

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

DETEKCIA SINGLETOVÉHO KYSLÍKA PO FOTOEXCITÁCIÍ
HYPERICÍNU V DMSO

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

**DETEKCIA SINGLETOVÉHO KYSLÍKA PO
FOTOEXCITÁCII HYPERICÍNU V DMSO**

Študentská vedecká odborná činnosť

Študijný program:

Biofyzika

Pracovisko :

Katedra biofyziky/Ústav fyzikálnych vied

Vedúci práce:

Mgr. Gregor Bánó, PhD.

Košice 2016

Bc. Katarína Želonková

Čestné prehlásenie:

Vyhlasujem, že som celú túto prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej odbornej literatúry a pod odborným dohľadom školiteľa.

Košice, 20.4.2016

podpis

Abstrakt v štátnom jazyku

Produkcia singletového kyslíka ($O_2 ({}^1\Delta_g)$) v DMSO bola študovaná prostredníctvom časovo rozlíšených meraní jeho fosforescencie. Singletový kyslík bol produkovaný prenosom energie z fotoexcitovaného Hypericínu na molekulárny kyslík v základnom stave. Hyp bol vybudený metódou kvazi-kontinuálnej excitácie. Nameraná doba života singletového kyslíka je $\tau_\Delta = 5,5 \pm 0,3 \mu s$. Tento výsledok pomohol vyriešiť rozpor medzi výsledkami rôznych publikácií, ktoré sa zaoberali meraním doby života singletového kyslíka v DMSO. Kvantový výtťažok produkcie singletového kyslíka Hypericínom v DMSO je $\Phi_\Delta = 0,4 \pm 0,03$. Rýchlostná konštanta deaktivácie tripletového stavu Hyp molekulovým kyslíkom v základnom stave má hodnotu $k_q = 1,6 \pm 0,3 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$.

Abstrakt v cudzom jazyku

Singlet oxygen ($O_2 ({}^1\Delta_g)$) production was studied via time-resolved phosphorescence measurements following pulsed photo-activation of Hyp dissolved in DMSO. Singlet oxygen was produced by energy transfer between photoactivated Hyp and molecular oxygen in ground state. Hyp was excited in quasi-continuous mode. The measured lifetime of singlet oxygen is $\tau_\Delta = 5,5 \pm 0,3 \mu s$. This result helps to solve the conflict existing in the literature concerning lifetime of singlet oxygen in DMSO. The quantum yield of singlet oxygen production by Hyp in DMSO is $\Phi_\Delta = 0,4 \pm 0,03$. The rate constant for Hyp triplet state deactivation with molecular oxygen is $k_q = 1,6 \pm 0,3 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$.

Obsah

Úvod	5
1. Fotodynamická terapia.....	6
1.1 Mechanizmus PDT.....	6
1.2 Aplikácie PDT.....	7
2. Singletový kyslík	8
2.1 Elektrónová štruktúra singletového kyslíka	9
2.2 Produkcia singletového kyslíka.....	10
2.3 Singletový kyslík v biologických procesoch.....	11
2.4 Detekcia singletového kyslíka.....	12
3. Hypericín	13
3.1 Fyzikálno – chemické vlastnosti Hypericínu	13
4. Experimentálna časť	14
4.1 Popis aparatury.....	14
4.2 Analýza dát.....	15
4.3 Výsledky a diskusia.....	18
5. Záver	22
Zoznam použitej literatúry	23

Úvod

Singletový kyslík je reaktívna molekula intenzívne študovaná vďaka jej podstatnej úlohe vo fotodynamickej terapii (PDT). Počas PDT oxidačný stres indukovaný prostredníctvom reaktívnych kyslíkových foriem (najčastejšie singletový kyslík) spôsobuje smrť buniek v nádorovom tkanive. Singletový kyslík vzniká pri prenose energie medzi molekulou fotosenzibilizátora (v tripletovom stave) a kyslíkom v základnom stave [1]. Rýchlosť deaktivácie singletového kyslíka závisí od prostredia [2]. Doby života singletového kyslíka sa pohybujú v rozsahu od niekoľko mikrosekúnd (3-4 μ s vo vode) až po milisekundy (59 ms v CCl_4) [2,3]. Napriek tomu, že existuje mnoho prác so zameraním na dobu života singletového kyslíka v závislosti od prostredia, iba málo z nich sa venuje singletovému kyslíku v DMSO. Navyše dostupné dáta sa podstatne líšia. V publikáciách [4], [5] a [6] sú namerané hodnoty 1,8 μ s, 5,6 μ s a 30 μ s, zatiaľ čo hodnota vypočítaná z rýchlosti zhasania v článku [7] je 19 μ s.

Hlavným cieľom tejto práce je poskytnúť dodatočné experimentálne dáta a pomôcť k objasneniu rozporu medzi spomínanými publikáciami. Singletový kyslík môže byť detegovaný na základe jeho fosforescencie pri 1270 nm. Doba života singletového kyslíka je stanovená prostredníctvom časovo rozlíšeného merania rozpadu fosforescencie, ktoré nasleduje po fotoexcitácii molekuly fotosenzibilizátora (PS) laserovým pulzom. [8] Mnoho predchádzajúcich experimentov bolo vykonaných s krátkymi nanosekundovými excitačnými laserovými pulzmi. Alternatívnym spôsobom je použitie dlhších mikrosekundových laserových pulzov [9,10]. Hlavnou výhodou tejto tzv. kvazi-kontinuálnej excitácie je, že výkon lasera môže byť redukovaný v porovnaní s bežne používanými nanosekundovými pulzmi, čo má za následok slabšie bielenie PS. Okrem toho, ustálené podmienky na konci laserového pulzu umožňujú analytické riešenie diferenciálnych rovníc, ktoré popisujú koncentráciu singletového kyslíka po vypnutí lasera [11]. Hypericín (Hyp) je prirodzene vyskytujúci sa PS. Je študovaný pre jeho možné použitie v PDT. [12,13,] Hyp je dobre rozpustný v organických rozpúšťadlách. Vo vodných prostrediach vytvára nefluorescenčné agregáty. [14] Predložená práca sa zaoberá rýchlosťou deaktivácie tripletového stavu Hyp v DMSO, dobou života singletového kyslíka v DMSO a kvantovým výťažkom produkcie singletového kyslíka po excitácii Hyp v DMSO.

1. Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT) je popredná a stále sa vyvíjajúca metóda, ktorá sa používa na liečenie neoplastických a nemalígnych nálezov v rôznych častiach ľudského tela. PDT pozostáva z troch dôležitých zložiek: fotosenzibilizátora (PS), svetla a kyslíka. Žiadna z týchto zložiek individuálne nie je toxická, ale ich spojením vzniká vysoko reaktívny produkt singletový kyslík a ďalšie kyslíkové radikály, ktoré môžu bunku vážne poškodiť a spôsobiť jej smrť prostredníctvom apoptózy, alebo nekrózy. Podrobný popis mechanizmu PDT je uvedený v nasledujúcej kapitole. Efektívnosť a protinádorové účinky PDT zabezpečujú spolu súvisiace mechanizmy ako cytotoxický efekt, zničenie cievného zásobovania nádorových buniek a vznik silnej zápalovej reakcie. Príspevky od týchto troch mechanizmov závisia od typu a množstva PS, od času medzi distribúciou PS v tkanive a jeho vystaveniu svetlu, od dávky a intenzity svetla, od koncentrácie kyslíka, atď. (Obr. 2) [15]

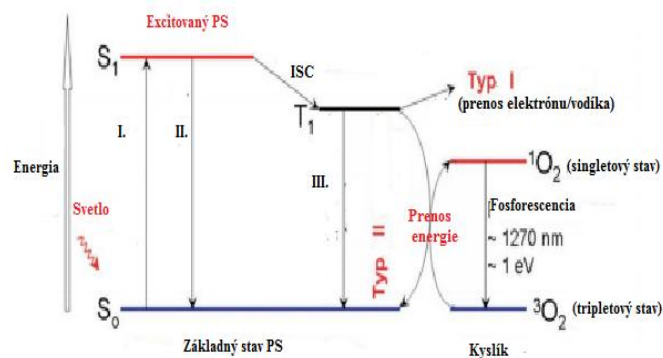
1.1 Mechanizmus PDT:

PDT je dvoj-kroková terapeutická technika založená na interakcii svetlom-aktivovaného liečiva (fotosenzibilizátor) s molekulovým kyslíkom v základnom tripletovom stave. Výsledkom tejto interakcie je produkcia reaktívnych kyslíkových foriem ako hydroxylový radikál, superoxidový anión, peroxid vodíka, ale najčastejšie singletový kyslík.

Prvým krokom je kontakt fotónu svetla s elektrónovým obalom fotosenzibilizátora v základnom stave, kde nastáva fáza absorpcie. V tejto fáze molekula PS absorbuje energiu fotónu a nastáva jej vybudenie do krátko žijúceho singletového stavu s dobou života rádovo niekoľko nanosekúnd. Aby mohla nastať táto interakcia, musí energia fotónu zodpovedať rozdielu energií medzi dvoma orbitálmi. Fotosenzibilizátor v základnom stave má dva elektróny s opačným spinom (singletový stav) na najvyššom obsadenom molekulovom orbitály. Po absorpcii svetla molekula prejde do orbitálu s vyššou energiou, ale spin elektrónu sa nemení (excitovaný singletový stav). Tento singletový stav sa buď rozpadá späť do základného stavu, kde

výsledkom je emisia svetla vo forme fluorescence, alebo sa zmení intersystémovým prechodom na oveľa stabilnejší tripletový stav, kde nastáva zmena spinu. V prípade fluorescence je energia vyžiareného fotónu menšia ako energia fotónu, ktorý vedie k excitácii fotosenzibilizátora. Príčinou tohto rozdielu je istá strata energie nežiarivým spôsobom, alebo možnosť, že sa molekula nevracia na najnižšiu energetickú hladinu základného stavu. Táto skutočnosť sa môže prejaviť tak, že látka absorbuje v modrej oblasti, ale fluoreskuje v červenej oblasti spektra.

Typická doba života tripletového stavu fotosenzibilizátora je niekoľko mikrosekúnd. Táto dlhá doba života je spôsobená tým, že emisii svetla (fosforescencia) z tripletového stavu do základného odpovedá spinovo zakázaný prechod. [16]



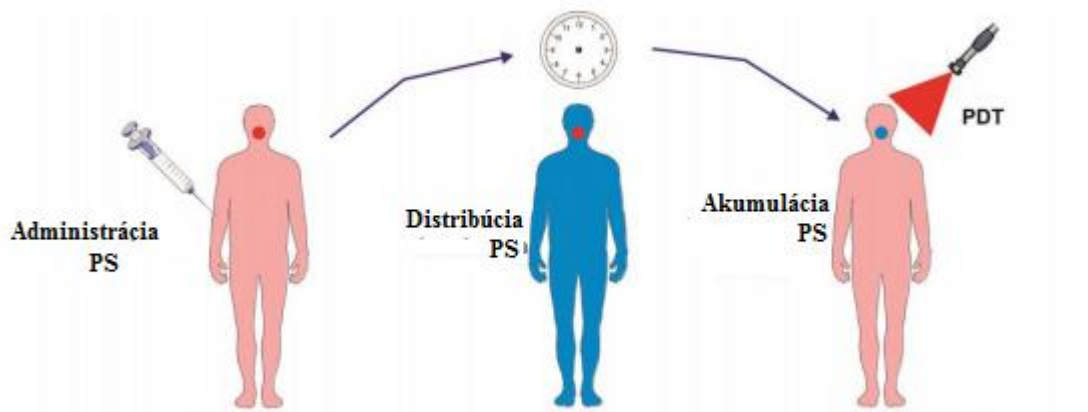
Obrázok 1. Jablonského diagram. I. Absorpcia fotónu. II. Fluorescencia (doba dohasínania rádovo niekoľko ns).

