysku doplněna vodou.

3.2.6 Příprava zásobního roztoku RB

Výchozí roztok RB byl připraven o koncentraci 10^{-4} M. Tento roztok byl připraven ve 100ml odměrné baňce rozpuštěním 10,17 mg RB ve vodě.

3.2.7 Příprava zásobního roztoku sondy ABDA

Nejprve byl připravován zásobní roztok s koncentrací sondy ABDA 10 mM rozpuštěním 20,54 mg sondy ve vodě v 5ml odměrné baňce. Protože nedocházelo k rozpuštění pevné látky, byla baňka vložena na 1 hodinu a 45 minut do ultrazvukové lázně. Vzhledem k tomu, že ani pomocí ultrazvukové lázně nebylo dosaženo rozpuštění sondy, byl roztok zředěn na koncentraci 1 mM převedením suspenze do 50ml odměrné baňky a doplněním baňky vodou po rysku. Ani po tomto zředění a dalším vložení do ultrazvukové lázně nedošlo k rozpuštění sondy. Na základě práce (Šarkady, 2011) byl pro rozpuštění sondy využit přídavek NaOH. Roztok NaOH o koncentraci 5,075 M byl připraven rozpuštěním 2,030 g NaOH v 10 ml vody. Přínos tohoto kroku byl otestován přidáním 10 μ l roztoku NaOH do 3 ml odebraných z roztoku sondy ABDA, vzhledem k tomu že tento přídavek vedl k rozpuštění sondy, bylo ke zbylým 47 ml zásobního roztoku sondy ABDA přidáno 25 μ l roztoku NaOH. Přídavek NaOH vedl k úplnému rozpuštění sondy.

3.2.8 Příprava zásobního roztoku jodidové absorpční sondy

Jodidová sonda byla připravována do celkového objemu 500 ml s koncentracemi jednotlivých složek vycházejícími z článku (Mosinger and Mosinger, 1995), 0,2 M KH_2PO_4 , 0,12 M KI a 10 μ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Základem sondy byl pufr vytvořený rozpuštěním 13,68 g KH_2PO_4 ve vodě, pH roztoku bylo následně přídatkem 5,8 ml dříve připraveného 5,075 M NaOH upraveno na hodnotu 6,218. V tomto roztoku bylo následně rozpuštěno 5,96 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ a 9,96 g KI, následně byla odměrná baňka doplněna po rysku vodou na objem 500 ml.

3.3 Využité přístroje

3.3.1 Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus spektrofluorimetr

Ozařování vzorků ve viditelné části spektra bylo prováděno na spektrofluorimetru FluoroMax Plus. Zdrojem záření pro excitaci je v přístroji xenonová výbojka s výkonem 150 W. 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 dvěma detektory, referenčním detektorem skládajícím se z křemíkové fotodiody pro korekce na fluktuaci výkonu xenonové výbojky a detektorem snímajícím signál ze vzorku, který je tvořen fotonásobičem R928P s rozsahem odezvy 180 – 850 nm. Pro ozařování vzorků byla využívána možnost kinetického měření. Šířka štěrbin excitačního monochromátoru byla nastavena přístrojem na základě hodnoty parametru bandpass nastaveného na 29 nm. Stejným způsobem byl bandpass nastaven pro emisní monochromátor jako 0,01 nm.

3.3.2 Rentgenová trubice Siemens

Ozařování vzorků rentgenovým zářením bylo prováděno pomocí rentgenové trubice Siemens s měděnou katodou. Zdroj vysokého napětí byl použit Arem Pro AP-4030 dodávající proud 20,5 mA při napětí 30,5 kV.

3.3.3 Varian Cary 100 UV-VIS spektrofotometr

Primárně byla měření absorpance a absorpčních spekter prováděna na spektrofotometru Varian Cary 100. Jedná se o dvoupraskový 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.

3.3.4 Thermo Scientific Genesys 20 spektrofotometr

Po dobu, kdy byl spektrofotometr Cary 100 nefunkční byl pro měření absorpance vzorků využíván přístroj Genesys 20. Jedná se o jednopaprskový přístroj se schopností měřit v rozsahu vlnových délek 325 – 1100 nm. Zdrojem světla v přístroji je wolfram-halogenová lampa, jako detektor slouží křemíková fotodioda.

3.4 Stanovení charakteristik zdrojů záření

3.4.1 Stanovení toku fotonů Xe lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus

Tok fotonů xenonové lampy při 254 nm byl určován pomocí roztoku jodid-jodičnanového aktinometru. 3 ml roztoku aktinometru v křemenné kyvetě byly ozařovány 3, 5, 8, 10, 12, 15 a 20 minut. Absorbance při vlnové délce 352 nm všech vzorků, včetně neozařeného vzorku, byla měřena na spektrofotometru Cary 100. Pro snížení maximální měřené absorpance do oblasti lineární odezvy spektrofotometru bylo do křemenné kyvety pipetováno 300 μ l ozářeného vzorku a 2700 μ l vody.

Tok fotonů xenonové lampy při 546 nm byl určován pomocí ferrioxalátového aktinometru. 3 ml roztoku aktinometru v křemenné kyvetě byly ozařovány 3, 5, 8, 10, 20 a 30 minut. Pro spektrofotometrické stanovení byl 1 ml každého vzorku převeden do 25ml odměrné baňky a bylo přidáno 0,5 ml octanového pufru, 4 ml roztoku fenantrolinu, baňky byly doplněny vodou a ponechány 1 hodinu ve tmě. Následně byla měřena absorpance při vlnové délce 510 nm na spektrofotometru Cary 100.

3.4.2 Stanovení dávkového příkonu RTG zdroje

Do plastové ampulky o objemu 15 ml bylo napipetováno 10 ml roztoku Frickeho dozimetru. Ampule byla umístěna do držáku ve vzdálenosti 2 cm od výstupního okénka rentgenové trubice. Vzorek byl ozařován v 15-ti minutových intervalech, celková doba ozařování byla 90 minut. Po každém ozařování byly ze vzorku pipetovány 3 ml do křemenné kyvety a na spektrofotometru Cary 100 byla měřena absorbance při vlnové délce 303 nm.

3.5 Experimenty s bengálskou červení a jodidovou absorpční sondou

3.5.1 Měření změn absorbance roztoku jodidové absorpční sondy

Pro zjištění vlivu ozařování na chování roztoku jodidové absorpční sondy bez přítomnosti fotosenzibilizátoru byl do křemenné kyvety připraven roztok 2700 μl sondy a 300 μl deionizované vody. Tento roztok byl ozařován pomocí spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 549 nm. Ozařovací časy byly zvoleny v intervalu 0 – 30 minut. Každé ozařování bylo následováno měřením absorpčního spektra na spektrofotometru Cary 100.

3.5.2 Měření změn absorbance roztoku RB a jodidové absorpční sondy

Měřené roztoky byly vytvořeny v křemenné kyvetě smícháním 2700 μl jodidové absorpční sondy a 300 μl zásobního roztoku RB. Vzorky byly ozařovány xenonovou výbojkou spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 549 nm. Ozařovací časy byly zvoleny v intervalu 0 – 5 minut. Absorpční spektrum každého vzorku, včetně vzorku neozářeného, bylo měřeno na spektrofotometru Cary 100.

3.6 Experimenty s bengálskou červení a sondou ABDA

3.6.1 Měření změn absorbance roztoku RB

Pro vytvoření roztoku RB s koncentrací 10^{-5} M, zvolené na základě článku (Entradas et al., 2020), bylo do křemenné kyvety pipetováno 300 μl zásobního roztoku RB a 2700 μl deionizované vody. Tento roztok byl ozařován po 10-ti až 30-ti minutových

intervalech do maximálního ozařovacího času 230 minut při vlnové délce 549 nm na spektrofluorimetru FluoroMax Plus. Absorpční spektra vzorku byla měřena na spektrofotometru Cary 100.

Experiment byl opakován se stejným postupem pro ozařování roztoku o identickém složení při jiné vlnové délce, a to 532 nm. Při tomto experimentu nebyla měřena absorpční spektra, vzhledem k poruše spektrofotometru Cary 100 byly na spektrofotometru Genesys 20 měřeny pouze hodnoty absorbance při vlnové délce 549 nm.

3.6.2 Měření změn absorbance roztoku sondy ABDA

Pro popsání chování roztoku sondy ABDA při ozařování bez přítomnosti fotosenzibilizátoru byl proveden experiment s koncentrací sondy volenou na základě článku (Entradas et al., 2020) jako 10^{-4} M. Roztok byl vytvořen pipetováním $300 \mu\text{l}$ zásobního roztoku sondy ABDA a $2700 \mu\text{l}$ deionizované vody do křemenné kyvety. Vzorek byl ozařován při vlnové délce 549 nm v 10-ti minutových intervalech, celkově po dobu 90 minut na spektrofluorimetru FluoroMax Plus. Po každém ozařování byla na spektrofotometru Cary 100 měřena absorpční spektra.

3.6.3 Měření změn absorbance roztoku RB a sondy ABDA

Koncentrace složek vzorku byly zvoleny 10^{-4} M ABDA a 10^{-5} M RB. Do křemenné kyvety bylo pipetováno $300 \mu\text{l}$ zásobního roztoku RB, $300 \mu\text{l}$ zásobního roztoku sondy ABDA a $2400 \mu\text{l}$ deionizované vody. Vzorek byl ozařován v 5-ti minutových intervalech na spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 549 nm. Absorpční spektra vzorku byla měřena na spektrofotometru Cary 100.

Obdobně jako pro roztok RB byl i tento experiment opakován pro vzorek s identickým složením ozařovaný při vlnové délce 532 nm. Při tomto experimentu nebyla rovněž měřena absorpční spektra pro poruchu spektrofotometru Cary 100. Na spektrofotometru Genesys 20 byly měřeny absorbance při vlnových délkách 549 nm a 401 nm.

3.6.4 Měření změn absorbance sondy ABDA v závislosti na koncentraci RB

Pro experiment byly využity roztoky s klesající koncentrací fotosenzibilizátoru RB, od 10^{-6} M do 10^{-9} M, s konstantní koncentrací sondy ABDA v každém vzorku 10^{-4} M. Pro přípravu vzorků s nižší koncentrací RB byl ze zásobního roztoku nejprve připraven roztok s koncentrací 10^{-6} M smícháním $20 \mu\text{l}$ zásobního roztoku RB a $1980 \mu\text{l}$ deionizované vody. Vzorky byly připravovány v křemenné kyvetě smícháním odpovídajícího objemu fotosenzibilizátoru, $300 \mu\text{l}$ sondy ABDA a odpovídajícího množství deionizované vody do celkového objemu 3 ml. Vzorky byly ozařovány na spektrofluorimetru FluoroMax Plus. Intervaly a maximální délka ozařování byly

voleny v závislosti na poklesu absorpance sondy ABDA. Absorpční spektra vzorků byla měřena na spektrofotometru Cary 100.

