

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁRSKA PRÁCA

2020

Kristína Husárová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optické konštanty ftalocyanínu v úlohe fotodynamickej terapie

Kristína Husárová

Bakalárská práca

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristína Husárová**
Osobní číslo: **C16421**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Optické konstanty ftalocyaninu v úlohe fotodynamické terapie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracovat rešerši na dané téma, zvláště pak popsat roli ftalocyaninu ve fotodynamické terapii.
- 2) Posoudit význam optických konstant ftalocyaninu jako fotosenzitizéru.
- 3) Prostudovat dostupné experimentální a teoretické metody používané pro určení optických konstant ftalocyaninu ve viditelné a blízké infračervené oblasti.
- 4) Seznámení se se spektroskopickým ellipsometrem a posouzení možnosti jeho využití pro určení optických konstant ftalocyaninu.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Dr. Mgr. Jan Mistrík, Ph.D.**
Ústav aplikované fyziky a matematiky

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne s využitím literárnych prameňov a informácií, ktoré sú uvedené v zozname použitej literatúry. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä zo skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k užitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. O vysokých školách a o zmene a doplnení niektorých zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 7/2019, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice. Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa

Kristína Husárová

Pod'akovanie

Týmto by som chcela pod'akovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce Dr. Mgr. Janu Mistríkovi Ph.D. za cenné rady, veľkú trpezlivosť a ochotu, osobitý prístup a za inšpiratívny pohľad na danú tematiku. Ďalej by som chcela pod'akovať môjmu bratovi Bc. Sebastiánovi Husárovi za pomoc a rady v oblasti systému LaTeX.

ANOTÁCIA

Cieľom tejto bakalárskej práce je určenie optických konštánt meďnatého ftalocyanínu, ktorý má zásadnú úlohu vo fotodynamickej terapii, ako fotosenzitizér, čím je chemická látka citlivá na svetlo. Práve interakciou fotosenzitizéru so svetlom dochádza ku vzniku reaktívnych foriem kyslíka, a následne k usmrteniu nádorových buniek u pacienta. K samotnému určeniu optických konštánt bola použitá metóda spektroskopickkej elipsometrie, ktorá je založená na zmene polarizácie svetla po odraze na rozhraní dvoch rôznych prostredí, na základe čoho je možná presná charakterizácia optických vlastností študovaného materiálu. Vzhľadom na požadované vlastnosti vhodného fotosenzitizéru, ktoré musí vykazovať pre správnu funkciu a priebeh fotodynamickej terapie, sme sa zamerali na jeho absorpciu v oblasti terapeutického okna (maximálna penetračná hĺbka v danom tkanive, teda v spektrálnom intervale 620-800 nm). Hodnoty experimentálne určených optických konštánt ftalocyanínu boli parametrizované vhodnou matematickou funkciou a následne porovnávané s teoretickými hodnotami vypočítanými ab-initio a prezentovanými v literatúre. Toto zrovnanie umožní ďalší stupeň vyladenia teoretických ab-initio postupov, a teda lepšiu predikciu vlastností fotosenzitizéru v oblasti fotodynamickej terapie.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Fotodynamická terapia, nádor, fotosenzitizér, spektroskopická elipsometria, ftalocyanín, pigment, reaktívne formy kyslíka, optické konštanty, ab-initio, terapeutické okno

TITLE

Optical constants of phthalocyanine and their importance in photodynamic therapy

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis is to determine the optical constants of copper phthalocyanine, which has a crucial role in photodynamic therapy as a photosensitizer, making the chemical sensitive to light. It is the interaction of photosensitizer with light that results in the formation of reactive oxygen species and the subsequent killing of tumor cells in the patient. To determine the optical constants, the method of spectroscopic ellipsometry was used, which is based on the change of polarization of light after it is reflection from sample surface. On the basis of measured ellipsometric parameters it is possible to accurately characterize the optical properties of the

studied material. Given the properties of a suitable photosensitizer, which must have for proper function and course of photodynamic therapy, we focused on the photosensitizer absorption in the area of the therapeutic window (maximum penetration depth in a given tissue, spectral range 620-800 nm). At the same time, however, we extended the studied spectral field to the UV region in order to verify the reliability of theoretical ab-initial calculations currently used for the calculation of optical constants of various materials.

KEYWORDS

Photodynamic therapy, tumor, photosensitizer, spectroscopic ellipsometry, phthalocyanine, pigment, reactive oxygen species, optical constants, ab-initio, therapeutic window

OBSAH

Zoznam Obrázkov	10
Zoznam tabuliek	12
Zoznam skratiek	13
1 Úvod	14
1.1 HISTÓRIA	14
1.2 Jednotlivé fázy fotodynamickej terapie	16
Fáza I. ABSORPCIA	17
Fáza II. PRENOS energie	17
Fáza III. TVORBA radikálov	19
Fáza IV. ZANIK bunky	19
2 Cieľ	21
3 Metódy určenia optických konštánt pre PS - spektroskopická elipsometria	22
3.1 Polarizácia svetla	23
3.2 Elipsometrické veličiny	25
3.3 Elipsometria na jednoduchom rozhraní	28
4 Experiment	30
4.1 Príprava vzorku pre meranie	30
4.2 Spektroskopický elipsometer	31
5 Výsledky a diskusia	32
5.1 Určenie optických konštánt med'natého ftalocyanínu	32
5.2 Zrovnanie experimentálnych hodnôt optických konštánt s ab - initio výpočtami	35
6 Záver	38
Použitá literatúra	40
Zoznam príloh	44