III. Fosforescencia (doba dohasínania typicky 0,1 – 10 μ s)

1.2 Aplikácie PDT

Klinická aplikácia PDT spočíva v podaní svetlo-citlivého PS do organizmu. Po jeho distribúcii v nádorových bunkách je následne ožiarený svetlom vhodnej vlnovej dĺžky. (obr.2) Ako zdroje svetla môžu byť použité lampy alebo lasery, ktoré svietia na zasiahnuté miesto priamo alebo cez optické vlákna. Nakoniec cytotoxický produkt, ktorý vznikol excitáciou fotosenzibilizátora ničí nádor. V optimálnom prípade k tomu dochádza bez následkov na zdravom tkanive. Pacient, ktorý podstúpil liečbu

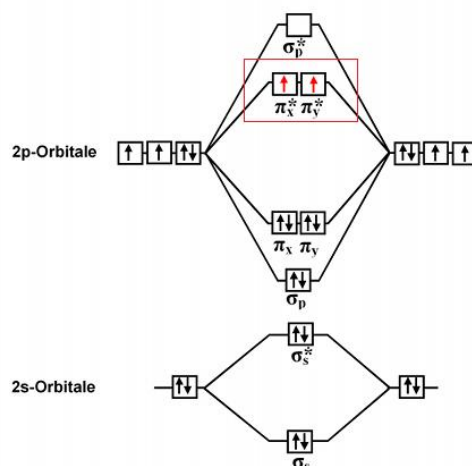
fotodynamickou terapiou, sa po zákroku vyhýba priamemu slnečnému žiareniu, až kým sa zvyšky fotosenzibilizátora nevyplavia z organizmu.



Obrázok 2. Aplikácia fotodynamickej terapie

2. Singletový kyslík

Molekulový kyslík je jeden z najvýznamnejších prvkov na zemi. Jeho obsah v atmosfére je asi 21%. Vyznačuje sa svojou výnimočnou elektrónovou štruktúrou. Väzba medzi dvoma kyslíkovými atómami vedie k základnej elektrónovej konfigurácii $(\text{K})(\text{K}) (2\sigma_g)^2(2\sigma_u)^2(3\sigma_g)^2(1\pi_u)^4(1\pi_g)^2$. S výnimkou prvých dvoch antiväzbových degenerovaných $\pi_{g,x}$ a $\pi_{g,y}$ orbitálov sú všetky molekulové orbitály dvojnásobne obsadené (Obr.5). Mullikan bol prvý kto predpovedal, že táto výnimočná elektrónová konfigurácia je dôvodom existencie troch energeticky blízko ležiacich elektrónových stavov $^3\Sigma_g^-$ tripletového stavu, excitovaného $^1\Sigma_g^+$ singletového stavu a excitovaného $^1\Delta_g$ singletového stavu. V prírode sa bežne molekulový kyslík nachádza v tripletovom stave $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$, čo znamená, že má dva nespárené elektróny v jeho najnižšom energetickom stave. Existencia nespárených valenčných elektrónov v stabilnej molekule má za následok, že nereaguje s väčšinou prírodných látok pri bežných podmienkach. [2]



Obrázok 3. Molekulový orbitál kyslíka v základnom stave

(prevzaté z www.chemvazba.moxo.cz)

2.1 Elektrónová štruktúra singletového kyslíka

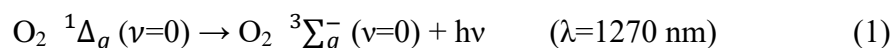
Elektrónovú konfiguráciu pre základný tripletový stav sme si ukázali vyššie. Pre singletový stav ${}^1\Delta_g$ a ${}^1\Sigma_g^+$ sa bude líšiť iba v štruktúre π - antiväzbových orbitálov. (Obr.4)

Stav	Obsadenie orbitálov
${}^1\Sigma_g^+$	
${}^1\Delta_g$	
${}^3\Sigma_g^-$	

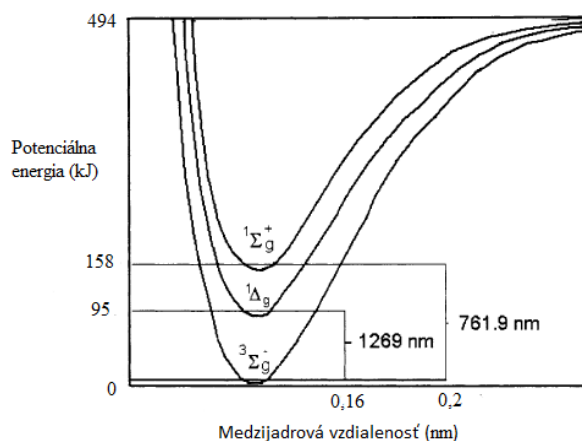
Obrázok 4. Reprézentácia dvoch singletových a základného tripletového stavu molekuly kyslíka. (Prevzaté z [17])

Prechod zo singletového ${}^1\Delta_g$ stavu do základného tripletového je spinovo zakázaný, teda ${}^1\Delta_g$ je relatívne dlho žijúca forma kyslíka, ktorá sa zjednodušene nazýva aj singletový kyslík. Na druhej strane singletový stav ${}^1\Sigma_g^+$ je krátko žijúci kvôli spinovo dovolenému ${}^1\Sigma_g^+ \rightarrow {}^1\Delta_g$ prechodu. Tento rozdiel v stabilite potvrdzuje aj doba života

singletových stavov (45 min. pre $^1\Delta_g$ a 7-12s pre $^1\Sigma_g^+$ v plynnej fáze). [17] Značný rozdiel medzi týmito stavmi môžeme vidieť aj v hodnote excitačných energií. Singletový stav $^1\Delta_g$ má excitačnú energiu 95 kJ/mol, čomu zodpovedá prechod do základného tripletového stavu v blízkej infračervenej oblasti s vlnovou dĺžkou ~1270 nm. [2]



Táto luminiscencia je veľmi slabá s kvantovým výťažkom okolo 10^{-6} - 10^{-3} , pretože väčšina deaktiváčnych zrážok singletového kyslíka s molekulami rozpúšťadla produkuje teplo prostredníctvom nežiarivého prechodu.



Obrázok 5. Potenciálna energia základného a dvoch excitovaných stavov kyslíka (prevzaté z [17])

Prechod $^1\Sigma_g^+ \leftrightarrow ^3\Sigma_g^-$ má excitačnú energiu 158 kJ/mol, čomu zodpovedá prechod v oblasti s vlnovou dĺžkou 761,9 nm. (obr.5)

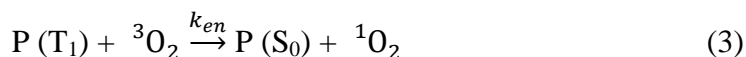
2.2 Produkcia singletového kyslíka

Singletový kyslík môže byť produkovaný rôznymi spôsobmi. Najčastejšie to však zahŕňa prenos elektrónovej energie z excitovaného stavu molekuly (tzv. fotosenzibilizátora) na molekulový kyslík v základnom stave. Podrobný postup dejov odohrávajúcich sa v molekule po jej ožiarení svetlom vhodnej vlnovej dĺžky až kým sa nedostane späť do základného stavu sme popísali v kapitole 1. V tejto kapitole sa bližšie

pozrieme na to, čo sa deje po jej prechode do tripletového stavu (hlavne na mechanizmus Typu II) a na kvantový výťažok singletového kyslíka.