3.6.5 Měření změn absorpance roztoku RB a azidu sodného

Pro experiment byl využit zásobní roztok NaN_3 s koncentrací 10^{-2} M. Měřený roztok byl vytvořen v křemenné kyvetě smícháním $300 \mu\text{l}$ zásobního roztoku NaN_3 , $300 \mu\text{l}$ RB a $2400 \mu\text{l}$ deionizované vody. Ozařování bylo prováděno na spektrofluorimetru FluoroMax Plus při 549 nm v 10-ti minutových intervalech do celkové doby 90 minut. Absorpční spektra vzorku byla měřena na spektrofotometru Cary 100.

3.6.6 Měření změn absorpance roztoku sondy ABDA, RB a azidu sodného

Měřený roztok byl připraven v křemenné kyvetě smícháním $300 \mu\text{l}$ zásobního roztoku NaN_3 , $300 \mu\text{l}$ RB, $300 \mu\text{l}$ sondy ABDA a $2100 \mu\text{l}$ deionizované vody. Vzorek byl ozařován na spektrofluorimetru FluoroMax Plus při 549 nm po 5-ti až 10-ti minutových intervalech do celkové doby 100 minut. Absorpční spektra vzorku byla měřena na spektrofotometru Cary 100.

3.6.7 Měření změn absorpance roztoku sondy ABDA po ozařování RTG

Roztok pro ozařování byl připraven v plastové ampulce o objemu 15 ml smícháním 1 ml zásobního roztoku sondy ABDA a 9 ml vody. Vzorek, umístěný v držáku 2 cm od výstupního okénka rentgenové trubice, byl ozařován v 15-ti minutových intervalech do 90 minut. Po každém 15 minutovém ozařování byly ze vzorku odebrány 3 ml roztoku do křemenné kyvety a na spektrofotometru Cary 100 bylo měřeno absorpční spektrum.

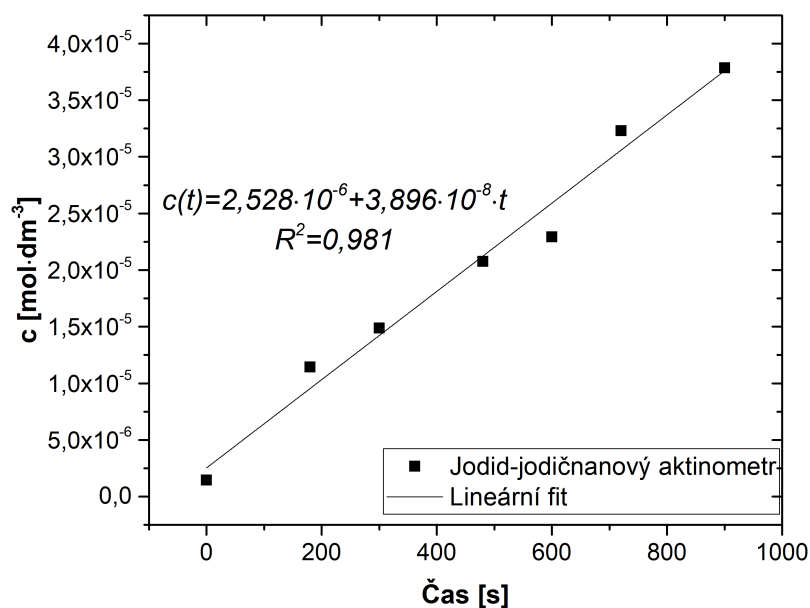
3.6.8 Měření změn absorpance roztoku sondy ABDA a RB po ozařování RTG

Pro ozařování byl vytvořen roztok sondy a fotosenzibilizátoru se stejnými koncentracemi jednotlivých složek jako při ozařování viditelným světlem, 10^{-4} M ABDA a 10^{-5} M RB. Do plastové ampulky o objemu objemu 15 ml byl pipetován 1 ml zásobního roztoku sondy ABDA, 1 ml zásobního roztoku RB a 8 ml vody. Roztok byl ozařován ve vzdálenosti 2 cm od výstupního okénka rentgenové trubice v 5-ti, 10-ti, nebo 15-ti minutových intervalech do celkové doby 90 minut. Po každém ozařování byly z plastové ampulky pipetovány 3 ml vzorku do křemenné kyvety, následně byla na spektrofotometru Genesys 20 měřena absorpční spektra.

4 Vyhodnocení a diskuze

4.1 Charakterizace zdrojů záření

4.1.1 Stanovení toku fotonů Xe lampy při vlnové délce 254 nm

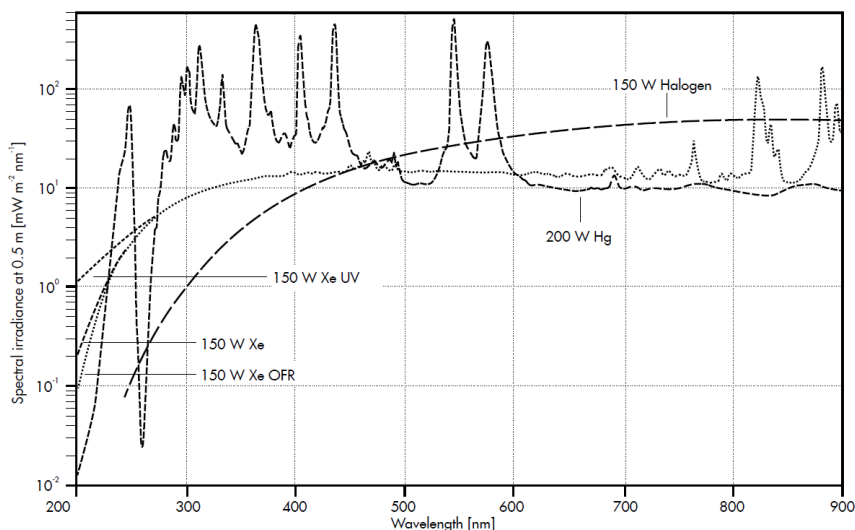


Obr. 4.1: Závislost koncentrace I_3^- na čase

Tok fotonů Xe lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus při vlnové délce 254 nm byl určen pomocí jodid-jodičnanového aktinometru. Stanovení toku fotonů spočívalo ve sledování produkce I_3^- iontů. Konstanty pro toto stanovení byly převzaty z Čuba et al. (2018). Pomocí naměřených hodnot absorbance při 352 nm a známé hodnoty molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon(I_3^-)^{352\text{nm}} = 27600 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla sestavena závislost koncentrace I_3^- iontů na době ozařování. Tato závislost je znázorněna na obrázku 4.1. Výsledná hodnota toku fotonů byla určena pomocí zjištěné časové závislosti koncentrace I_3^- iontů a kvantového výtěžku vzniku I_3^- iontů

($\Phi_{253,7\text{nm}} = 0,69$). Tímto způsobem byl tok fotonů určen jako $1,02 \cdot 10^{15}$ fot/s.

Je nutné uvést, že určený tok fotonů při 254 nm nebude identický s tokem fotonů při vlnových délkách 549 nm a 532 nm, které byly používány k ozařování vzorků. Z grafu na obrázku 4.2 (použitou výbojku reprezentuje křivka označená 150 W Xe OFR) vyplývá, že tok fotonů při vlnových délkách použitých pro ozařování bude vyšší než hodnota určená pomocí jodid-jodičnanového aktinometru.



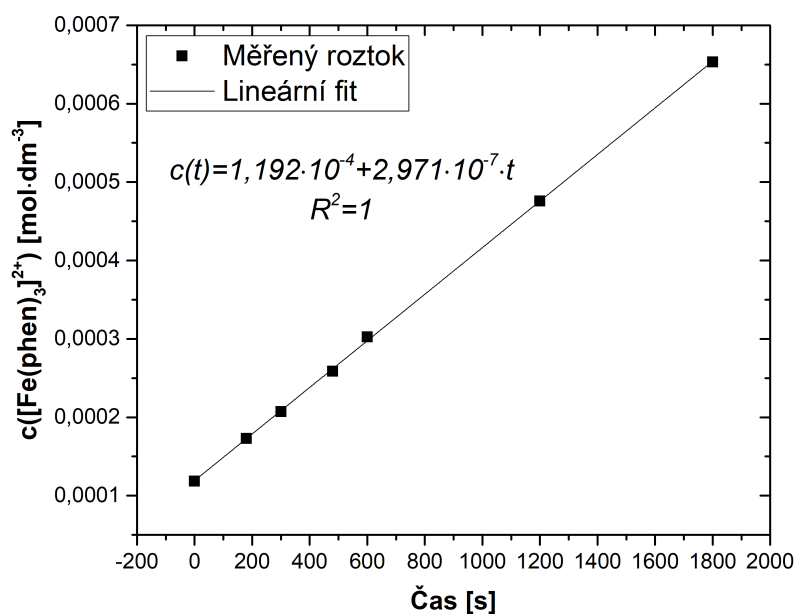
Obr. 4.2: Závislost spektrální intenzity záření ve vzdálenosti 0,5 m na vlnové délce pro různé lampy, uváděná výrobcem LOT-Quantum Design GmbH.

4.1.1 Stanovení toku fotonů Xe lampy při vlnové délce 546 nm

Jak již bylo uvedeno, hodnota toku fotonů určená pomocí jodid-jodičnanového aktinometru přesně nereprezentuje tok fotonů při vlnových délkách použitých pro ozařování. Z tohoto důvodu byl hledán jiný aktinometr, vhodný pro určení toku fotonů v oblasti vlnových délek 530 nm – 550 nm. Zvolen byl ferrioxalátový aktinometr, který na základě údajů z článku Hatchard et al. (1956) umožňuje stanovení toku fotonů při vlnové délce 546 nm.

Použití ferrioxalátového aktinometru spočívá ve spektrofotometrickém sledování nárůstu koncentrace Fe^{2+} iontů vázaných s fenantrolinem v komplexu $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$. Hodnota molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon([\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+})^{510\text{nm}} = 11100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla převzata z Čuba et al. (2018), kvantový výtěžek ferrioxalátového aktinometru při 546 nm ($\Phi_{546\text{nm}} = 0,15$) potom z Hatchard et al. (1956).

Naměřené hodnoty absorbance při 510 nm byly na základě známé hodnoty molárního extinkčního koeficientu komplexu $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ přepočítány na koncentraci. Z těchto hodnot byla sestavena závislost koncentrace na době ozařování, kterou demonstruje obrázek 4.3. Pomocí směrnice závislosti koncentrace na čase a kvantového výtěžku ferrioxalátového aktinometru byl tok fotonů určen jako $3,58 \cdot 10^{15}$ fot/s.