ZOZNAM OBRÁZKOV

1.1	Schéma princípu PDT. Interakcia troch komponent - O_2 (kyslík), PS (fotosenzitizér) a svetlo, následné uvedenie PS do excitovaného stavu PS^* , tvorba ROS a zánik bunky (hore). Aplikácia PS do tela pacienta a následná interakcia so svetlom za účelom deštrukcie nádoru (dole)	14
1.2	Princíp PDT rozdelený do jednotlivých fází	16
1.3	Znázornenie energetických hladín a prenosu energie pomocou Jablonského diagramu. Prevzaté z (KADER, 2014b)	18
1.4	Zánik bunky. Prevzaté z (Cornell, 2016)	20
3.1	a) Priestorová závislosť elektrického poľa v elipticky polarizovanej vlne. b) jeho ortogonálne komponenty a ich relatívny fázový posun. c) elipsa polarizácie v pozorovacej rovine.	23
3.2	Lineárna (ružová), eliptická (modrá) a kruhová (zelená) polarizácia spolu s ich zodpovedajúcimi parametrami.	24
3.3	S - a p - polarizované vlny odrazené od opticky izotropnej vzorky.	25
3.4	Geometrický význam elipsometrických parametrov Ψ a Δ	26
3.5	Kartézske súradnicové systémy definované základnými vektormi s a p pre dopadajúce a odrazené vlny. Indexy lomu okolia a vzorky sú označené N_i a N_t , v danom poradí	28
4.1	Molekula med'natého ftalocyanínu. Prevzaté z (Wang et al., 2014)	30
4.2	Práškový med'natý ftalocyanín (vľavo) a tableta z neho vylisovaná (vpravo)	30
4.3	Schéma (zľava) a foto (zprava) elipsometra VASE (Woollam ltd.). 1 - monochromátor, 2 - optické vlákno, 3 - kompenzátor, 4 - štvor-zónový detektor, 5 - držiak vzoriek, 6 - goniometer, 7 - detektor, 8 - riadiaca jednotka.	31
5.1	Experimentálne zmerané elipsometrické parametre Ψ a Δ	32
5.2	Optické konštanty odpovedajúce experimentálne zmeraným elipsometrickým parametrom Ψ a Δ porovnanými s literatúrou (DJURIŠIĆ A.B., 2002)	33
5.3	Prepojenie absorpčného spektra s Jablonského schémou, predstavujúcou typické fotofyzikálne procesy v molekulách všeobecne. Prevzaté z (KADER, 2014b) . . .	35

5.4	Teoreticky vypočítané spektrá imaginárnej časti elektrickej permitivity ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{zz} (BIRNBAUM Tobias, 2014) a im odpovedajúca nami experimentálne určená závislosť (fialová)	36
6.1	Interdisciplinárny prístup a vybrané príspevky rôznych disciplín v PDT	38
A.1	Spektrá optických konštánt ftalocyanínu spočítaných pomocou programového prostredia Scilab. Použité boli elipsometrické parametre merané pre uhol dopadu 70° .	45

ZOZNAM TABULIEK

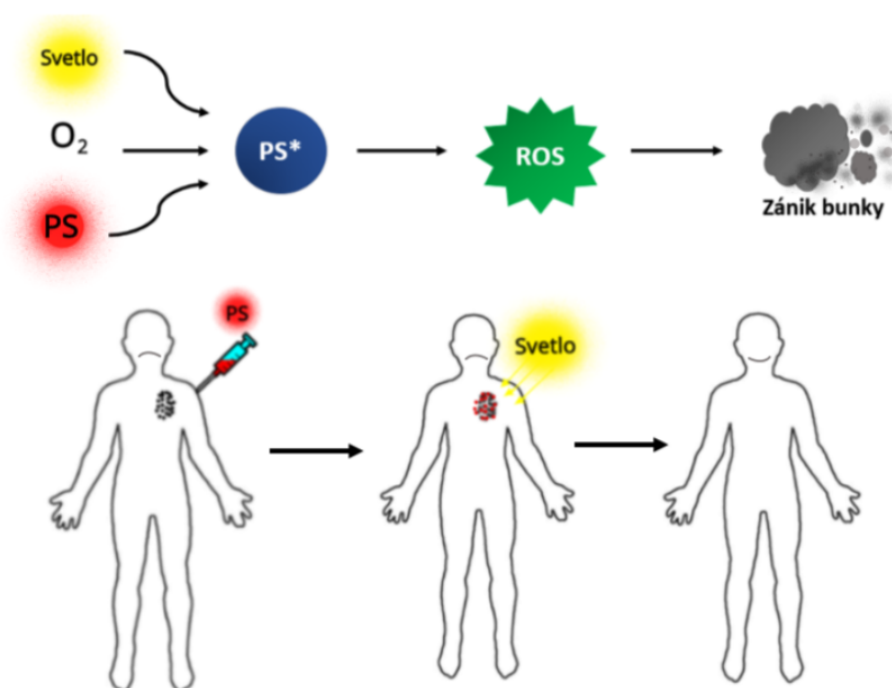
5.1	Experimentálne a teoretické hodnoty elektrónových prechodov ftalocyanínu porovnané s literatúrou (DJURIŠIĆ A.B., 2002)	34
-----	--	----

ZOZNAM SKRATIEK

ATP	Adenozíntrifosfát
Ce6	Chlorín e6
ClAlPcS	Chlor-alumínium ftalocyanín (<i>Chloro-aluminium phthalocyanine</i>)
CuPc	Med'natý ftalocyanín (<i>Copper phthalocyanine</i>)
InGaAs	Indium gálium arzenid
MPc	Ftalocyanín obsahujúci vo svojom centre určitý kov (Me, M)
NIR	Blízka infračervená oblasť elektromagnetického spektra (<i>Near infrared</i>)
PDT	Fotodynamická terapia (<i>Photodynamic Therapy</i>)
PS	Fotosenzitizér (<i>Photosensitizer</i>)
ROS	Reaktívne formy kyslíka (<i>Reactive oxygen species</i>)
UV	Ultrafialová oblasť elektromagnetického spektra (<i>Ultraviolet spectrum</i>)
VIS	Viditeľná oblasť elektromagnetického spektra (<i>Visible spectrum</i>)
ZnTSPc	Zinočatý ftalocyanítetrasulfát (<i>Zinc tetrasulfophthalocyanine</i>)

1 ÚVOD

Základom fotodynamickej terapie je fotochemická reakcia podporovaná fotosenzitizérmi (PS) pri ožarovaní svetlom pri špecifických vlnových dĺžkach (vid' Obr. 1.1). Táto fotoaktivácia v prítomnosti kyslíka vyvoláva produkciu radu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré sú cytotoxickými látkami podieľajúcimi sa na eliminácii rakovinových buniek. PS sa selektívne akumuluje v malígnych tkanivách v dôsledku fyziologických zmien v patologickom prostredí, ako je napríklad abnormálna enzymatická aktivita či zmeny pH (LOTFY TAHA, 2013a).



Obrázok 1.1: Schéma princípu PDT. Interakcia troch komponent - O₂ (kyslík), PS (fotosenzitizér) a svetlo, následné uvedenie PS do excitovaného stavu PS*, tvorba ROS a zánik bunky (hore). Aplikácia PS do tela pacienta a následná interakcia so svetlom za účelom deštrukcie nádoru (dole)

1.1 HISTÓRIA

Svetlo v kombinácii s fotosenzitizérmi bolo využívané k liečbe kožných ochorení, ako napríklad vitiligo, lupienka, krivica, rakovina kože, už v starovekých civilizáciách v Egypte, Grécku či Indii. Ako fotosenzitizéry im slúžili zmesi medu a rastliny, ako napríklad petržlen či ľubovník bodkovaný. Z týchto rastlín následne vytvorili prášok, ktorý zmiešali s medom a aplikovali ho na

postihnuté miesta na koži. Počas druhého storočia pred naším letopočtom dostala fototerapia gréckym lekárom Hippokratesom meno „helioterapia“. Sám Hippokrates odporúčal vystavovanie sa slnečnému svetlu na regeneráciu zdravia.