Typ II zahŕňa priamu reakciu excitovaného fotosenzibilizátora s molekulovým kyslíkom za vzniku singletového kyslíka.

Schéma mechanizmu Typu II:



Schopnosť fotosenzibilizátora produkovať singletový kyslík je meraná kvantovým výťažkom, ktorý určuje pravdepodobnosť vzniku singletového kyslíka po absorpcii fotónu. Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka môžeme určiť na základe rôznych fotofyzikálnych a fotochemických procesov. Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka definovaný ako :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T \Phi_{en} = \Phi_T \cdot \left(\frac{k_{en} \cdot [O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q [O_2]} \right) \quad (4)$$

kde Φ_T je kvantový výťažok tripletového stavu, Φ_{en} efektívnosť prenosu energie z tripletu na singletový kyslík, k_{en} rýchlostná konštanta reakcie (3) a k_q súčet rýchlostných konštánt zhasania $P(T_1)$ prostredníctvom O_2 ($k_{en} + k_{dO_2} + k_{et}$). Táto rovnica sa dá vyjadriť aj ako:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T \cdot \left(\frac{k_q \cdot [O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q [O_2]} \right) \cdot \left(\frac{k_{en}}{k_q} \right) = \Phi_T \cdot P_{O_2}^T \cdot f_{\Delta}^T \quad (5)$$

kde $f_{\Delta}^T = (k_{en}/k_q)$ značí efektívnosť formovania singletového kyslíka pri reakciách tripletového stavu s molekulovým kyslíkom a $P_{O_2}^T = k_q [O_2] / (k_r + k_{nr} + k_q [O_2])$ reprezentuje frakciu tripletových stavov zhasaných kyslíkom. [17]

2.3 Singletový kyslík v biologických procesoch

Singletový kyslík hrá množstvo rôznych a dôležitých úloh v biologických systémoch. Môže zastávať ochrannú funkciu, oxidačnú ako aj ničiť mikroorganizmy, ktoré by inak boli považované za škodlivé. Veľmi dobrým príkladom je jeho úloha ako antibakteriálne alebo antimikrobiálne činidlo v rastlinách, ale aj v živočíchoch. Na

úrovni buniek je správanie singletového kyslíka tiež veľmi zaujímavé. Vďaka jeho veľkej reaktivite, dokáže v bunke vyvolať procesy vedúce k jej smrti. To sa však môže stať dvoma spôsobmi. V prvom prípade dôjde k nekróze, ktorá zahŕňa drastické narušenie buniek spojené so zničením buniek, čo sa deje dôsledkom vysokých lokálnych koncentrácií singletového kyslíka. Dochádza k narušeniu cytoplazmatickej membrány a rovnováhy vnútorného prostredia bunky. Druhým spôsobom je apoptóza, ktorá je oveľa komplikovanejšia, no napr. z hľadiska terapie nádorov preferovanejšia. Už aj prítomnosť malého množstva singletového kyslíka môže vyvolať kaskádu dejov, ktoré budú viesť k zastaveniu životných funkcií a ku kontrolovanému rozkladu buniek. [17]

2.4 Detekcia singletového kyslíka

Na detekciu singletového kyslíka bolo vyvinutých niekoľko metód, ktoré sú založené na pozorovaní reakcií $^1\Delta_g$ s inými molekulami pomocou spektroskopických techník, kde vznikajú primárne a sekundárne fotooxidačné produkty. Tieto metódy zaraďujeme medzi chemické. Okrem chemických metód poznáme aj fyzikálne metódy, kde patria laserovo-indukovaná optoakustická spektroskopia (LIOAS), fotoakustická kalorimetria, time resolved thermal lensing (TRTL)

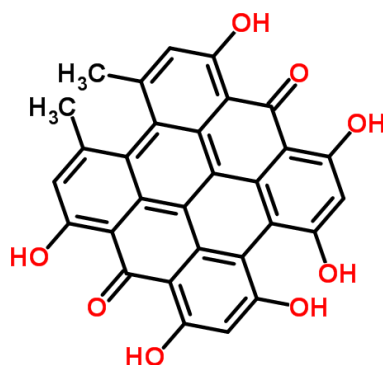
Medzi fyzikálne metódy môžeme zaradiť aj detekciu singletového kyslíka na základe merania jeho fosforescencie pri 1270 nm. Tu rozlišujeme dva spôsoby merania.

Prvý spôsob je založený na excitácii látky citlivej na svetlo (fotosenzibilizátora) pulzným laserom. Pozorujeme časový priebeh fosforescencie $^1\Delta_g$ po ožiarení. Táto metóda má výhodu, že poskytuje dve informácie: signál $^1\Delta_g$ a dobu života $^1\Delta_g$. Naopak, nevýhodou je veľmi silný pulz svetla, ktorý môže vzorku vybieliť.

Druhá metóda je založená na použití kontinuálneho zdroja svetla (Xe/Hg lampa v kombinácii s monochromátorom). Tu už k vybieleniu vzorky nedochádza, lebo svetlo nie je tak silné, ale signál $^1\Delta_g$ sa prekrýva s fluorescenciou, alebo fosforescenciou svetlo citlivej látky a nedokážeme pozorovať dobu rozpadu $^1\Delta_g$. [8] Na oddelenie signálu singletového kyslíka od ostatného pozadia je nutné premerať spektrum emisného žiarenia v okolí 1270 nm.

3. Hypericín

Hypericín ($C_{30}H_{16}O_8$) je prírodný produkt, ktorý štruktúralne patrí do chemickej triedy naftodiantróny a je účinnou a charakteristickou zložkou obsiahnutou v rastlinách rodu *Hypericum*.



Obr. 1: Molekulová štruktúra Hypericínu.