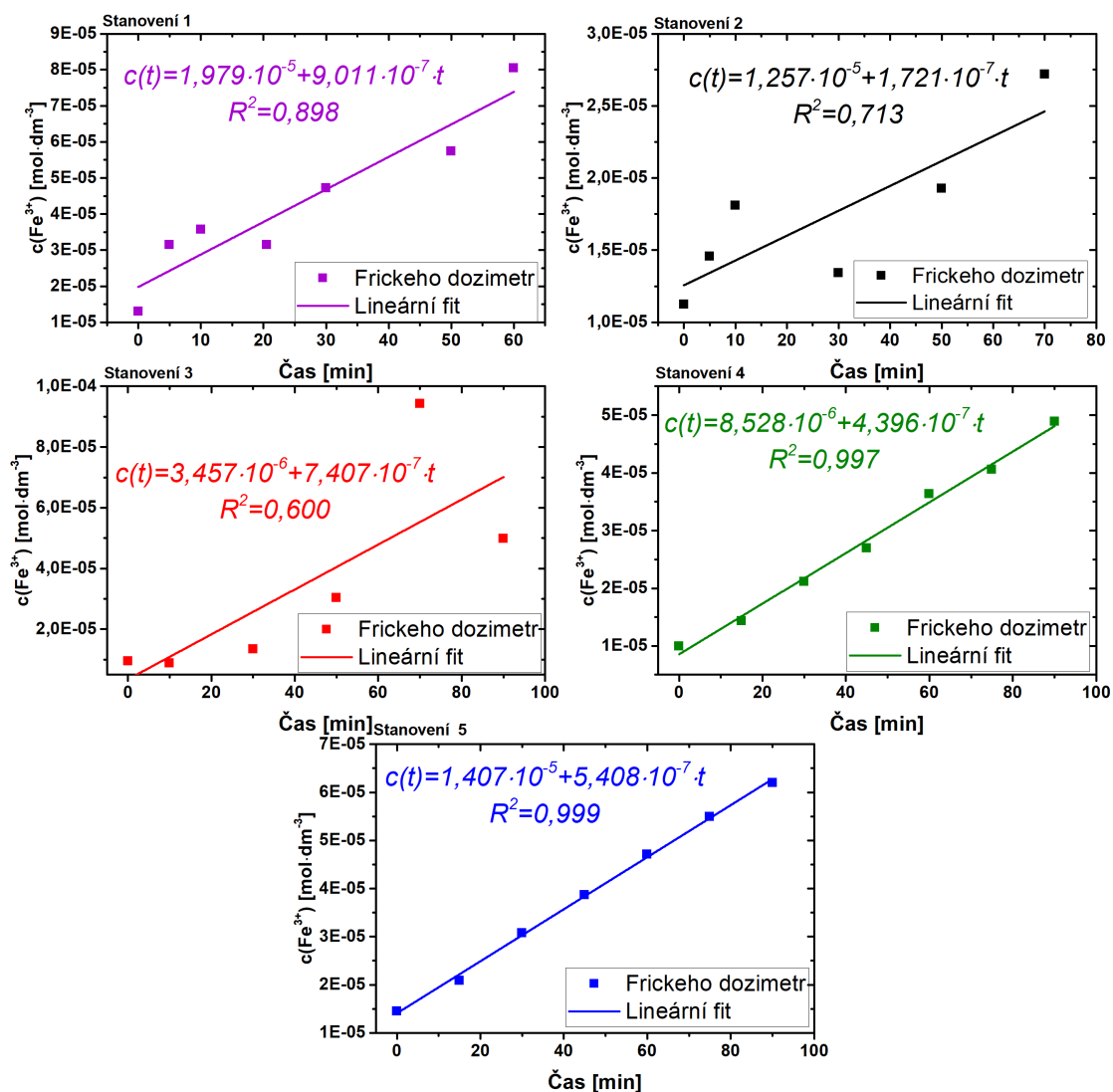
Obr. 4.3: Závislost koncentrace komplexu $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ na době ozařování

Pro přesnější určení toku fotonů bylo nutné určit podíl světla absorbovaného vzorkem, protože je známo, že v této spektrální oblasti aktinometr absorbuje jen malou část dopadajících fotonů. Absorbance při 546 nm neozařeného vzorku ferrioxalátového aktinometru byla pomocí vztahu 4.1 převedena na transmitanci, která byla $T = 0,7547$. Z definice transmitance plyne, že pouze 24,53 % světla produkovaného lampou je absorbováno vzorky aktinometru. Po přepočtu pomocí podílu absorbovaného světla byl tok fotonů určen jako $1,43 \cdot 10^{16}$ fot/s, což je hodnota 14-krát vyšší, než hodnota toku fotonů určená pro 254 nm.

$$A = -\log T \quad (4.1)$$

4.1.2 Stanovení dávkového příkonu RTG zdroje

Proces stanovení dávkového příkonu rentgenové trubice pomocí Frickeho dozimetru byl opakován celkem 5-krát. Konstanty pro toto stanovení byly převzaty z Čuba et al. (2018). Koncentrace vznikajících Fe^{3+} iontů byla počítána pomocí naměřených hodnot absorbance a molárního extinkčního koeficientu $\epsilon(\text{Fe}^{3+})^{303\text{nm}} = 2164 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Závislost koncentrace Fe^{3+} iontů na délce ozařování, pro jednotlivá stanovení, prezentuje obrázek 4.4.



Obr. 4.4: Závislost koncentrace Fe^{3+} iontů ve Frickeho dozimetru na délce ozařování pro jednotlivá stanovení

Tab. 4.1: Vypočtené hodnoty dávkových příkonů pro jednotlivá stanovení

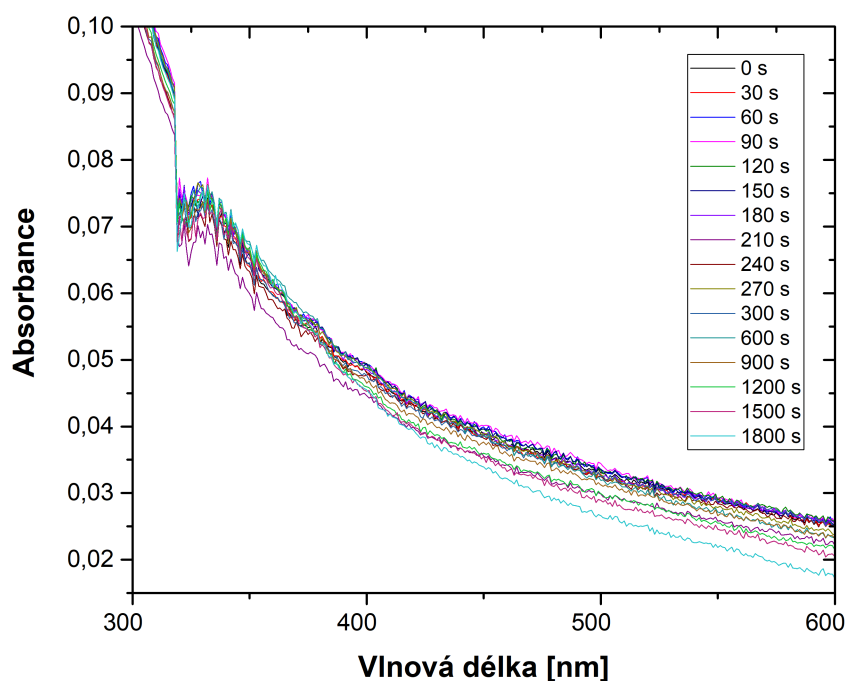
č. stanovení	D [Gy/h]
1.	32,6
2.	6,2
3.	26,8
4.	15,9
5.	19,6

Hodnota dávkového příkonu byla počítána pomocí směrnice časové závislosti vzniku Fe^{3+} iontů, hustoty Frickeho dozimetru ($\rho = 1,024 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a radičně che-

mického výtěžku ($G(\text{Fe}^{3+}) = 1,62 \mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}$). Získané hodnoty dávkových příkonů pro jednotlivá stanovení jsou uvedeny v tabulce 4.1. Z těchto výsledků je zřejmé, že rentgenová trubice, nebo zdroj vysokého napětí nepracují zcela spolehlivě a je třeba zkontrolovat jejich funkčnost. Z naměřených dat lze tedy říci, že dávkový příkon rentgenové trubice spadá do intervalu 6,2 Gy/h – 32,6 Gy/h.

4.2 Experimenty s RB a jodidovou absorpční sondou

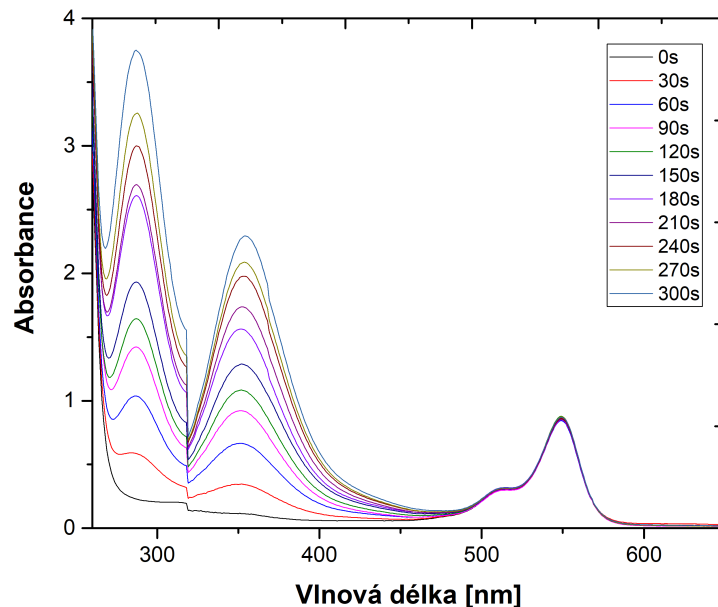
Ozařování samotného roztoku jodidové absorpční sondy bylo provedeno pro popsání chování sondy bez přítomnosti fotosenzibilizátoru. Výřez absorpčního spektra pro různé doby ozařování uvádí obrázek 4.5. Z absorpčního spektra je zřetelná absence nárůstu absorbance při 351 nm. Nárůst při 351 nm je připisován tvorbě trijodidových aniontů v důsledku reakcí sondy s reaktivními formami kyslíku.



Obr. 4.5: Absorpční spektrum jodidové absorpční sondy pro různé doby ozařování. Skok při 320 nm je způsoben změnou lampy ve spektrofotometru Cary 100

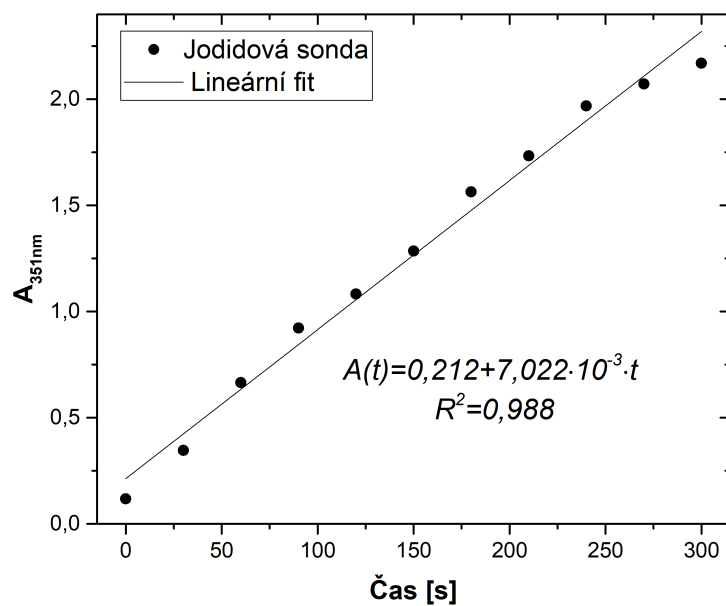
Obrázek 4.6 znázorňuje absorpční spektra roztoku jodidové absorpční sondy s RB jako fotosenzibilizátorem pro různé časy ozařování. Každé spektrum bylo měřeno pro nový vzorek, protože v literatuře je tato sonda popisována jako velmi cit-

livá a měřením absorpčních spekter mohlo docházet k dalšímu ozařování. Na rozdíl od roztoku obsahujícího pouze jodidovou sondu je zde již pozorovatelný výrazný nárůst maxim při 287 nm a 351 nm.