Od témy fototerapie sa na určitú dobu upustilo, až do roku približne 1900, kedy Arnold Rikli, švajčiarsky prírodný liečiteľ a lekár, znovu zaviedol liečivé sily slnečného svetla, ktoré boli zabudnuté na mnoho storočí. Pracoval niekoľko rokov na vývoji prírodných terapií, ktoré platia dodnes. Koncom prvej štvrtiny dvadsiateho storočia sa stala fototerapia známou v severnej Európe a v Severnej Amerike. Veľkým prispievateľom k modernej fototerapie bol dánsky lekár Niels Ryberg Finsen. Vlastnil lekársky inštitút, ku ktorému pripojil slnečnú záhradu, kde dovolil svojim pacientom opaľovať sa na slnku v snahe vyliečiť lupus vulgaris (tuberkulóza kože). Vo svojich prvých pokusoch použil prirodzené slnečné svetlo, ale čoskoro to zmenil na umelé svetelné zdroje. Neskôr za svoje činy a vynálezy dostal Nobelovu cenu.

Začiatkom 20. storočia mladý študent medicíny Oscar Raab a jeho profesor Tappier (Mníchov) pozorovali smrtiaci účinok akridinovej červeni na daný mikroorganizmus. Oscar Raab ako prvý navrhol použitie farbív ako fotosenzitizerov. Neskôr, von Tappier s použitím rôznych typov farbív skúmal účinnosti fototerapie. Najbežnejšie používané farbivá sú v dnešnej dobe ftalocyaníny, ktoré patria do druhej generácie PS¹. Ftalocyaníny vykazujú vyššiu absorpciu v rozsahu 650–800 nm a krátku akumuláciu v tkanivách. Neskôr sa Tappier v roku 1903, spolu s dermatológom Jesionom, rozhodli aplikovať fotosenzitizéry v podobe rôznych farbív spolu s bielym svetlom pri liečbe kožných ochorení ako je lupus kože a kondylomata s použitím, ako napríklad eozín, fluoresceín, natriumdichlorantracén disulfonát a Grublerova magdalénová červeň. Tieto farbivá boli väčšinou aplikované lokálne. Taktiež Tappier zistil, že pri danej terapii má veľký význam aj prítomnosť kyslíku, ktorého radikálové formy pravé ničia dane nádorové tkaniva. V 50. rokoch 20. storočia Richard Cremer zaviedol liečbu žltacky u novorodencov pomocou fototerapie. Poväčšine prípadov sa vždy jednalo o fotosenzitizéry ako látky chemicky dráždivé a toxické v určitej miere. Používali sa farbivá, ako napríklad eozín, fluoresceín a Grublerova červeň. Až od roku 1993 sa začali používať fotosenzitizéry, ktoré mali lepšie fotodynamické a farmakokinetické účinky.

V roku 2007 Kolarova so svojím tímom, vypracovali štúdiu s použitím chlór-hliníkových ftalocyanínov „ClAlPcS“ spolu s polovodičovým laserom. Ukázalo sa, že tento postup má letálny (smrtiaci) účinok na bunky melanómu. V roku 2010 Robertson a jeho tím, dospel k záveru,

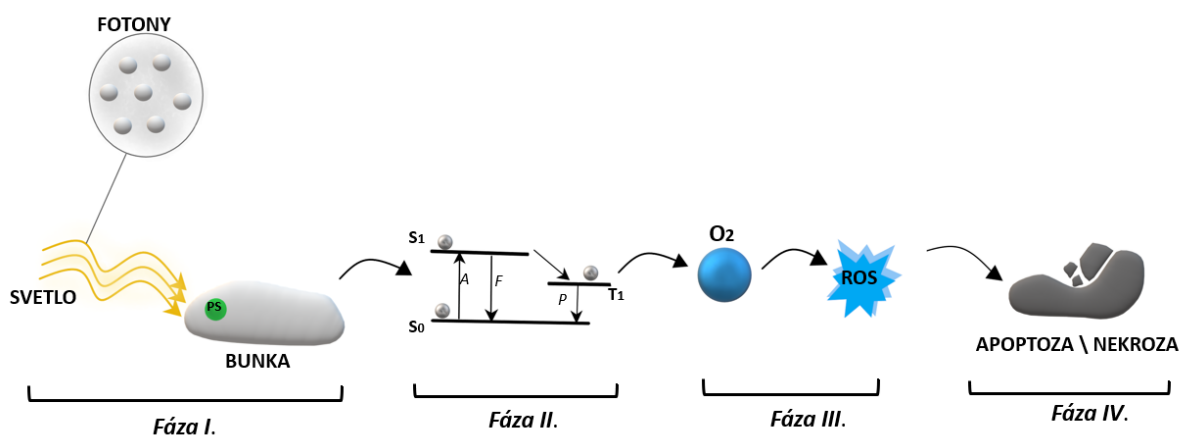
¹ Do prvej generácie zaradujeme napríklad hematoporfyríny či endogénne PS a do tretej Chlorín Ce6.

že nový „metaloftalokyanínový,, fotosenzitizér „MPC“ v kombinácii s laserom, dosiahol lepší výsledok a deštrukciu v malígnom melanome a mal ideálne charakteristiky pre fotosenzitizér. V roku 2011 Maduray vykonal in vitro štúdium na rôznych bunkách s cieľom preskúmať možné cytotoxické účinky vo vode rozpustných fotosenzibilizačných tetrasulfoftalokyanínov zinku „ZnTSPc“. Dospelo sa k záveru, že keď sa ZnTSPc používa v nízkych koncentráciách a je aktivovaný správnou dávkou svetla, vedie to k smrti buniek melanomu a zdravé tkanivá sú pred takýmto poškodením ochránené. Mnoho PS majú rôzne široké využitie, ktoré sa v priebehu rokov skúma a uskutočňujú sa rozličné štúdiá s cieľom preskúmať nové klinické aplikácie (KADER, 2014a).

1.2 Jednotlivé fázy fotodynamickej terapie

Po aplikácii PS pacientovi niekoľkými spôsobmi, ako napríklad intravenóznym alebo topickým spôsobom (na povrch tela, alebo do telesných dutín) , sa látka dostáva do cieľového tkaniva priamo alebo prostredníctvom krvného transportu, kde sa následne hromadí v cievach a nádorových bunkách (Obr. 1.1 (dole)) (KADER, 2014b).