Prvý krát bol Hyp izolovaný z rastliny *Hypericum perforatum* (u nás známej ako Ľubovník bodkovaný), ktorý je pravdepodobne jeho najbohatším zdrojom. Hypericín ako polycyklická aromatická molekula sa nachádza v listoch, kvetoch a stonkách rastlín vo forme granúl. Hyp je účinné antidepresívum, ale nepoužíva sa ako liek. Disponuje virucidnou aktivitou ako aj antiproliferatívnymi a cytotoxickými účinkami. [1]

1.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti Hypericínu

Hyp má veľmi zaujímavú molekulárnu štruktúru, pretože jedna časť molekuly viaže vodu (teda je hydrofilná) a druhá časť (kde patrí jadro a metylové skupiny) vodu odpudzuje (je hydrofóbna). Je nerozpustný v nepolárnych rozpúšťadlách a ľahko rozpustný v etanole, dimetylsulfoxide (DMSO) a vodných alkalických roztokoch. Hyp rozpustený v týchto rozpúšťadlách ostane vo svojej monomérskej forme až do koncentrácie $\sim 10^{-3}$ M a má relatívne vysoký kvantový výťažok fluorescencie ($\sim 0,2$).

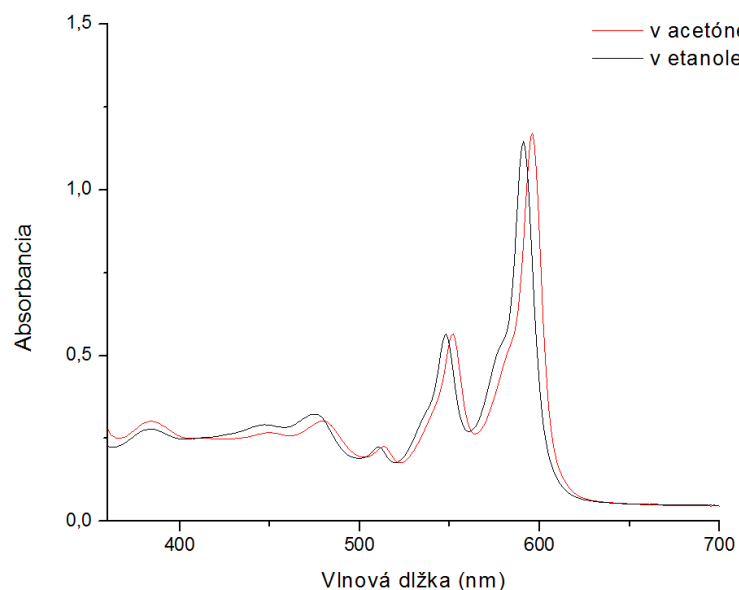
Hyp absorbuje v UV a viditeľnej oblasti a jeho absorpčné maximum je okolo 600 nm (Obr.2). Absorpčné spektrum vykazuje symetriu s fluorescenčným spektrom.[2]

Pri pridaní vody do rozpúšťadla je pozorovaná dramatická zmena absorpčných vlastností. Hypericín vo vode vytvára agregáty, ktoré sú nefluorescenčné a výrazne potlačujú jeho fotodynamickú aktivitu. Agregáty vykazujú absorpčné spektrá v rovnakej oblasti ako voľný Hypericín ale majú oveľa nižší extinkčný koeficient.

Existujú dva mechanizmy, ktoré popisujú združovanie molekúl Hyp, teda vytváranie agregátov :

1. Skladanie – tu sa vytvárajú tzv. H – agregáty.
2. Planárne združovanie – tvorba J – agregátov.

Ku skladaniu dochádza vzhľadom na hydrofóbny účinok aromatického jadra. Planárne združovanie Hyp zahŕňa vodíkové väzby medzi karbonylovými a hydroxylovými skupinami molekúl Hyp. Difúzia združených molekúl Hyp je ovplyvnená veľkosťou a štruktúrou agregátov. Difúzia agregátov Hypericínu môže byť za určitých okolností hnacou silou transportu Hyp v živom tkanive. To je veľmi dôležité pre aplikáciu Hyp v lekárskech a biologických vedách. [2]

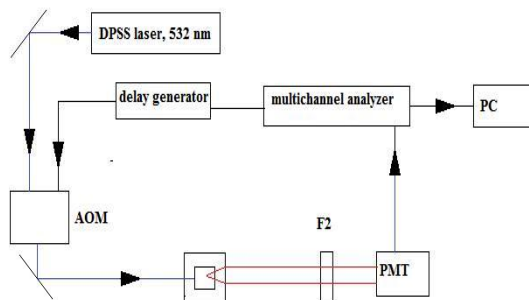


Obr. 1: Absorpčné spektrum Hyp v acetóne a etanole.

4. Experimentálna časť

4.1 Popis aparatóry

Schéma použitého experimentálneho zariadenia na meranie fosforescencie singletového kyslíka je znázornená na obr.7. Excitačný laserový lúč, s vlnovou dĺžkou 532 nm, prechádzal najprv cez akusto-optický modulátor (AOM, Isomet 1205c, Obr.7). AOM bol použitý na vytváranie 35 μ s dlhých pulzov z excitačného laserového lúča s rýchlosťou opakovania 8000 Hz. AOM funguje v režime prepínania (ON/OFF) s dobou nábehu 400 ns. Prepínanie je riadené prostredníctvom elektrického signálu z generátora pulzov. Po vypnutí lasera je detegované dohasínanie fosforescencie $^1\text{O}_2$.



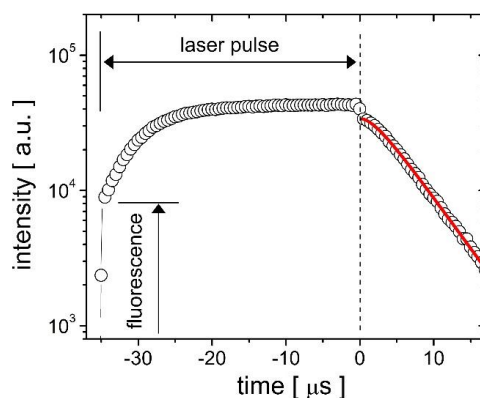
Obrázok 7. Nákres aparatóry. PMT – fotonásobič,
AOM- akusto-optický modulátor, F₂ –filter