Obr. 4.6: Absorpční spektrum vzorků ozařovaných 0 – 300 s Xe lampou při 549 nm

Jak je vidět z obrázku 4.7, absorbance sondy sledovaná v maximu při 351 nm, je lineárně závislá na době ozařování. Každý z bodů reprezentuje jeden vzorek, je tedy pravděpodobné, že odchylky od lineárního průběhu jsou způsobeny buď mírnými rozdíly ve složení roztoků, které mohly být způsobeny nepřesným pipetováním, nebo nepřesnou manipulací se vzorky a jejím větším či menším ozářením běžným osvětlením. Při použití nového vzorku pro každou délku ozařování nebyly pozorovány poklesy absorpčního maxima RB při 549 nm.

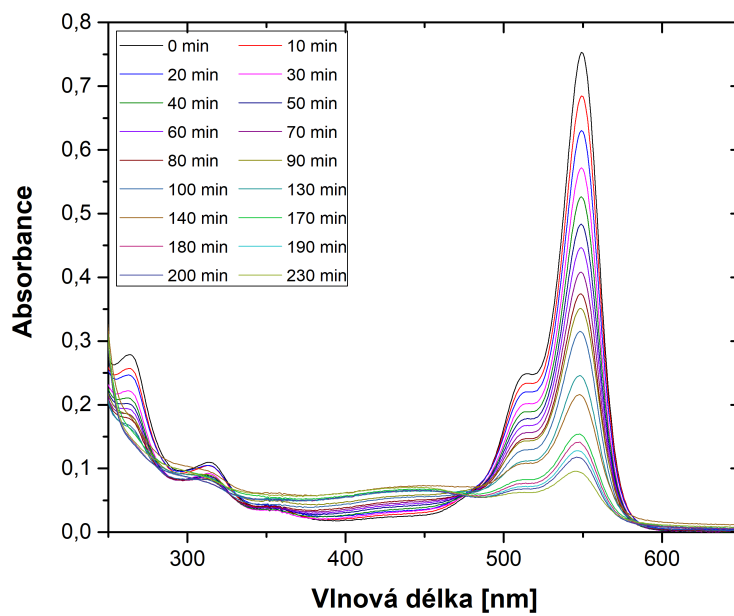


Obr. 4.7: Závislost absorbance při 351 nm ozařovaného roztoku na délce ozařování

Dle naměřených dat se zdá, že jodidová sonda je velmi citlivá a i pro krátké časy ozařování dochází k měřitelným změnám. Z porovnání grafů 4.5 a 4.6 vyplývá, že produkce I^{3-} je způsobena tvorbou ROS působením RB a nikoliv působením samotného světla. Bohužel RB v přítomnosti kyslíku neprodukuje pouze singletový kyslík, ale také superoxid O_2^- , jak uvádí Srinivasan et al. (1978). Proto nemůžeme z tvorby trijodidového aniontu přímo určit množství produkovaného singletového kyslíku, ale bylo by třeba provést více experimentů například se specifickým zhášecem singletového kyslíku či superoxidu.

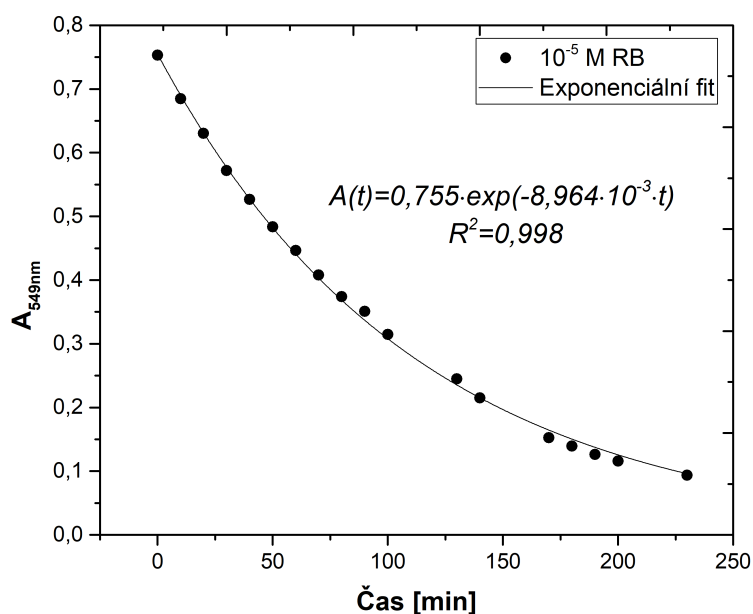
4.3 Experimenty s RB a absorpční sondou ABDA

4.3.1 Absorbance roztoku RB a roztoku ABDA po ozáření



Obr. 4.8: Absorpční spektrum roztoku 10^{-5} M RB ozařovaného 0 až 230 minut Xe lampou při 549 nm

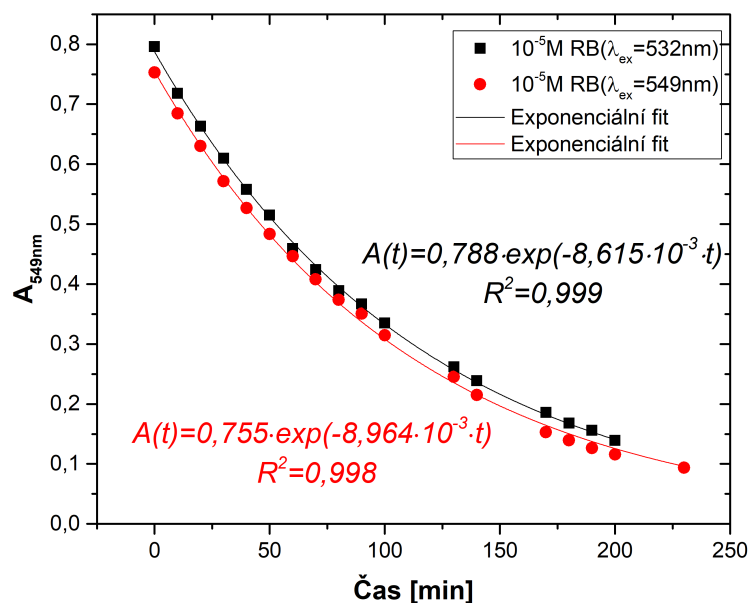
Obrázek 4.8 znázorňuje změny absorpčního spektra RB při ozařování vlnovou délkou 549 nm. Absorbance nabývá maximální hodnoty při 549 nm, poklesy absorbance v tomto maximu detailněji prezentuje obrázek 4.9. Z grafu je zřejmé, že fotodegradace 10^{-5} M RB se řídí rychlostní rovnicí prvního řádu s rychlostní konstantou $k = 8,964 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.



Obr. 4.9: Závislost absorbance při 549 nm ozařovaného roztoku 10^{-5} M RB na délce ozařování

Ozařování roztoku RB bylo provedeno rovněž při 532 nm, což je vlnová délka při které prováděli ozařování autoři článku Entradas et al. (2020). Autoři tohoto článku rovněž uvádí, že kvantový výtěžek není závislý na použité excitační vlnové délce a současně při jejich experimentech nepozorovali pokles v maximu absorbance RB.

Protože došlo k poruše spektrofotometru Cary 100, byla pro vzorky ozařované při 532 nm měřena pouze absorbance při 549 nm, tedy v absorpčním maximu RB. Obrázek 4.10 prezentuje srovnání závislosti absorbance při 549 nm na čase vzorku ozařovaného při vlnové délce 532 nm a 549 nm. Jak je zřetelné z proložení, rychlostní konstanta rozkladu RB ozařované při 532 nm ($k = 8,615 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) se příliš neliší od rychlostní konstanty rozkladu RB ozařované vlnovou délkou 549 nm ($k = 8,964 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

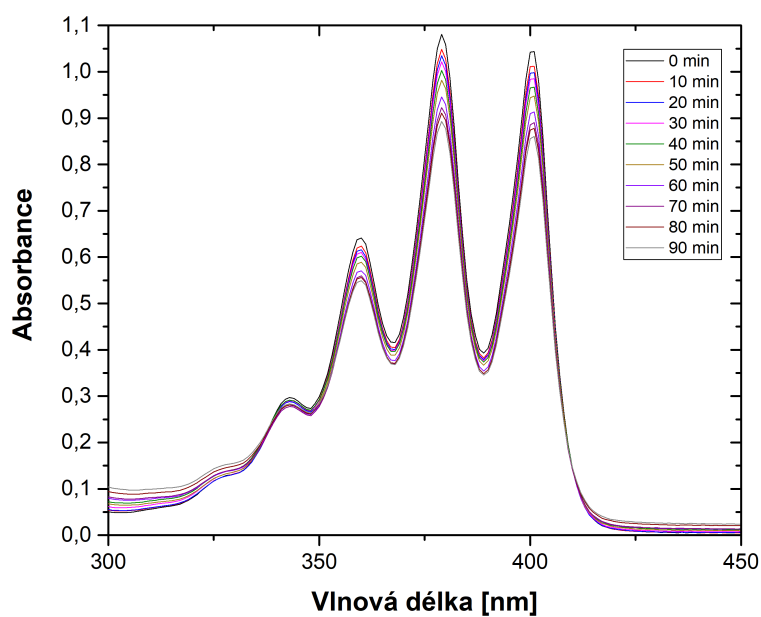


Obr. 4.10: Závislost absorbance na délce ozařování roztoku 10^{-5} M RB pro použité excitační vlnové délky 532 nm a 549 nm.

Pozorovaný pokles absorbance, který naznačuje fotodegradaci RB s kinetikou prvního řádu, potvrzuje práce Wilson and Heitz (1984), která se podrobně zabývá fotodegradací RB v závislosti na koncentraci RB, koncentraci rozpuštěného kyslíku a intenzitě použitého zdroje záření.