Väčšina fotosenzitizérov je hydrofóbná a tvorí agregáty v biologickom prostredí, čo sťažuje intravenózne podávanie a znižuje tým účinnosť PDT. Na prekonanie tohto problému agregácie sú PS všeobecne formulované v rôznych koloidných systémoch (lipozómy, micely a biologicky odbúrateľné nanočastice), alebo konjugované s hydrofilnými polymérmí (LOTFY TAHA, 2013b).



Obrázok 1.2: Princíp PDT rozdelený do jednotlivých fází

Ako je vidieť na Obr. 1.2, samotná terapia ma niekoľko fáz, ktoré sú potrebné na to, aby bola PDT úspešná a došlo k usmrteniu nádorových buniek.

- Fáza I. ABSORPCIA svetla v molekule fotosenzitizéru
- Fáza II. PRENOS energie singlet-triplet
- Fáza III. TVORBA kyslíkových radikálov
- Fáza IV. ZÁNIK bunky

Fáza I. ABSORPCIA

Medzi komponenty podieľajúce sa na PDT zahrňujeme svetlo, kyslík a samotný fotosenzitizér, čím je chemicky čistá látka. Správna voľba svetla, vlnová dĺžka žiarenia či intenzita svetla sa radia medzi primárne vlastnosti pre úspešnú liečbu PDT, preto musí samotné svetlo vykazovať vhodné spektrálne vlastnosti.

Ukazuje sa, že väčšina tkanív nadobúda maximálnu penetračnú hĺbku (3-8 mm) v spektrálnej oblasti 620-800 nm tzv. terapeutické okno. Je teda prirodzené, že na PS požadujeme v oblasti terapeutického okna silnú absorpciu, aby sa vytvorilo dostatočné množstvo ROS na vytvorenie cytotoxického, alebo inak nazvaného smrtiaceho, účinku pre nežiadúce nádorové bunky v tele pacienta. Práve táto penetrácia kože, je jedným z ďalších kritických parametrov na posúdenie účinnosti PDT. Závisí od niekoľkých dejov vrátane odrazu, rozptylu, prenosu, absorpcie alebo ich kombinácie. Pri správnej penetrácii svetla a jeho stretnutí s PS vo vnútri tela dochádza k samotnému predaniu energie z fotónu na molekulu PS. Tým nastáva excitácia elektrónu na vyššiu energetickú hladinu a PDT prechádza do nasledujúcej fázy prenosu energie.

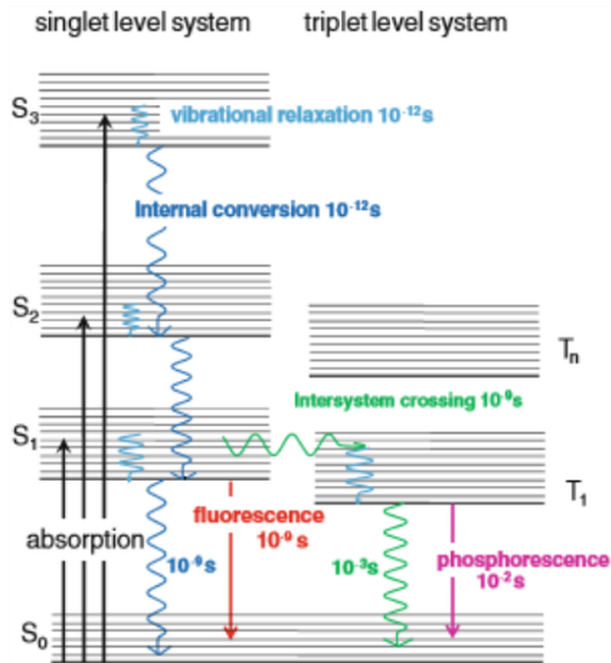
Predpoklad pre ideálny PS nespočíva len v jeho optických vlastnostiach, ktoré sme vyššie zmienujeme, ale je podstatné, aby spĺňal mnoho ďalších kritérií, ako napr. chemickú čistotu, selektivitu pre maligné bunky, chemickú či fyzikálnu stabilitu, silnú fotocytotoxicitu a rýchly klírens² z tela pacienta bez vyvolania fotocitlivosti kože (KADER, 2014b).

Fáza II. PRENOS energie

Na ozrejmienie prenosu energie je možné poukázať na Jablonského diagram (Obr. 1.3), kde po prijatí energie z fotónu na molekulu PS dochádza k excitácii jeho elektrónu zo základného stavu S_0 . V tomto stave sú všetky elektróny spárované a celkový spin je nula. K samotnej excitácii

² Fyzikálna veličina určujúca objem krvnej plazmy očistenej od určitej látky za jednotku času

dochádza po ožiarení postihnutej časti tela svetlom s určitou vlnovou dĺžkou. Práve tu sa stretávame s dvoma energetickými rebríkmi, nazývanými singletový a tripletový systém (KADER, 2014b).



Obrázok 1.3: Znázornenie energetických hladín a prenosu energie pomocou Jablonského diagramu.

Prevzaté z (KADER, 2014b)

Foto-excitovaná molekula ftalocyanínu v stave S_1 sa môže vrátiť do základného stavu S_0 rôznymi cestami. Niektoré molekuly emitujú svetlo s podstate rovnakou, ale mierne nižšou energiou v porovnaní s absorbovaným svetlom (tj. svetlo s mierne vyššou vlnovou dĺžkou), čo vedie k fluorescencii. Naopak niektoré molekuly prevádzajú získanú energiu na teplo a prenášajú energiu do susedných molekúl, napríklad do rozpúšťadla (ISAGO, 2015).

PS excitovaný na hladinu S_1 sa môže alternatívne previesť do excitovaného stavu tripletu (T_1) krížením medzi systémami (Inter-crossing). Stav S_1 je pomerne krátky, s typickými hodnotami pre životnosť singletového stavu v nanosekundách (viď Obr. 1.3), zatiaľ čo životnosť tripletového stavu je v rozsahu mikrosekúnd až milisekúnd. Vo všeobecnosti je teda stav T_1 výrazne dlhší ako stav S_1 , čo je podstatne dôležité pre to, aby sa stretol s kyslíkom, ktorý je pre ďalší krok v účinnej PDT liečbe nevyhnutný. Pokiaľ by nedošlo k predaniu energie kyslíku, PS by sa mohol z T_1 vrátiť do stavu S_0 emitovaním fosforescencie (Lau, 2013, KADER, 2014b).