Kyveta (1x1x4 cm) bola naplnená roztokom s objemom 2 ml a umiestnená do aparatóry. Vzorka sa udržiavala na stálej teplote 22 °C. Teplota bola monitorovaná priamo v roztoku pomocou termoelektrického článku umiestneného v sklenenej kapiláre. Roztok pozostával z Hyp rozpustenom v DMSO o koncentrácií $5 \cdot 10^{-6}$ M. Táto koncentrácia bola dostatočne nízka na to, aby bola vlastná absorpcia fluorescencie Hyp v kyvete zanedbateľná. Do roztoku bola privedená zmes plynov N₂ a O₂. Pracovali sme s prietokom plynu 25 sccm (standard cubic centimeter per minute), ktorý bol zavedený do kyvety cez sklenenú kapiláru. Vzorka bola premiešavaná magnetickým miešadlom

na udržiavanie stálej koncentrácie a minimalizácie vybielenia. Zmes plynov prúdila do vzorky počas celého merania. Excitačný laserový lúč s priemerným výkonom 1,4 mW vstupuje do kyvety zo spodnej strany. Emitované fosforescenčné žiarenie bolo detegované pomocou infračerveného fotonásobiča (PMT, Hamamatsu H10330A-75), ktorý bol prevádzkovaný v režime počítania fotónov. Spektrálne okno PMT bolo ohraničené na 1250-1350 nm pomocou sady filtrov. Časový priebeh počtu fotónov sa získava prostredníctvom multikanálového čítača (Becker & Hickl, MSA-300). Počet laserových pulzov v každom meraní bol $3 \cdot 10^6$. Takto môžeme počas celého merania monitorovať efekt vybielenia. Na kalibráciu experimentálnej aparatúry pre meranie kvantového výťažku produkcie singletového kyslíka bola použitá referenčná vzorka Rose Bengal. Kalibrácia bola vykonaná roztokom Rose Bengal rozpustenom v DMSO, ktorý mal rovnakú absorbanciu ako použitá vzorka Hypericínu. Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka Rose Bengal v DMSO bola stanovená na 0,76. [5]

4.2 Analýza dát

Signál fosforescencie detegovaný fotonásobičom pri 1270 nm je zobrazený na obr.8. Na obrázku môžeme vidieť, že ustálená intenzita emisie je dosiahnutá ešte pred skončením 35 μs laserového pulzu. Nule na x-ovej osi zodpovedá koniec laserového pulzu.



Obrázok 8. Časová závislosť emisného signálu po excitácii Rose Bengal v DMSO detegovaný pri 1270nm.

Po vypnutí lasera ($t=0$) koncentrácia tripletového stavu Hypericínu exponenciálne klesá s časovou konštantou τ_T :

$$\frac{1}{\tau_T} = k_0 + k_q[\text{O}_2] \quad (6)$$

kde k_0 je rýchlostná konštanta zhášania tripletového stavu Hyp v neprítomnosti kyslíka, k_q je rýchlostná konštanta deaktivácie tripletového stavu Hyp molekulovým kyslíkom. Rýchlostná konštanta zhášania tripletového stavu Hyp je ďalej daná:

$$k_0 = k_r + k_{nr} \quad (7)$$

kde členy k_r a k_{nr} predstavujú rýchlostné konštanty žiarivej a nežiarivej deaktivácie tripletového stavu Hyp.

Zmeny koncentrácie $[\Delta]$ singletového kyslíka po skončení laserového pulzu môžeme napísať ako:

$$\frac{d[\Delta]}{dt} = k_q[\text{O}_2][T]f_{\Delta}^T - \frac{[\Delta]}{\tau_{\Delta}} \quad (8)$$

Prvý člen na pravej strane predstavuje produkciu singletového kyslíka po reakcii excitovaného Hyp s molekulovým kyslíkom, f_{Δ}^T je frakcia tripletového stavu Hyp zhášaného kyslíkom za vzniku singletového kyslíka a τ_{Δ} je doba života singletového kyslíka. Ak si označíme prvý člen na pravej strane v čase $t=0$ ako $S_0 = k_q[\text{O}_2][T]_0 f_{\Delta}^T$, predpokladáme ustálenú koncentráciu $[\Delta]_0$ a $[T]_0$ pri $t=0$ a konštantnú $[\text{O}_2]$ počas celého procesu, získame riešením (8) nasledujúci vzťah:

$$[\Delta] = \frac{S_0 \tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} \left(\tau_{\Delta} e^{-\frac{t}{\tau_{\Delta}}} - \tau_T e^{-\frac{t}{\tau_T}} \right) \quad (9)$$

Nameraná intenzita rozpadu pri 1270 nm je úmerná uvedenej koncentrácii singletového kyslíka.

$$I_{meas}^{1270} = ck_{\Delta}^e[\Delta] = F \frac{\tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} \left(\tau_{\Delta} e^{-\frac{t}{\tau_{\Delta}}} - \tau_T e^{-\frac{t}{\tau_T}} \right) \quad (10)$$

kde c je koeficient úmernosti pre daný detekčný systém, k_{Δ}^e je rýchlostná konštanta emisie fosforescencie singletového kyslíka a $F = S_0 k_{\Delta}^e c$. Táto časová závislosť (10) sa líši od časovej závislosti experimentov, pri ktorých sa používajú krátke niekoľko nanosekundové pulzy. Pri krátkych pulzoch pozorujeme, že po excitácii fosforescenčný signál najprv rastie, potom dosiahne maximum až nakoniec klesá. (10) ukazuje monotónny pokles intenzity fosforescencie s nulovou deriváciou v čase $t=0$. Na obr. 8 môžeme vidieť klasickú krivku rozpadu fosforescencie singletového kyslíka získanú kvázi-kontinuálnou excitáciou Rose Bengal v DMSO použitím 35 μs pulzov. Rose Bengal (na rozdiel od Hyp) má nízku hodnotu fluorescencie pri 1270 nm. Po zapnutí

lasera ($t = -35 \mu\text{s}$ na obr.8) sa okamžite objaví fluorescenčný signál. Nábeh fluorescencie je obmedzený časom spínania AOM. Počas laserového pulzu pozorujeme zvýšenie príspevku fosforescencie singletového kyslíka, ktorý dosiahne ustálenú intenzitu na konci pulzu. Po vypnutí lasera ($t=0$) fluorescencia Rose Bengal rýchlom zánikom a sledujeme rozpad fosforescencie singletového kyslíka. Červená krivka na obr.10 predstavuje fit exponenciálnych dát podľa rovnice (10), z ktorého určíme hodnoty τ_Δ , τ_T a F . Pri fitovaní experimentálnych dát rovnicou (10) platia rovnaké pravidlá ako pri excitácii krátkymi pulzmi. Ako už bolo spomenuté fitovaním krivky rozpadu fosforescencie s (10) sa stanoví τ_Δ , τ_T , a hodnota F , ktorá je úmerná ustálenej rýchlosti produkcie singletového kyslíka S_0 . Fitovaná hodnota F môže byť použitá na meranie kvantového výťažku produkcie singletového kyslíka Φ_Δ , a to porovnaním nameraných hodnôt F s výsledkami získanými pre referenčnú molekulu som známym kvantovým výťažkom (Rose Bengal):

$$\Phi_\Delta = \Phi^{Ref} \frac{F_1}{F_1^{Ref}} \quad (11)$$

kde $\Phi^{Ref} = 0,76$. Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka Φ_Δ je spojený s kvantovým výťažkom fotoexcitácie tripletového stavu Hyp Φ_T , s f_Δ^T frakciou tripletového stavu Hyp kyslíkom za vzniku singletového kyslíka a s frakciou tripletového stavu Hyp zhasaného kyslíkom $P_T^{O_2}$:

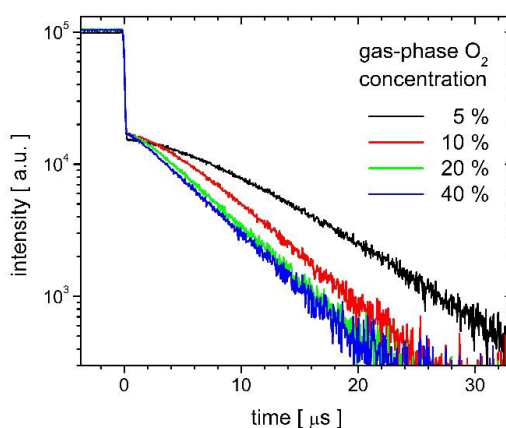
$$\Phi_\Delta = \Phi_T P_T^{O_2} f_\Delta^T \quad (12)$$

kde $P_T^{O_2}$ môžeme za okolností, že poznáme k_0 a k_q vyrátať ako

$$P_T^{O_2} = \frac{k_q [O_2]}{k_0 + k_q [O_2]} \quad (13)$$

4.3 Výsledky a diskusia

Vývoj infračervenej emisie vo vzorke počas a po laserovom pulze bol detegovaný pre 5, 10, 20 a 40% koncentrácie kyslíka. Získané krivky rozpadu sú zobrazené na obr.9 pre koncentráciou Hyp $5 \cdot 10^{-6}$ M. Môžeme vidieť výrazný príspevok fluorescencie Hyp k infračervenému signálu počas laserového pulzu. Na základe poklesu intenzity fluorescencie počas merania môžeme odhadnúť, že rozsah vybielenia Hyp je menej ako 3%.

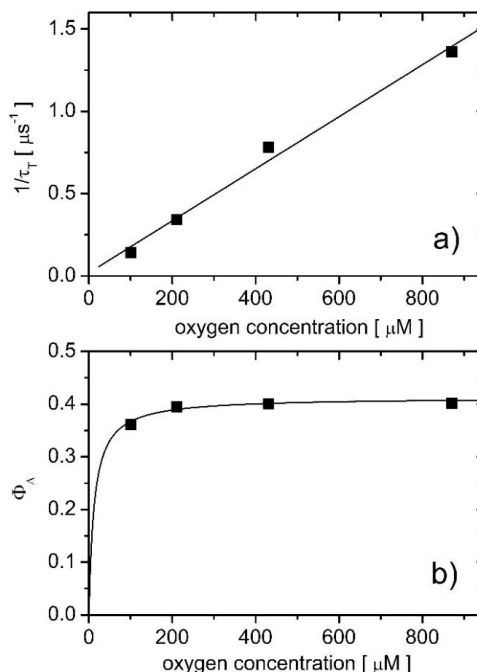


Obrázok 9. Krivky rozpadu fosforescencie detegované pri 1270 nm po kvázi-kontinuálnej excitácii Hyp v DMSO

Doby života singletového kyslíka a tripletového stavu Hyp boli stanovené fitovaním krivky rozpadu fosforescencie s rovnicou (10). Doba života tripletového Hyp je závislá na koncentrácii kyslíka. Pri jeho vysokej koncentrácii je doba života tripletového Hyp nízka. Na obr.9 môžeme vidieť, že so zvyšovaním podielu kyslíka v DMSO sa krivka fosforescencie singletového kyslíka stáva mono-exponenciálnou. Navyše sklon exponenciálnej krivky (na logaritmickej škále) sa nemení medzi 20 a 40% kyslíka. Fitovaním krivky rozpadu pri 20 a 40% kyslíka rovnicou (10), doba života singletového kyslíka v DMSO bola stanovená na $\tau_{\Delta} = 5.5 \pm 0.3 \mu\text{s}$. Bola vykonaná sada kontrolných meraní aby sa overila správnosť získaných údajov doby života. Po prvé sme znížili koncentráciu Hyp na $2 \cdot 10^{-6}$ M aby sme odhadli zhasanie singletového kyslíka Hypericínom vo vzorke. Zistilo sa, že efekt Hyp môže byť zanedbaný v rozsahu experimentálnej chyby. Po druhé, doba života singletového kyslíka bola meraná pri nižšom výkone lasera (0,7 mW) aby sa vylúčil efekt možných fotoproduktov na dobu života singletového kyslíka. Nakoniec bolo meranie zopakované s Rose Bengalom rozpustenom v DMSO. Všetky tieto merania potvrdili danú hodnotu doby života singletového kyslíka v DMSO, ktorá súhlasí s hodnotou uvedenou v [5].

Ďalej sa predpokladá, že doba života singletového kyslíka nezávisí na koncentrácii kyslíka. Tento predpoklad bol potvrdený faktom, že sme nepozorovali žiadne zmeny medzi 20 a 40% kyslíka. Krivky rozpadu fosforescencie merané pre nízke koncentrácie kyslíka (5 a 10%) boli fitované rovnicou (10) použitím vyššie uvedenej hodnoty τ_{Δ} .

Recipročné hodnoty doby života tripletového Hyp získané pre rôzne koncentrácie kyslíka sú znázornené na obr. 10a.



Obrázok 10. a. Prevrátená hodnota doby života ${}^3\text{Hyp}$ v závislosti od koncentrácie kyslíka v DMSO fitovaná rovnicou (10)

b. Kvantový výt'azok singletového kyslíka produkovaného Hyp v DMSO.

Dáta boli fitované lineárnou závislosťou koncentrácie singletového kyslíka (6). Rýchlostná konštanta pre zhášanie Hyp v reakcii s molekulovým kyslíkom v základnom stave bola stanovená na $k_q = (1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Experimentálna chyba pre stanovenie rýchlostnej konštanty Hyp zhášaného bez prítomnosti kyslíka (k_0) je relatívne veľká, avšak fitovaná hodnota $k_0 = 2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ je v súlade s meraniami v [16].