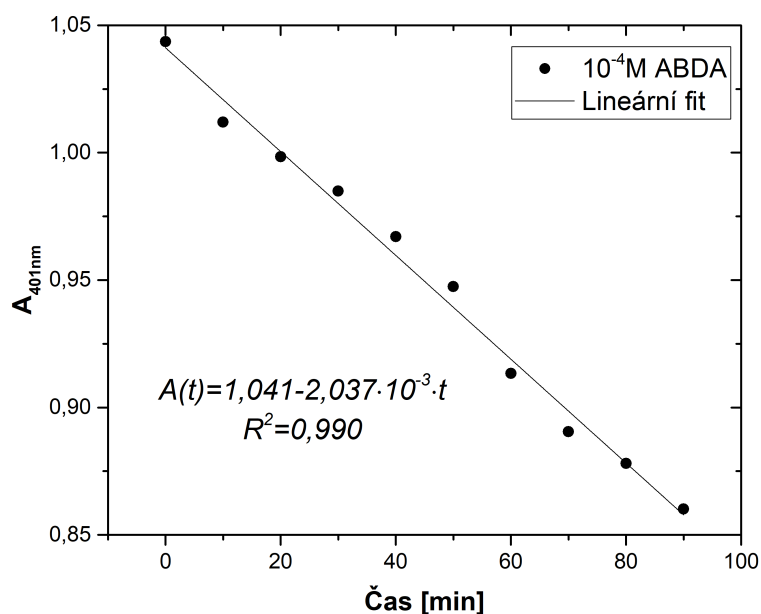
Konkrétně práce uvádí, že je-li koncentrace RB ($c \leq 1 \cdot 10^{-5}$ M) nižší v porovnání s koncentrací kyslíku v roztoku, dochází k fotodegradaci barviva vlivem útoku singletového kyslíku na molekulu tohoto barviva v tripletovém stavu. V takovémto případě se fotodegradace RB řídí kinetikou prvního řádu. Je-li koncentrace RB srovnatelná nebo větší než koncentrace kyslíku v roztoku, fotodegradace se již neřídí kinetikou prvního řádu. V takovémto případě dochází k interakci molekuly RB v tripletovém stavu s molekulou RB v základním stavu. Autoři rovněž dospěli k závěru, že rychlost fotodegradace RB je přímo úměrná intenzitě dopadajícího záření.

Zároveň je však třeba podotknout, že vzhledem k nastavené hodnotě parametru bandpass na 29 nm se částečně překrývala spektra záření použitého pro ozařování.



Obr. 4.11: Absorpční spektrum roztoku 10^{-4} M ABDA ozařovaného xenonovou lampou při 549 nm

Vliv ozařování na 10^{-4} M roztok sondy ABDA prezentují absorpční spektra na obrázku 4.11. Absorpční maxima sondy byla naměřena při 401 nm, 379 nm, s nižším píkem při 359 nm. Jak je zřejmé z obrázku 4.11 a obrázku 4.12, který detailněji znázorňuje pokles absorbance v závislosti na délce ozařování při 401 nm, pokles absorbance a tedy rozklad sondy není příliš výrazný. Jak je vidět z proložení dat na obrázku 4.12, absorbance vzorku klesá lineárně, tedy dle rychlostní rovnice nultého řádu s rychlostní konstantou $k = 2,037 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

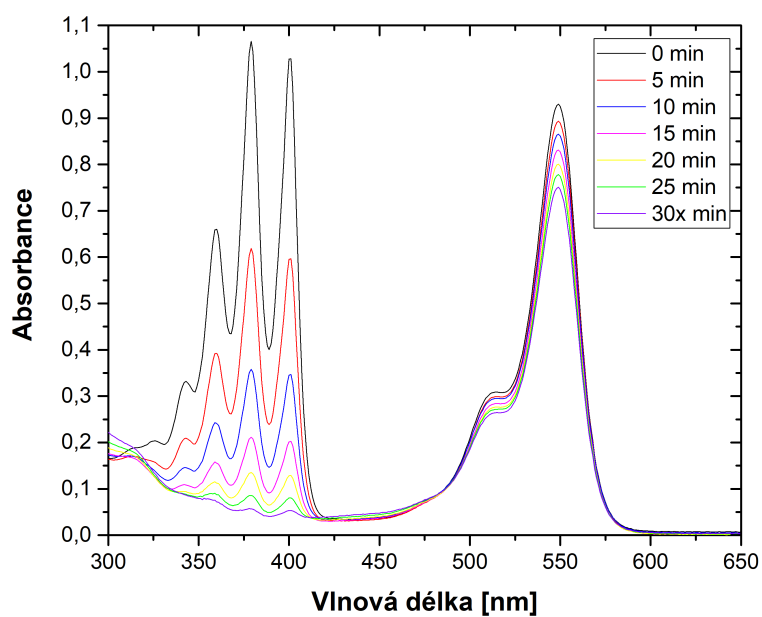


Obr. 4.12: Závislost absorbance při 401 nm ozařovaného roztoku 10^{-4} M ABDA na délce ozařování

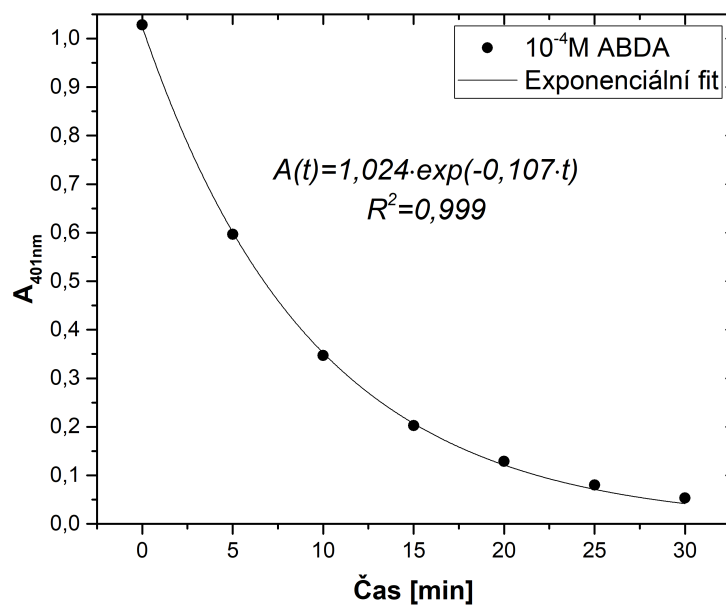
4.3.2 Absorbance sondy ABDA v závislosti na koncentraci RB

Obrázek 4.13 prezentuje absorpční spektra 10^{-5} M roztoku RB s 10^{-4} M sondou ABDA v závislosti na délce ozařování. Pro poslední měření není známý přesný čas ozařování, vzhledem k tomu, že nedošlo ke skončení měření spektrofotometru po uběhnutí nastaveného času.

Z absorpčních spekter je zřetelný pokles absorbance ve všech třech maximech sondy ABDA, při 359 nm, 379 nm a 401 nm. S ohledem na vlastnosti sondy popsané v literatuře (Entradas et al., 2020), lze tento pokles přičíst reakci sondy se singletovým kyslíkem, avšak je nutno podotknout, že pokles absorbance sondy nemusí vypovídat o veškerém vygenerovaném singletovém kyslíku. Singletový kyslík může být zhašen vodou, která byla při experimentech použita jako rozpouštědlo. Oproti výsledkům prezentovaným v článku Entradas et al. (2020) probíhá rozklad sondy značně rychleji a zároveň dochází k odbarvování RB. K tomuto je nutno podotknout, že tok fotonů určený pomocí ferrioxalátového aktinometru byl 2-krát, nebo 32-krát vyšší než tok fotonů vypočtený pro zdroj záření s výkonem 2,4 mW, nebo 0,14 mW, použitý autory článku. Vyšší intenzita použitého zdroje má přímý vliv na vyšší produkci singletového kyslíku a dalších ROS.



Obr. 4.13: Absorpční spektrum roztoku 10^{-5} M RB a 10^{-4} M ABDA ozařovaného Xe lampou při 549 nm

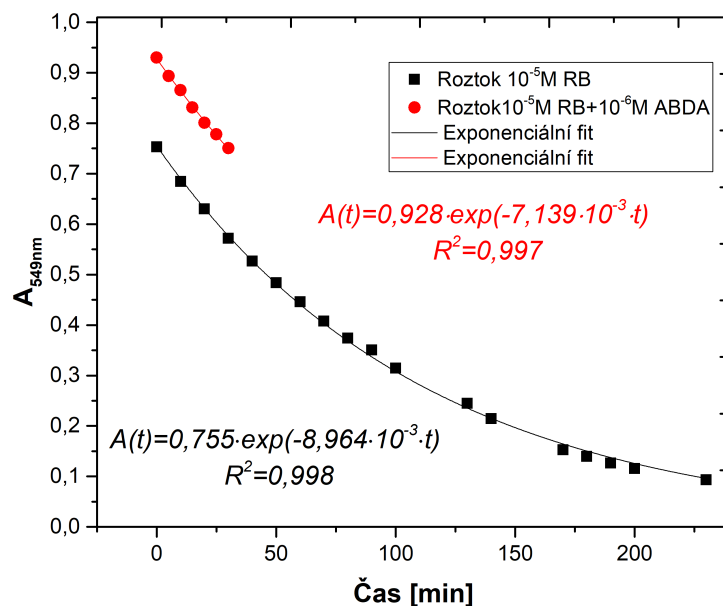


Obr. 4.14: Závislost absorbance při 401 nm ozařovaného roztoku 10^{-5} M RB a 10^{-4} M ABDA na délce ozařování

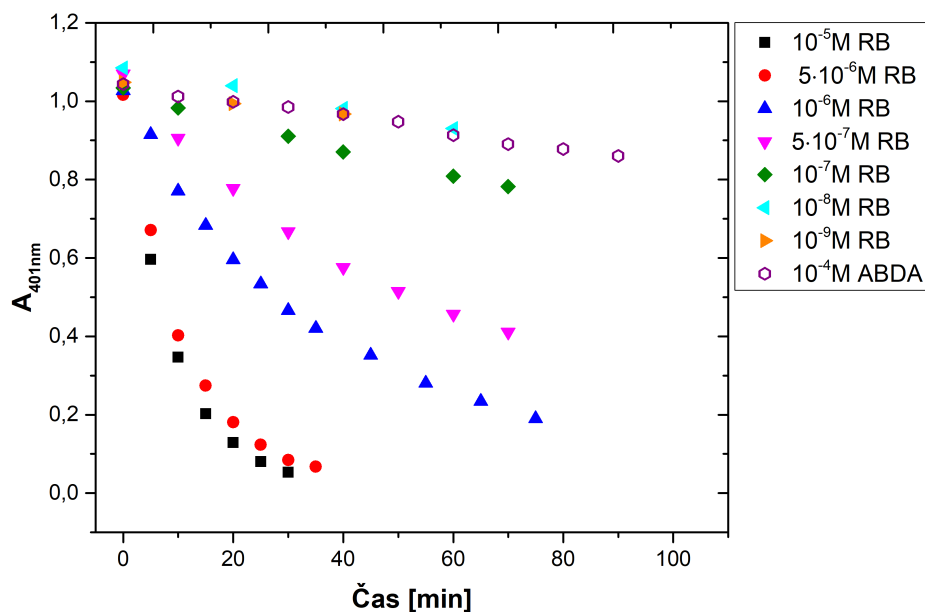
Z obrázku 4.14 je zřetelné, že absorbance sondy ABDA klesá s exponenciální

závislostí, reakce se tedy řídí rychlostní rovnicí prvního řádu s rychlostní konstantou $k = 0,107 \text{ s}^{-1}$.