Fáza III. TVORBA radikálov

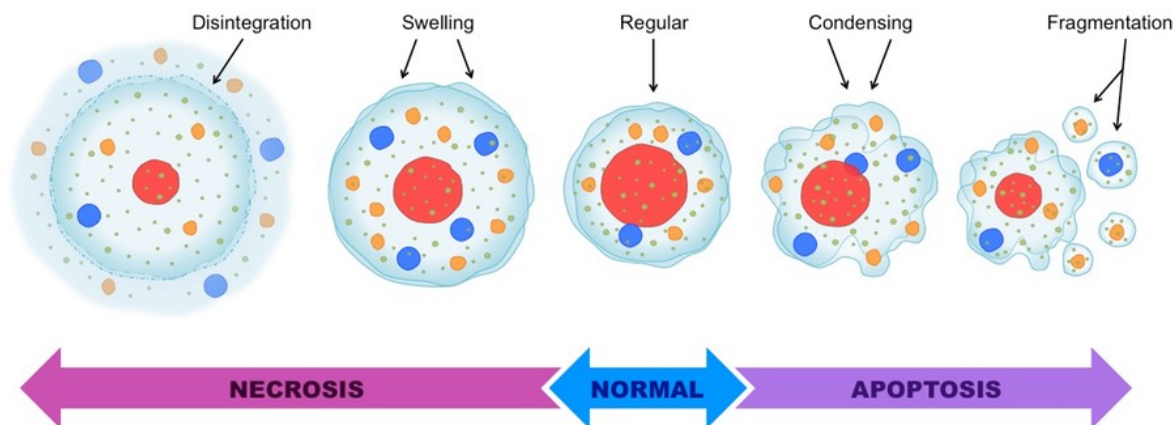
Mnoho štúdií uskutočňovaných in vitro a in vivo ukázali, že nedostatok kyslíka znižuje o dost' účinnosť PDT. Bolo navrhnutých mnoho techník, ktoré sa zaoberali depléciou, alebo teda vyčerpaním tkanivového kyslíka počas PDT, ako napr. frakcionované ožiarenie svetlom alebo zníženie rýchlosti toku kyslíka. Ich princíp spočíval v podporovaní opakovaného prietoku kyslíka v tkanivách, a tým kompenzovať jeho stratu spôsobenú fotochemickou reakciou. U pacientov, testujúcich dané techniky bolo vidieť účinnejšie deštrukcie nádorov.

Na to, aby však bol samotný kyslík prínosný pre PDT, je potrebné, aby sa stretol s excitovaným elektrónom PS v tripletovom stave. Triplet PS, potom pri stretnutí s kyslíkom, môže preniesť svoju energiu priamo na tento molekulárny kyslík, čím sa vytvorí singletový kyslík v excitovanom stave, alebo prípadne môže vykonať prenos elektrónov na molekulárny kyslík a vytvoriť radikál superoxidového aniónu. V každom prípade tu vznikajú tzv. ROS- reaktívne formy kyslíka, ktoré napádajú nádorovú bunku a spôsobujú jej rozpad a zánik (KADER, 2014b).

1.2.1 Fáza IV. ZÁNÍK bunky

Množstvo a rozsah poškodenia vplyvom ROS sú ovplyvňované fyziologickými parametrami bunky, či už ide o množstvo Ca^{2+} , genetickú či molekulárnu odpoveď, alebo interakciu s bunkovým prostredím. Rozhodnutie medzi apoptózou či nekrotózou u nádorovej bunky sa zakladá okrem iného aj na intracelulárnom zásobovaní energiou.

Apoptóza je proces, ktorý spotrebúva energiu závislosti na ATP alebo alternatívnych zdrojoch energie a jedná sa o tzv. plánovanú (naprogramovanú) smrť bunky. (KADER, 2014b) Bunka v tomto procese zmenší svoj objem, čím dôjde k postupnému rozkladu proteínov a zložiek, ktoré tvoria jej stavebnú zložku. Pri tomto type bunečnej smrti nevznikajú antigenné látky, a tým nedochádza k "dráždeniu" imunitnej odpovedi a vzniku nežiadúcich zápalových reakcií (Linhart, 2012).



Obrázok 1.4: Zánik bunky. Prevzaté z (Cornell, 2016)

Naproti tomu nekróza je podporovaná nízkou úrovňou bunkovej energie (KADER, 2014b). Pri tomto procese bunka zväčší svoj objem, čím dôjde k narušeniu bunkovej membrány a vyliatím obsahu bunky do okolitého prostredia. Na tento dej reaguje samotný imunitný systém vyvolaním zápalových procesov, čo vedie k poškodeniu okolitých buniek a zápal sa zväčšuje (Linhart, 2012).

2 CIEĽ

V rámci tejto práce sa budeme zameriavať na fotosenzitizéry, predovšetkým na med'natý ftalocyanín a jeho optické konštanty, ktoré, ako sme ukázali v úvode, majú zásadný vplyv na správnu funkciu PS. Pomocou teoretických a experimentálnych metód sa dajú určiť pre viditeľnú a blízku infračervenú oblasť spektra.

Naším cieľom je experimentálne určenie optických konštánt s využitím spektroskopickkej elipsometrie a následné posúdenie presnosti a správnosti zvolenej metódy. Porovnávanie hodnôt indexu lomu a extinkčného koeficientu, získaných teoreticky, s našimi experimentálnymi hodnotami, ďalej umožnia posúdenie správnosti vyvíjajúcich sa ab-initio teoretických metód.

3 METÓDY URČENIA OPTICKÝCH KONŠTÁNT PRE PS - SPEKTROSKOPICKÁ ELIPSOMETRIA

Znalosť optických konštánt organických pigmentov je dôležitá z mnoho hľadísk, a to nielen pre túto študovanú aplikáciu v oblasti fotodynamickej terapie. Spektrálna závislosť komplexného indexu lomu $n-ik$, kde n je index lomu a k extinkčný koeficient, pigmentových častíc spolu s ich veľkosťou určujú výslednú farbu pigmentov. Samotná veľkosť pigmentových častíc sa najviac veľakrát meria nepriamou metódou dynamického rozptylu svetla, kde je jedným z nutných parametrov index lomu častice určený pre vlnovú dĺžku exitačného žiarenia (väčšinou sa používa He-Ne laser, $\lambda = 650nm$). Je preto prirodzené, že sa metóde merania optických konštánt pigmentov venovala v minulosti značná pozornosť. Boli vyvinuté metódy využívajúce intenzitu svetla, prípadne jeho polarizačný stav alebo energetické straty nízkoenergetického elektrónového zväzku. Študované vzorky boli v týchto prípadoch pripravené vo forme pigmentového prášku, zlisovanej tablety, ablovanej vrstvy alebo kvapalnej suspenzie (G. F. e. all, 2004, Heuer et al., 2011, Liu et al., 2004, N. I. e. all, 2007, Musfeldt et al., 1993a).