Hodnota F získaná fitovaním kriviek s rovnicou (10) bola použitá na vyhodnotenie kvantového výt'azku produkcie singletového kyslíka Hyp v DMSO. Výsledok je ukázaný na obr. 10b. Teoretická krivka (plná čiara na obr. 10b) bola zostrojená substitúciou k_0 a k_q do (12) a (13). Predpokladalo sa, že $\Phi_{\text{T}} f_{\Delta}^{\text{T}}$ je konštantné a bolo upravené aby reprodukovalo namerané dáta. Je zrejmé, že koncentrácia kyslíka použitá v experimente bola dosť veľká na saturáciu $P_{\text{T}}^{\text{O}_2}$, čo vysvetľuje slabú kyslíkovú závislosť kvantového výt'azku. Nameraný kvantový výt'azok produkcie singletového

kyslíka Hypericínom v DMSO pri atmosférických podmienkach je $\Phi_{\Delta} = 0,4 \pm 0,03$. Uvedená chyba odráža nepresnosť referenčného kvantového výťažku singletového kyslíka produkovaného Rose Bengalom v DMSO. Kvantový výťažok získaný pre Hyp v DMSO je blízky nameraným hodnotám pre Hyp rozpustený v metanole (0,39) [22], v etanole (0,35), alebo acetonitrile (0,25). [23]

Záver

Kvázi-kontinuálna excitácia bola úspešne aplikovaná na kvantitatívne meranie doby života singletového kyslíka a hodnoty kvantového výťažku jeho tvorby. Singletový kyslík bol produkovaný fotoexcitáciou Hyp v DMSO pri rôznych koncentráciách kyslíka vo vzorke. Hlavnou výhodou práce s dlhými laserovými pulzmi je, že bielenie PS môže byť výrazne potlačené v porovnaní s excitáciou krátkymi pulzmi (ns). Pri experimente vykonávanom pri vysokej koncentrácii kyslíka je získaná doba života singletového kyslíka $\tau_{\Delta} = 5.5 \pm 0.3 \mu\text{s}$. Rýchlostná konštanta pre deaktiváciu tripletového stavu Hyp molekulovým kyslíkom v základnom stave v DMSO ($k_q = (1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.) zatiaľ nebola publikovaná. Kvantový výťažok produkcie singletového kyslíka Hyp v DMSO bol stanovený na $\Phi_{\Delta} = 0,4 \pm 0,03$.

Zoznam použitej literatúry

- [1]P.R. Ogilby, Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 3181-3209
- [2]C. Schweitzer, R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1685-1757.
- [3]F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24 (1995) 663-1021.
- [4]M. Korínek, R. Dedic, A. Molnár, A. Svoboda, J. Hála, A comparison of photosensitizing properties of meso-tetraphenylporphin in acetone and in dimethyl sulfoxide, *J. Mol. Struct.* 744-747 (2005) 727-731.
- [5]A. Staicu, A. Pascu, M. Boni, M.L. Pascu, M. Enescu, Photophysical study of Zn phthalocyanine in binary solvent mixtures, *J.Mol. Struct.* 1044 (2013) 188-193.
- [6]R. Nilsson, D.R. Kearns, Role of singlet oxygen in some chemoluminescence and enzyme oxidation reactions, *J. Phys. Chem.* 78 (1974) 1681-1683.
- [7]H.J. Guiraud, C.S. Foote, Chemistry of superoxide ion. III. Quenching of singlet oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 1984-1986.
- [8]A.A. Krasnovsky Jr., Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics, *J. Photoch. Photobio. A* 196 (2008) 210-218.
- [9]S. Lee, L. Zhu, A.M. Minhaj, M.F. Hinds, D.H. Vu, D.I. Rosen, S.J. Davis, Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen, *J. Biomed. Opt.* 13 (2008) 034010.

- [10] S. Lee, D. H. Vu, M. F. Hinds, S. J. Davis, A. Liang and T. Hasan, Pulsed diode laser-based singlet oxygen monitor for photodynamic therapy: *in vivo* studies of tumor-laden rats, *J. Biomed. Opt.* 13 (2008) 064035.
- [11] J. Varchola, V. Huntosova, D. Jancura, G. Wagnières, P. Miskovsky, G. Bánó, Temperature and oxygen-concentration dependence of singlet oxygen production by RuPhen as induced by quasi-continuous excitation, *Photochem. Photobiol. Sci.* 13 (2014) 1781-1787.
- [12] P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, P.A. De Witte, Hypericin in Cancer Treatment: More Light on the Way, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 221-241.
- [13] P. Miskovsky, Hypericin – a New Antiviral and Antitumor Photosensitizer: Mechanism of Action and Interaction with Biological Macromolecules, *Curr. Drug Targets* 3 (2002) 55-84.
- [14] G. Bánó, J. Staničová, D. Jancura, J. Marek, M. Bánó, J. Uličný, A. Strejčková, P. Miškovský: On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures – the effect of aggregation, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 2417-2423
- [15] CALZAVARA-PINTON, Piergiacomo, et al. Photodynamic therapy: update 2006 *Photochemistry and photobiology*, 2007, **21**, 293-302.
- [16] CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004, 1.4: 279-293.
- [17] DEROSA, Maria C.; CRUTCHLEY, Robert J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 233: 351-371.
- [18] KARIOTI, Anastasia; BILIA, Anna Rita. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 2010, 11.2: 562-594.

- [19] KRIEG R.C. – FICKWEILER S. – WOLFBEIS O.S. et. al.: Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*, 72, 2000, p. 226-233.
- [20] MLKVY, Peter. Postavenie a možnosti fotodynamickej terapie v onkológii. 2007.
- [21] VAN HILLEGERSBERG R.J. – VAN BERG W.O. – KORT W.J.: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rat. *Gastroenterology*, 103, 1992, p. 647-651.
- [22] M. Roslaniec, H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, B. Ehrenberg, Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes, *J. Photoch. Photobio. B* 57 (2000) 149-158.
- [23] S. Dumas, J.C. Leprêtre, A. Lepellec, A. Darmany, P. Jardon, Reactivity of the photo excited forms of Hypericin, Hypocrellin A, Hypocrellin B and methylated Hypericin towards molecular oxygen The role of charge transfer interaction, *J. Photoch. Photobio. B* 163 (2004) 297-306.