Obrázek 4.15 zvyrazňuje zjištění, že maximální absorbance při 549 nm, tedy odpovídající maximu RB, je vyšší než absorbance roztoku obsahujícího pouze RB o stejné koncentraci. Je tedy pravděpodobné, že dochází k interakci mezi RB a sondou ABDA, vedoucí k vzrůstu absorbance při 549 nm.

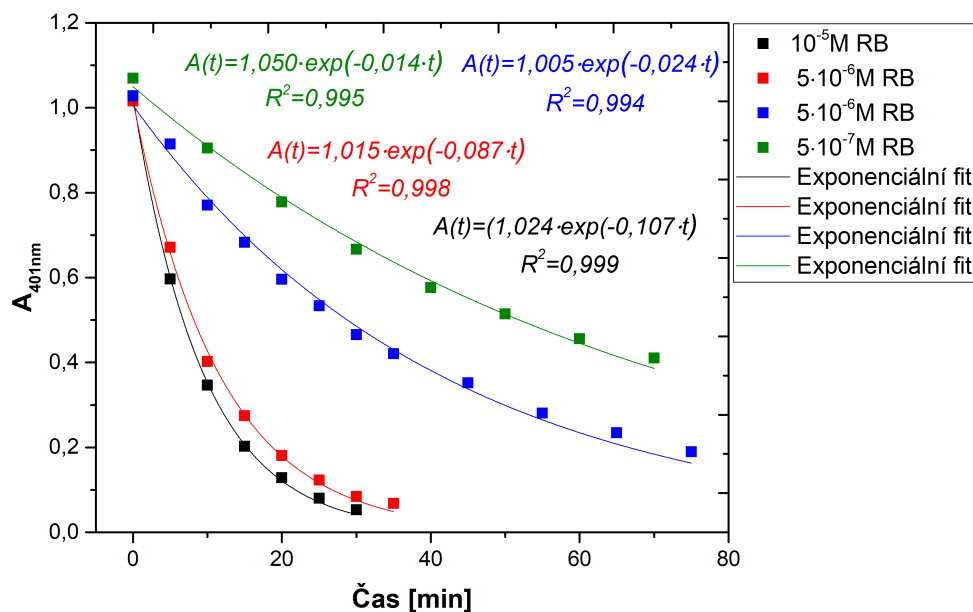


Obr. 4.15: Závislost absorbance při 549 nm roztoku 10^{-5} M RB a roztoku 10^{-5} M RB spolu se 10^{-6} M sondou ABDA na délce ozařování

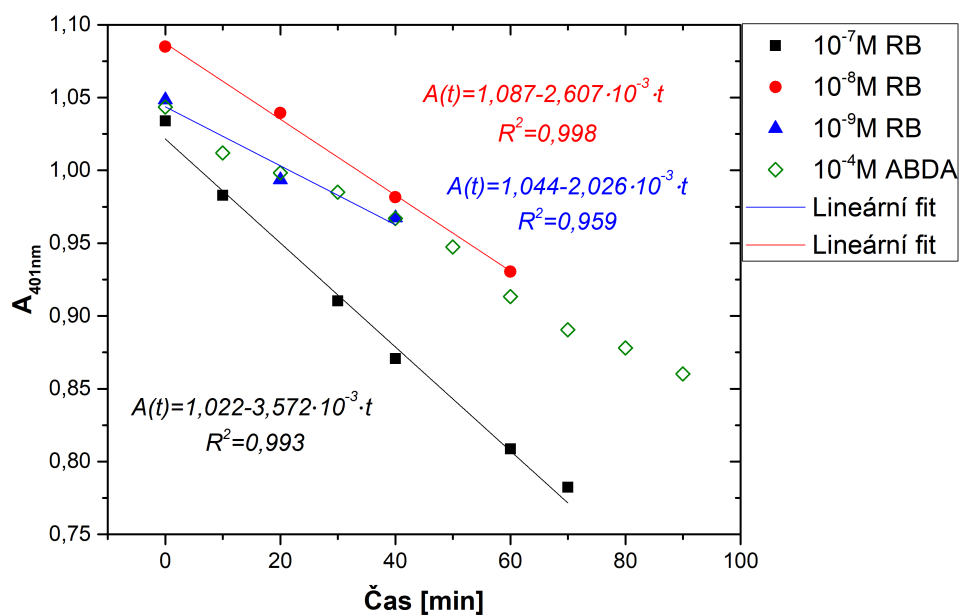


Obr. 4.16: Závislost absorpance při 401 nm roztoků 10^{-5} M- 10^{-9} M RB a 10^{-4} M sondy ABDA na délce ozáření

Postupným snižováním koncentrace RB při zachování stejné koncentrace sondy ABDA byly získány závislosti poklesu absorpance sondy na čase uvedené na obrázku 4.16. Obrázky 4.17a a 4.17b pak uvádějí detailnější pohled na jednotlivé závislosti. Obrázek 4.17a ukazuje závislosti pro vyšší koncentraci RB (nejnižší $5 \cdot 10^{-7}$ M RB), pokles absorpance sondy ABDA probíhá s kinetikou prvního řádu. Obrázek 4.17b ukazuje tutéž závislost pro nízké koncentrace RB. Z těchto grafů je zřejmé, že nejnižší koncentrace RB, u které je zřetelná odezva sondy ABDA na singletový kyslík, je 10^{-7} M. Při této koncentraci, v měřeném časovém úseku, klesá absorpance sondy lineárně, lze tedy aproximovat naměřená data rychlostní rovnicí nultého řádu s rychlostní konstantou $3,572 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Při nižších koncentracích fotosenzibilizátoru již absorpance sondy klesá stejně jako ve vzorku, který obsahoval pouze sondu ve stejné koncentraci, jak je vidět při srovnání rychlostních konstant na obrázcích 4.12 a 4.17b.



(a) Závislost absorpance při 401nm roztoků 10⁻⁵ M – 5·10⁻⁷ M RB spolu s 10⁻⁴ M sondou ABDA na délce ozařování

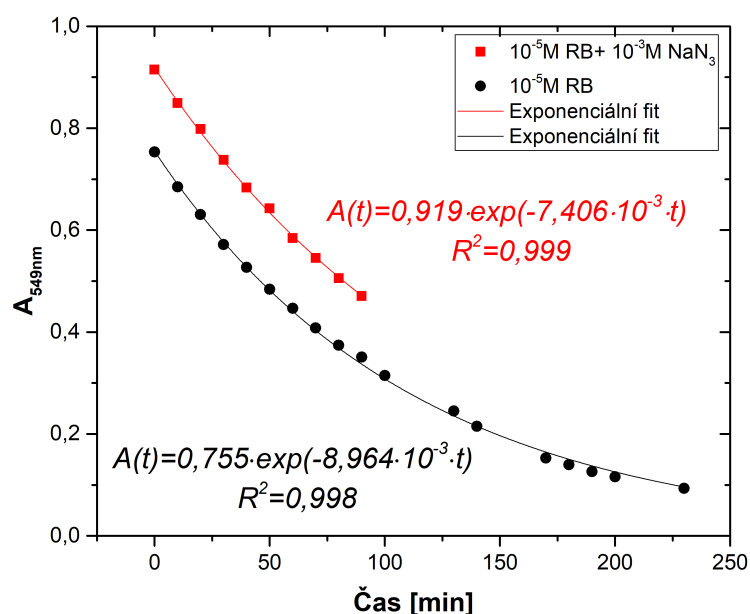


(b) Závislost absorpance při 401nm roztoků 10⁻⁷ M – 10⁻⁹ M RB spolu s 10⁻⁴ M sondou ABDA na délce ozařování

Obr. 4.17: Závislosti absorpance při 401nm roztoků 10⁻⁵ M – 5·10⁻⁷ M RB spolu s 10⁻⁴ M sondou ABDA, ozařovaných při 549 nm, na čase

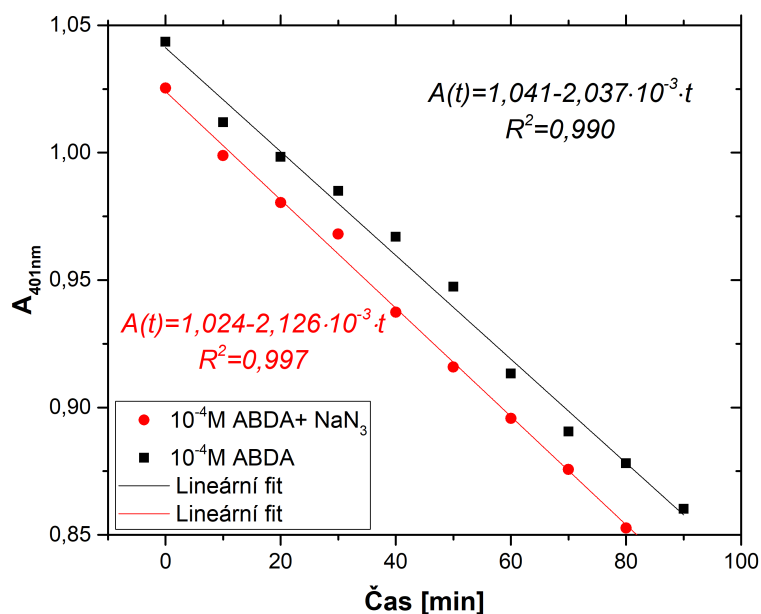
4.3.3 Absorbance roztoků RB a sondy ABDA po přidání NaN_3

Experimenty s azidem sodným, známým zhašečem singletového kyslíku, byly provedeny s úmyslem ověřit tvrzení o specifitě sondy ABDA pro singletový kyslík. Obrázek 4.18 znázorňuje vliv přídavku NaN_3 k roztoku RB na rychlost degradace fotosenzibilizátoru. Pokles absorbance vzorku s NaN_3 se rovněž řídí rychlostní rovnicí prvního řádu, s rychlostní konstantou $k = 7,406 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, což je hodnota o 17% nižší, než rychlostní konstanta poklesu absorbance vzorku RB neobsahujícího NaN_3 . Zdá se tedy, že fotodegradace RB není způsobena pouze singletovým kyslíkem vznikajícím při ozáření fotosenzibilizátoru, a mechanismus fotodegradace RB je komplexnější.