V tejto kapitole predstavujeme originálne využitie spektroskopickkej elipsometrie, ktorá meria súčasne zmenu amplitúdy a fázy odrazenej svetelnej vlny, teda zmenu polarizačného stavu odrazeného svetla, pre určenie spektrálnej závislosti optických konštánt tabliet lisovaných z vybraných práškov organických pigmentov v spektrálnom obore DUV-VIS-NIR.

Historicky prvý vedec, ktorý v roku 1669 študoval dvojité refrakcie svetla v kryštáli islandského lúča, bol Erasmus Bartholinus. Odvtedy, v priebehu troch storočí, mnohí veľkí vedci prispeli k opisu, pochopeniu a aplikácii svetelnej polarizácie.

Koncom 19. storočia Paul Drude podrobne študoval zmenu polarizácie odrazu svetla od povrchu vzorky a jeho koreláciu s optickými vlastnosťami vzorky. Technika bola neskôr pomenovaná ako elipsometria, pretože eliptická polarizácia je najobecnejšia polarizácia svetla. Drude tiež znovu odvodil Fresnelove vzorce z Maxwellových rovníc, a tým položil základ pre elipsometriu. V súčasnosti je elipsometria vysoko presný nástroj na charakterizáciu povrchu, ktorý sa rutinne používa na stanovenie objemových, jednovrstvových a viacvrstvových optických a štruktúrnych parametrov.

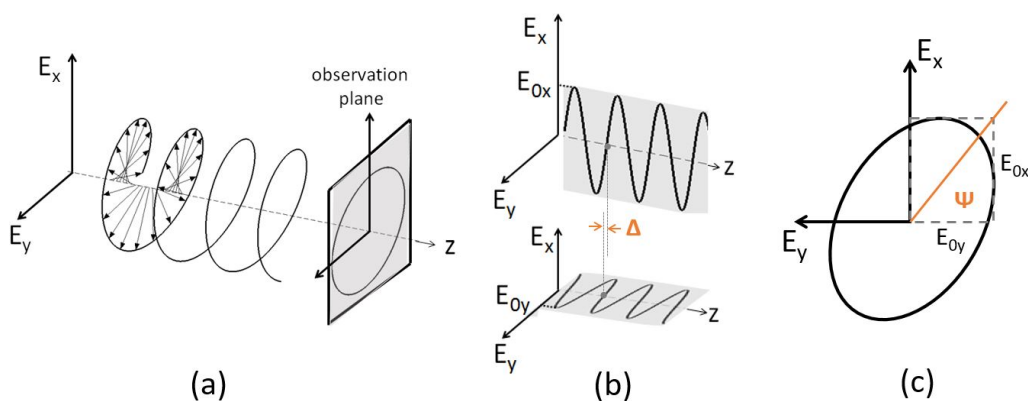
3.1 Polarizácia svetla

V rámci elektromagnetickej teórie, môže byť svetlo opísané pomocou priečných elektromagnetických vln. Priestorové závislosti elektrického a magnetického poľa, priečných vektorov, ktoré sú kolmé na smer šírenia, priamo súvisia so zavedením pojmu polarizácie svetla. Bolo vyvinutých niekoľko postupov k popisu rôznych polarizačných stavov polarizácie. Tu stručne predstavíme základné myšlienky, ktoré budú neskôr užitočné v experimentálnej časti.

K jednoduchšiemu formalizmu prispieva predpoklad, že sa pozdĺž osi z šíri monochromatická vlna. Vo väčšine prípadov volíme elektrické pole elektromagnetickej vlny, na to, aby reprezentovalo správanie svetla. Hlavným dôvodom je to, že vektor magnetického poľa je vždy možné vypočítať z elektrického poľa pomocou Maxwellových rovníc, a taktiež v optických frekvenciách, keď sa skúma svetelná interakcia s látkou, magnetické pole zohráva menej dôležitú úlohu ako samotné elektrické pole. S výnimkou nepolarizovaného svetla je najbežnejším prípadom priestorovej závislosti vektora elektrického poľa schéma znázornená na obrázku 3.1. V rovine, ktorá je kolmá na os z (nazývaná pozorovacia rovina), koncový bod vektora elektrického poľa opisuje elipsu pri šírení vlny, preto túto elektromagneticкую vlnu nazývame elipticky polarizovanou. Pre pevný bod na osi z (umiestnenie pozorovacej roviny), je možné si predstaviť časovú závislosť vektora elektrického poľa $E(t)$ ako superpozíciu ortogonálnych elektrických vibrácií $E_x(t)$ a $E_y(t)$,

$$E_x(t) = E_{0x} e^{i(\omega t - kz + \delta_x)} \quad (1)$$

$$E_y(t) = E_{0y} e^{i(\omega t - kz + \delta_y)} \quad (2)$$



Obrázok 3.1: a) Priestorová závislosť elektrického poľa v elipticky polarizovanej vlně. b) jeho ortogonálne komponenty a ich relatívny fázový posun. c) elipsa polarizácie v pozorovacej rovine.

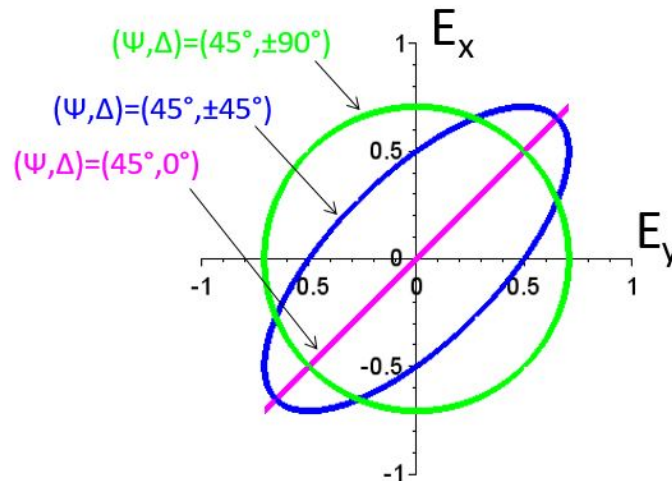
ktoré sú vzájomne posunuté o fázu $\delta = \delta_y - \delta_x$ s amplitúdou E_{0x} a E_{0y} (viď Obr. 3.1 b,c). Tu ω je vlnová frekvencia a k je vlnové číslo rovinnej vlny. Absolútne fázy zložiek x a y sú označené jednotlivo δ_x a δ_y . Ako bude možné ďalej vidieť, v pozorovanej rovine je možné rovnice (1) a (2) reorganizovať podľa rovnice elipsy.