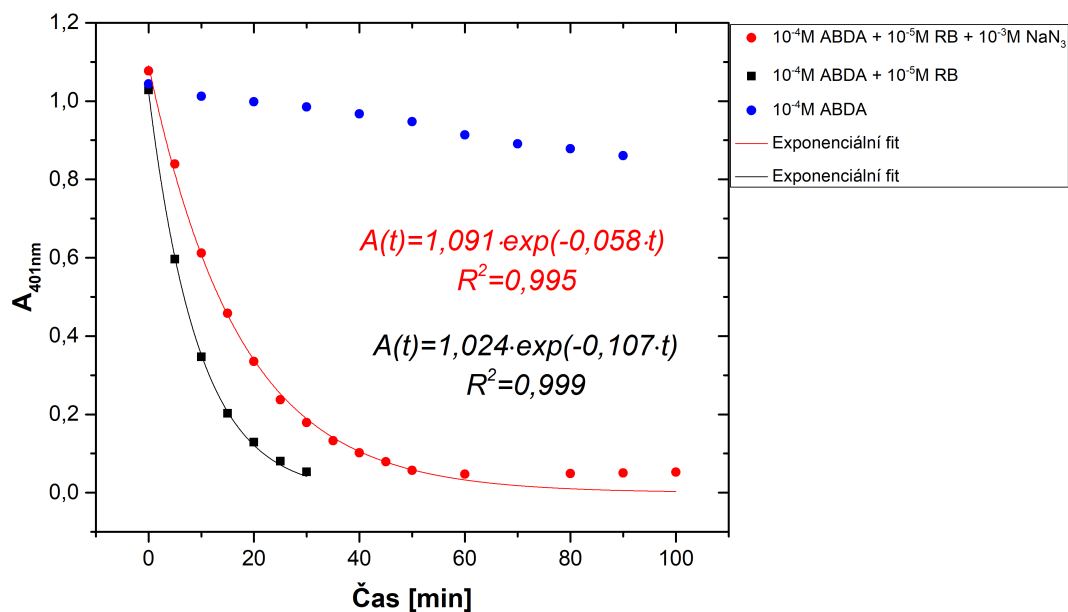
Obr. 4.18: Srovnání závislostí absorbance při 549 nm roztoků 10^{-5} M RB a 10^{-5} M RB a 10^{-3} M NaN_3 na délce ozáření

Obrázek 4.19 prezentuje vliv NaN_3 na pokles absorbance vzorku samotné sondy ABDA. Jak je z obrázku zřetelné, přídavkem NaN_3 nedochází k výrazné změně rychlosti poklesu absorbance sondy. Tento poznatek nasvědčuje tomu, že přidání NaN_3 neovlivňuje detekční schopnosti sondy ABDA.



Obr. 4.19: Srovnání závislostí absorbance při 401 nm roztoků 10^{-4} M ABDA a 10^{-4} M ABDA a 10^{-3} M NaN_3 na délce ozařování

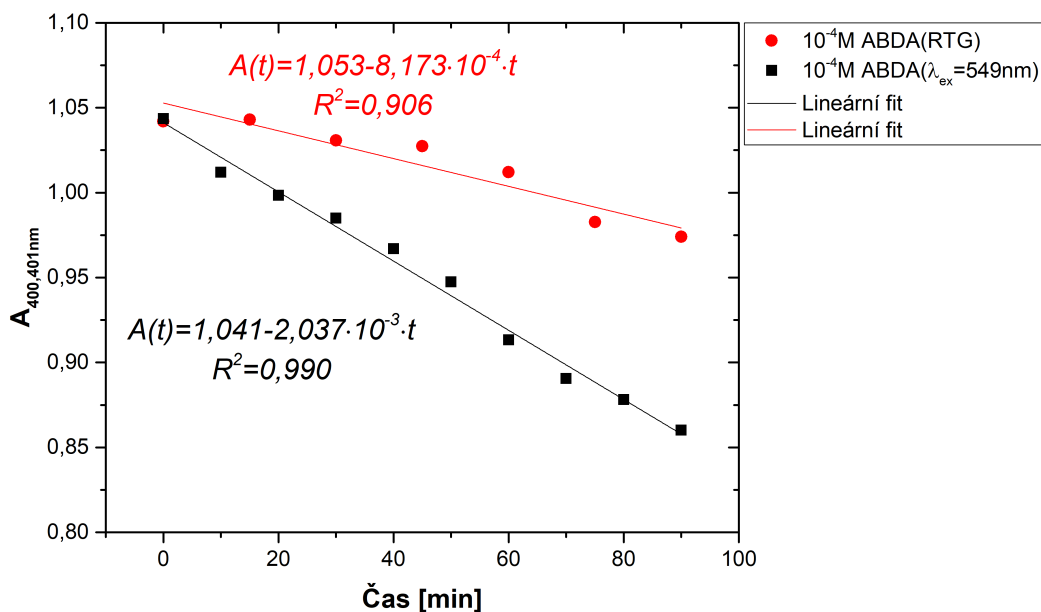
Průběh poklesu absorbance vzorku obsahujícího RB, sondu ABDA a NaN_3 znázorňuje obrázek 4.20. Pokles absorbance sondy je pomalejší, než v případě vzorku bez NaN_3 . Proložení exponenciální křivkou byla určena rychlostní konstanta $k = 0,058 \text{ s}^{-1}$, což je hodnota o 46% nižší než rychlostní konstanta určená pro vzorek bez NaN_3 . Z průběhu časové závislosti vyplývá, že přidavek NaN_3 zhaší produkci singletového kyslíku pouze částečně. Pro přesné vysvětlení jevu by bylo třeba provést více experimentů. Důvodů, proč nedochází k úplnému zhašení reakce sondy, může být více: nízká koncentrace NaN_3 v porovnání se vznikajícím singletovým kyslíkem, reakce ABDA s dalšími ROS nebo jiná komplexnější interakce NaN_3 s ostatními složkami systému.



Obr. 4.20: 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 NaN_3 a 10^{-4} M ABDA na délce ozařování

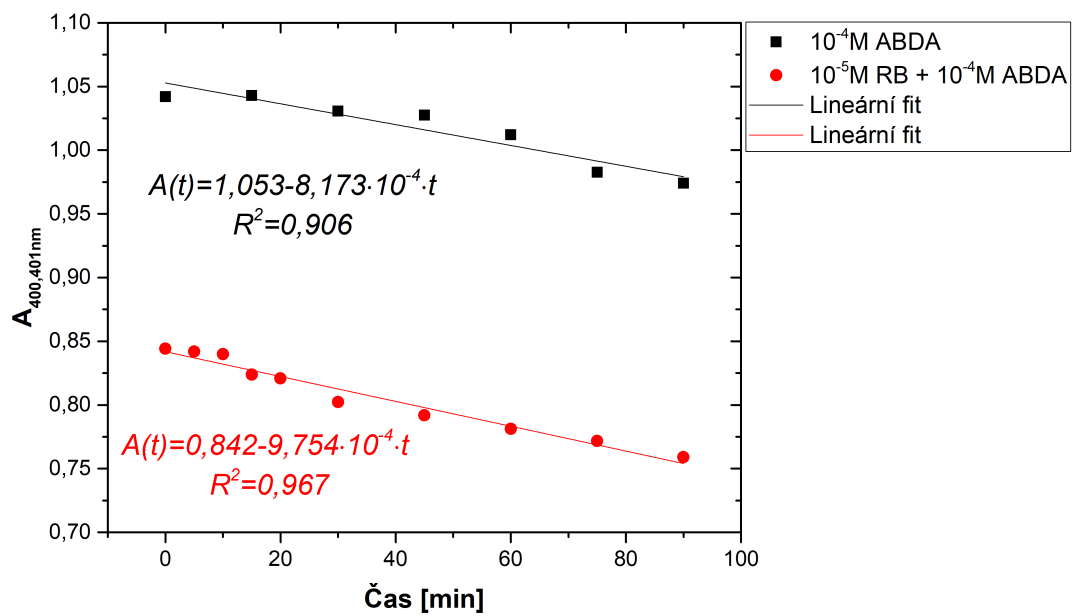
4.3.4 Absorbance roztoků RB a sondy ABDA po ozařování RTG

Obrázek 4.21 uvádí srovnání poklesu absorbance roztoku sondy ABDA ozařované světlem o vlnové délce 549 nm a RTG zářením. Absorpční maximum zvolené pro srovnání bylo naměřeno při 400 nm v případě vzorku ozařovaného RTG a při 401 nm u vzorku ozařovaného viditelným světlem. Na základě rychlostních konstant poklesu absorbance je zřejmé, že rozklad sondy ABDA při ozařování viditelným světlem probíhá řádově rychleji ($k = 2,037 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), než rozklad sondy při ozařování rentgenovým zářením ($k = 8,173 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Z tohoto faktu vyplývá, že rentgenové záření neakceleruje rozklad sondy ABDA, naopak sonda se rozkládá v mnohem menším rozsahu, než při ozařování viditelným světlem.



Obr. 4.21: Srovnání závislostí absorbance při 401 nm vzorku 10^{-4} M ABDA ozařovaného při 549 nm a absorbance při 401 nm vzorku 10^{-4} M ABDA ozařovaného RTG na čase

Obrázek 4.22 uvádí srovnání poklesu absorbance sondy ABDA v roztoku s RB a v roztoku bez RB ozařovaných RTG. Rozdíl mezi počátečními hodnotami absorbancí je nutno přičíst použití rozdílných spektrofotometrů pro získání obou sad dat. Směrnice přímky ($k = 9,754 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), a tedy rychlostní konstanta rozkladu sondy v přítomnosti RB je mírně vyšší, než směrnice přímky ($k = 8,173 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) aproximující data pro roztok pouze sondy ABDA, avšak velikost tohoto rozdílu, s přihlédnutím na rozdíly v rychlostech degradace sondy při ozařování viditelným světlem, neindikuje, že by docházelo k reakci mezi sondou ABDA a singletovým kyslíkem. Toto zjištění tedy napovídá, že fotosenzibilizátor RB není schopný produkce singletového kyslíku při ozáření rentgenovým zářením s dávkovým příkonem v intervalu 6,2 – 32,6 Gy/h.



Obr. 4.22: Srovn\u00e1n\u00ed z\u00e1vislost\u00ed absorbance p\u0159i 400 nm vzorku 10^{-4} M ABDA a absorbance p\u0159i 401 nm vzorku $10^{-5}\text{ M RB} + 10^{-4}\text{ M ABDA}$ oza\u0159ovan\u00fdch RTG na \u010case

5 Závěr

Cílem teoretické části této práce bylo vypracování rešerše o singletovém kyslíku $^1\text{O}_2$, konkrétně o možnostech jeho detekce. Ve stručnosti byly popsány fyzikální, neboli přímé, metody detekce, jejichž výsledky jsou přesné, avšak stanovení je instrumentálně náročné. Dále byly popsány dva typy chemických, tedy nepřímých, metod detekce $^1\text{O}_2$, konkrétně absorpční a chemiluminiscenční sondy. Ukázalo se, že použití absorpčních sond je velmi snadné a instrumentálně nenáročné, avšak je nutné věnovat pozornost vlastnostem těchto sond. Nevýhodou řady chemických sond je jejich nespecifická reakce se $^1\text{O}_2$, nicméně tento problém je řešitelný využitím zhášeců $^1\text{O}_2$ nebo ostatních reaktivních forem kyslíku.

Kromě metod detekce byla popsána problematika produkce singletového kyslíku fotosenzibilizačními reakcemi a možnosti jeho využití s důrazem na fotodynamickou terapii a rentgenem buzenou fotodynamickou terapii.

Experimentální část byla zaměřena na studium fotosenzibilizátoru bengálské červeně RB, jodidové absorpční sondy a sondy ABDA. Mimo experimenty se sondami byla provedena charakterizace Xe lampy spektrofluorimetru FluoroMax Plus a rentgenové trubice Siemens. Pro určení toku fotonů Xe lampy byl využit jodid-jodičnanový aktinometr a ferrioxalátový aktinometr. 3 ml roztoku každého aktinometru byly ozařovány v křemenných kyvetách. Tok fotonů byl určen pro dvě vlnové délky – pro 254 nm jako $1,02 \cdot 10^{15}$ fot/s a pro 546 nm jako $1,43 \cdot 10^{16}$ fot/s. Dávkový příkon RTG zdroje byl určován pomocí Frickeho dozimetru. Bylo ozařováno 10 ml dozimetru v plastové ampuli a stanovení bylo provedeno celkem pětkrát. Bohužel se stanovený dávkový příkon pohyboval v intervalu 6,2 – 32,6 Gy/s, což svědčí o nesprávném fungování rentgenové trubice, nebo zdroje vysokého napětí.

Na základě experimentů se samotnou RB bylo zjištěno, že fotosenzibilizátor podléhá fotodegradaci řídicí se rychlostní rovnicí prvního řádu. Dále bylo zjištěno, že rychlostní konstanta této fotodegradace se příliš nemění, ozařujeme-li vzorek při 549 nm, nebo 532 nm.

Při ozařování vodného roztoku samotné jodidové sondy nebyly sledovány výrazné změny absorbance. Naopak při ozařování roztoku sondy s fotosenzibilizátorem RB, který mimo singletový kyslík produkuje také superoxidový anion, byly sledovány výrazné změny. Bylo potvrzeno, že jodidová absorpční sonda je velmi citlivá – pro pozorování výrazného nárůstu absorbance stačily kratší ozařovací časy v porov-

nání se sondou ABDA.

Při ozařování vodného roztoku samotné sondy ABDA bylo zjištěno, že sonda ABDA při ozáření podléhá degradaci, která se řídí rychlostní rovnicí nultého řádu. Reakce sondy s ROS probíhá s kinetikou prvního řádu. Experimenty s postupně se snižující koncentrací fotosenzibilizátoru RB ukázaly limitní koncentraci tohoto fotosenzibilizátoru pro detekci $^1\text{O}_2$ ve studovaném systému obsahujícím 10^{-4} M sondu ABDA. Limitní koncentrace RB byla určena jako 10^{-7} M.

Roztok RB a sondy ABDA byl rovněž studován s přidavkem zhášeče $^1\text{O}_2$ azidem sodným. Přídavek zhášeče zhasil vliv ROS pouze částečně. Proto je pro vyhodnocení specifity sondy ABDA pro detekci $^1\text{O}_2$ nutné další studium tohoto systému.

Sondy nebyly použity pro detekci singletového kyslíku generovaného UV zářením, vzhledem k tomu, že měřením absorpčních spekter se ukázalo, že jak jodidová absorpční sonda, tak i sonda ABDA silně absorbují v UV oblasti. Byl sledován pouze vliv RTG na sondu ABDA. Ozařování pomocí RTG záření bylo zkomplikováno nespolehlivostí zdroje a nepřesným určením dávkového příkonu. Provedené experimenty nasvědčují tomu, že sonda téměř nepodléhá degradaci působením RTG a mohla by tak být vhodná při detekci singletového kyslíku generovaného pomocí rentgenového záření. Pro potvrzení této hypotézy je však třeba provést další experimenty. Při ozařování vzorku sondy ABDA s fotosenzibilizátorem RB rentgenovým zářením nebyl pozorován výrazný pokles absorbance sondy, zdá se tedy, že RB regeneruje reaktivní formy kyslíku při ozáření RTG. Vzhledem k výsledkům experimentů by bylo vhodné další výzkum věnovat detailněji sondě ABDA, zvláště jejímu možnému použití při detekci singletového kyslíku generovaného rentgenovým zářením.

Literatura

- Allison, R. R., G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. Childs, and C. H. Sibata (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1, 27–42.
- Bilski, P., R. Dabestani, and C. F. Chignell (1991). Influence of cationic surfactant on the photoprocesses of eosine and rose bengal in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry* 95(15), 5784–5791.
- Bregnhøj, M., L. Dichmann, C. K. McLoughlin, M. Westberg, and P. R. Ogilby (2019). Uric Acid: A Less-than-Perfect Probe for Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 95, 202–210.
- Castano, A. P., T. N. Demidova, and M. R. Hamblin (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization.
- Čunderlíková, B. and L. Šikurová (2001). Solvent effects on photophysical properties of merocyanine 540. *Chemical Physics* 263, 415–422.
- DeRosa, Maria C., C. R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* 233-234, 351–371.
- Entradas, T., S. Waldron, and M. Volk (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 204.
- Golombek, S. K., J.-N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, and T. Lammers (2018). Tumor targeting via epr: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* 130, 17 – 38. Perspectives and review articles on nanomedicine from NanoDDS 2017.
- Hatchard, C. G., C. A. Parker, and E. J. Bowen (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.
- Hoebeke, M., J. Pieite, and A. Van De Vorst (1990). Viscosity-dependent isomerization and fluorescence yields of merocyanine 540. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 4(3), 273 – 282.

- Hoebeke, M., A. Seret, J. Piette, and A. Van de Vorst (1988). Singlet oxygen production and photoisomerization: Two competitive processes for merocyanine 540 irradiated with visible light. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 1(4), 437–446.
- Juzeniene, A., Q. Peng, and J. Moan (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6(12), 1234–1245.
- Kazakov, D. V. and F. E. Safarov (2014). A novel chemiluminescence from the reaction of singlet oxygen with β -diketonates of europium(iii), neodymium(iii) and ytterbium(iii). *Photochem. Photobiol. Sci.* 13, 1646–1649.
- Kirakci, K., J. Zelenka, M. Rumlová, J. Martinčík, M. Nikl, T. Ruml, and K. Lang (2018). Octahedral molybdenum clusters as radiosensitizers for X-ray induced photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B* 6, 4301–4307.
- Lang, K., J. Mosinger, and D. M. Wagnerová (2004). Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews* 248(3-4), 321–350.
- Lang, K., J. Mosinger, and D. M. Wagnerová (2005). Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické Listy* 99(4), 211–221.
- Lang, K., J. Mosinger, and D. M. Wagnerová (2006). Singletový kyslík v praxi - Současnost a perspektiva. *Chemické Listy* 100(3), 169–177.
- Larue, L., A. Ben Mihoub, Z. Youssef, L. Colombeau, S. Acherar, J. C. André, P. Arnoux, F. Baros, M. Vermandel, and C. Frochot (2018). Using X-rays in photodynamic therapy: An overview. *Photochemical and Photobiological Sciences* 17(11), 1612–1650.
- Li, B., H. Lin, D. Chen, B. C. Wilson, and Y. Gu (2013). Singlet oxygen detection during photosensitization. *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 6(1), 1–9.
- LOT-Quantum Design GmbH (2018). Light sources & photonic tools.
- Macdonald, I. J. and T. J. Dougherty (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 05(02), 105–129.
- MacManus-Spencer, L. A., D. E. Latch, K. M. Kroncke, and K. McNeill (2005). Stable dioxetane precursors as selective trap-and-trigger chemiluminescent probes for singlet oxygen. *Analytical Chemistry* 77(4), 1200–1205.
- Mosinger, J. and B. Mosinger (1995). Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* 51(2), 106–109.
- Noimark, S., E. Salvadori, R. Gómez-Bombarelli, A. J. MacRobert, I. P. Parkin, and C. W. M. Kay (2016). Comparative study of singlet oxygen production by photosensitizer dyes encapsulated in silicone: towards rational design of anti-microbial surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 28101–28109.

- Pitchaimani, A., A. Renganathan, S. Cinthaikinian, and K. Premkumar (2014). Photochemotherapeutic effects of UV-C on acridine orange in human breast cancer cells: Potential application in anticancer therapy. *RSC Advances* 4(42), 22123–22128.
- Popovich, K., L. Procházková, I. Pelikánová, M. Vlk, M. Palkovský, V. Jarý, M. Nikl, V. Múčka, E. Mihóková, and V. Čuba (2016). Preliminary study on singlet oxygen production using CeF₃:Tb³⁺@SiO₂-PpIX. *Radiation Measurements* 90, 325–328.
- Popovich, K., K. Tomanová, V. Čuba, L. Procházková, I. T. Pelikánová, I. Jakubec, E. Mihóková, and M. Nikl (2018). LuAG:Pr³⁺-porphyrin based nanohybrid system for singlet oxygen production: Toward the next generation of PDTX drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 179, 149–155.
- Procházková, L., I. T. Pelikánová, E. Mihóková, R. Dědic, and V. Čuba (2019, feb). Novel scintillating nanocomposite for X-ray induced photodynamic therapy. *Radiation Measurements* 121, 13–17.
- Rabello, B. R., A. P. Gerola, D. S. Pellosi, A. L. Tessaro, J. L. Aparício, W. Caetano, and N. Hioka (2012, jun). Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 238, 53–62.
- Rauf, M. A., J. P. Graham, S. B. Bukallah, and M. A. Al-Saedi (2009). Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 72(1), 133–137.
- Sachar, M., K. E. Anderson, and X. Ma (2016). Protoporphyrin IX: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 356(2), 267–275.
- Šarkady, J. (2011). Stanovení singletového kyslíku vytvořeného fotosenzitizérem vázaným v silikagelové matici. *Master thesis*.
- Schweitzer, C. and R. Schmidt (2003). Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews* 103(5), 1685–1757.
- Srinivasan, V. S., D. Podolski, N. J. Westrick, and D. C. Neckers (1978). Photochemical Generation of O₂- by Rose Bengal and Ru(bpy)₃²⁺. *Journal of the American Chemical Society* 100(20), 6513–6515.
- Sugioka, K., M. Nakano, S. Kurashige, Y. Akuzawa, and T. Goto (1986). A chemiluminescent probe with a cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one, specific and sensitive for o₂ production in phagocytizing macrophages. *FEBS Letters* 197(1-2), 27–30.
- Sun, W., Z. Zhou, G. Pratz, X. Chen, and H. Chen (2020). Nanoscintillator-mediated x-ray induced photodynamic therapy for deep-seated tumors: From concept to biomedical applications. *Theranostics* 10, 1296–1318.

- Tardivo, J. P., A. Del Giglio, C. S. De Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. De Fátima Turchiello, and M. S. Baptista (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2(3), 175–191.
- Valentine, R. M., S. H. Ibbotson, K. Wood, C. T. A. Brown, and H. Moseley (2013). Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 203–213.
- Wilson, W. W. and J. R. Heitz (1984). Oxygen Consumption during Photobleaching of Aqueous Solutions of Rose Bengal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32(3), 615–617.
- Xu, D. and D. C. Neckers (1987). Aggregation of rose bengal molecules in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 40(2-3), 361–370.
- You, Y. (2018). Chemical tools for the generation and detection of singlet oxygen. *Organic and Biomolecular Chemistry* 16(22), 4044–4060.
- Zhang, X. F. and X. Li (2011, nov). The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence* 131(11), 2263–2266.
- Čuba, V., J. Bárta, and L. Procházková (2018). *Praktikum z radiální chemie a fotochemie*. V Praze: České vysoké učení technické.