$$\left(\frac{E_x}{E_{0x}}\right)^2 + \left(\frac{E_y}{E_{0y}}\right)^2 - 2\frac{\cos \delta}{E_{0x}E_{0y}}E_xE_y = \sin^2 \delta \quad (3)$$

V elipsometrii a magnetooptike je dôležitý tvar a orientácia (vzhľadom na systém súradníc) polarizačnej elipsy, preto intenzita svetla,

$$I = \frac{1}{2}c\epsilon(E_{0x}^2 + E_{0y}^2),$$

ktorá súvisí s veľkosťou danej elipsy, je obvykle normalizovaná na jednotku. Potom postačujú iba dva reálne parametre k jednoznačnej identifikácii stavu polarizácie (napr. relatívny fázový posun a pomer amplitúd). Lineárne a kruhové polarizácie sú špeciálnymi prípadmi všeobecného eliptického polarizovaného stavu. Tieto typy polarizácie svetla sú znázornené na obrázku 3.2.



Obrázok 3.2: Lineárna (ružová), eliptická (modrá) a kruhová (zelená) polarizácia spolu s ich zodpovedajúcimi parametrami.

Pretože všetky užitočné informácie o stave polarizácie spočívajú v jej amplitúdach a fázach, je adekvátne ich kombinovať do jednej veličiny a to tzv. komplexnej amplitúdy. V našom prípade potom získame dve zložky

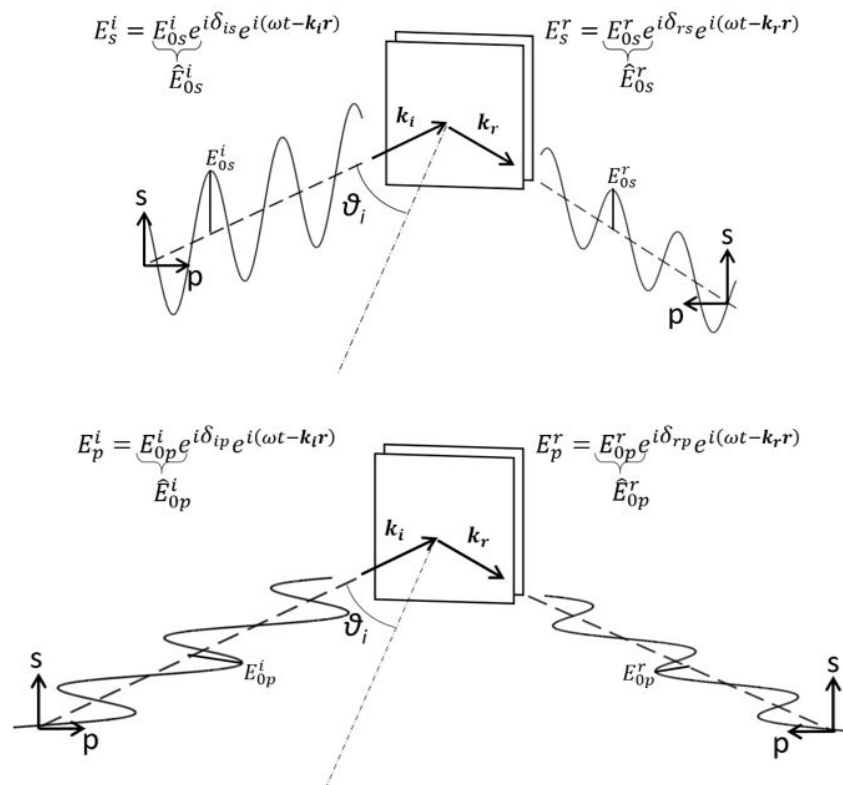
$$\hat{E}_x(z, t) = E_{0x} e^{i\delta_x} \quad (4)$$

$$\hat{E}_y(z, t) = E_{0y} e^{i\delta_y} \quad (5)$$

Akakoľvek zmena polarizácie je následne vyjadrená výlučne týmito komplexnými amplitúdami vlny.

3.2 Elipsometrické veličiny

Elipsometria meria zmenu polarizácie svetla spôsobenú jeho odrazom od povrchu vzorky. Táto zmena je podľa definície vyjadrená pomerom koeficientov odrazu. Pri šikmom dopade rozlišujeme medzi koeficientmi odrazu r_s a r_p pre s - a p -vlny. S -vlna je lineárne polarizovaná s vektorom elektrického poľa E kolmom na rovinu dopadu, zatiaľ čo p -vlna je lineárne polarizovaná s vektorom E rovnobežným s rovinou dopadu.



Obrázok 3.3: S - a p - polarizované vlny odrazené od opticky izotropnej vzorky.

Keď sa s - a p -vlny odrazia od opticky izotropnej vzorky, zostanú s - a p -vlny osobitne polarizované, ale ich amplitúda a fáza sa menia v dôsledku svetelnej interakcie so vzorkou (Obr. 3.3).

Tieto zmeny sú vyjadrené pomocou koeficientami odrazu, ktoré sú definované komplexnými amplitúdami odrazených a dopadajúcich vln v rovnakom bode na povrchu danej vzorky:

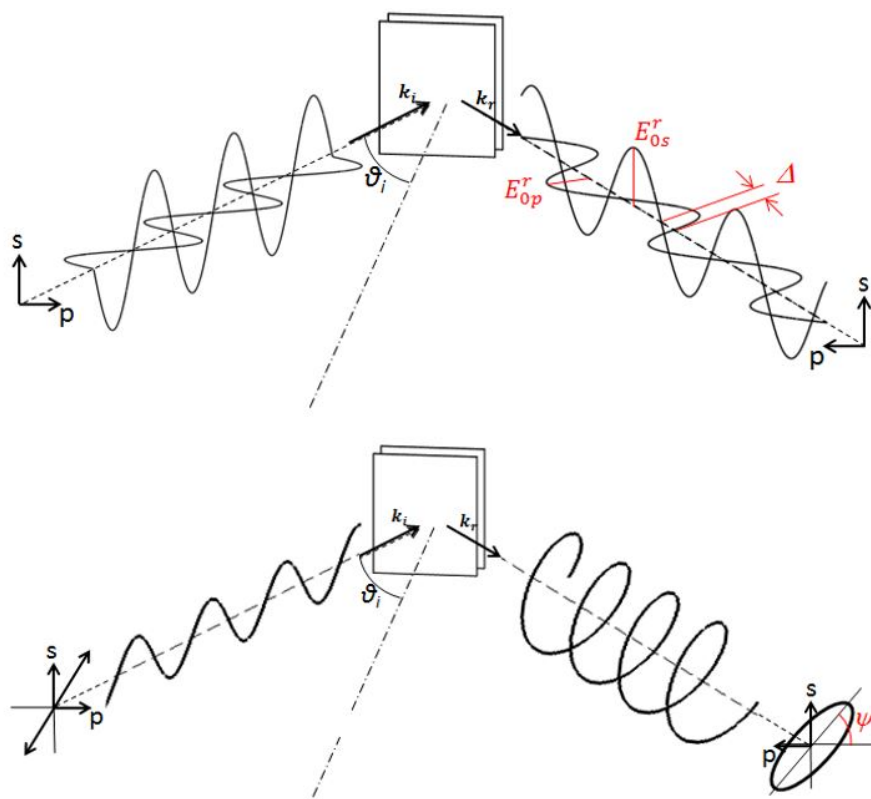
$$r_p = \frac{\hat{E}_p^r}{\hat{E}_p^i} = \frac{E_{0p}^r e^{i\delta_p^r}}{E_{0p}^i e^{i\delta_p^i}} \quad (6)$$

$$r_s = \frac{\hat{E}_s^r}{\hat{E}_s^i} = \frac{E_{0s}^r e^{i\delta_s^r}}{E_{0s}^i e^{i\delta_s^i}} \quad (7)$$

Ako je uvedené vyššie, elipsometria meria pomer koeficientov odrazu r_p a r_s . Tento komplexný pomer možno vyjadriť aj ako

$$\frac{r_p}{r_s} \equiv \tan \Psi e^{i\Delta}, \quad (8)$$

kde sú definované elipsometrické parametre Ψ a Δ .



Obrázok 3.4: Geometrický význam elipsometrických parametrov Ψ a Δ .

Geometrický význam elipsometrických uhlov je vhodné prediskutovať. Musíme zvážiť dopadajúce svetlo s rovnakými zložkami s - a p - vln, ktoré sú vo fáze. Inými slovami, dopadajúce svetlo je lineárne polarizované s vektorom elektrického poľa E oscilujúceho v smere $\pm 45^\circ$ mimo roviny dopadu (Obr. 3.4). Keď sa svetlo odrazí od povrchu vzorky, s - a p - komponenty podstúpia zmeny vo svojich amplitúdach a fázach a výsledkom je, že odrazená vlna sa všeobecne polarizuje elipticky.

V tomto prípade dostaneme

$$\tan \Psi = \frac{E_{0p}^r}{E_{0s}^r} \quad (9)$$

$$\Delta = \delta_p^r - \delta_s^r \quad (10)$$

pretože

$$\frac{r_p}{r_s} = \frac{\frac{E_{0p}^r e^{i\delta_p^r}}{E_{0p}^i e^{i\delta_p^i}}}{\frac{E_{0s}^r e^{i\delta_s^r}}{E_{0s}^i e^{i\delta_s^i}}} = \frac{E_{0p}^r}{E_{0s}^r} e^{i(\delta_p^r - \delta_s^r)} = \tan \Psi e^{i\Delta}, \quad (11)$$

kde sme použili rovnicu (8).

V súlade s tým rovnica (11) určuje relatívne zmeny v amplitúdach a fázach s - a p - vln pri ich odrazoch od povrchu vzorky. Stojí za zmienku, že fázovú zmenu odrazenej s - alebo p -vlny je vo všeobecnosti ťažké merať samostatne, ale jej relatívna zmena $\delta_s - \delta_p$ je merateľná, ak sa v elipsometrii zvažujú polarizačné merania. Preto elipsometria patrí do skupiny fázovo citlivých techník, ktoré sú citlivé na vlastnosti povrchu. Na druhej strane, fotometrické merania, ako napríklad meranie odraznosti, (ktoré sa zvyčajne jednoduchšie vykonáva), majú prístup len k absolútnej hodnote koeficientu odrazu, ako je

$$R_{s,p} = |r_{s,p}|^2, \quad (12)$$

ale nemôžeme zmerať jeho fázu. Pre rôzne vzorky sa dané reflexné koeficienty môžu teoreticky vypočítať, vrátane napríklad objemových, jednovrstvových, viacvrstvových vzoriek, lineárnych mriežok alebo fotonických kryštálov. Je zrejmé, že koeficienty odrazu ovplyvňuje samotná vnútorná štruktúra vzorky do hĺbky, ktorú svetlo dosahuje prienikom pod jej povrch, a taktiež optické vlastnosti materiálov, ktoré sa podieľajú na danej interakcii. Preto experimentálne stanovené elipsometrické parametre môžu poskytovať informácie o geometrii vzorky a jej

optických konštantách v danom spektrálnom rozsahu. V skutočnosti je toto všeobecne cieľ charakterizácie samotnej elipsometrie.

3.3 Elipsometria na jednoduchom rozhraní

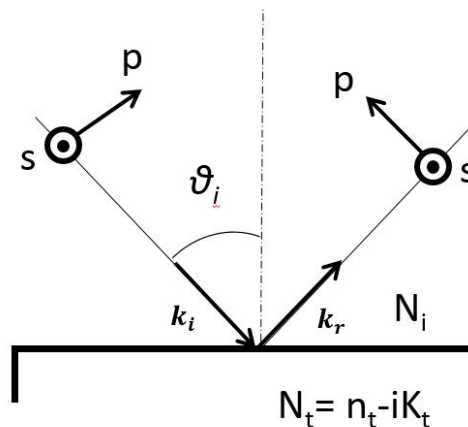
Výraz jednoduché rozhranie sa v tomto prípade používa pre ostré a rovinné rozhranie medzi dvoma homogénnymi médiami s rôznymi indexmi lomu. Pri vykonávaní optického experimentu, je obvykle okolitým médium (s dopadajúcimi a odrazenými lúčmi) vzduch a druhým médium je vzorka, ktorá sa skúma. Povrch vzorky je potom identický so samotným rozhraním, ako je znázornené na obrázku 3.5. V reálnych podmienkach ,takýto povrch vzorky, nie je nikdy dokonale ostrý a rovinný, ale často ho možno aproximovať pomocou jediného rozhrania.

Koeficienty odrazu pre jednoduché rozhranie sú dané dobre známymi Fresnelovými vzťahmi, ktoré je možné odvodiť pomocou Maxwellových rovníc. V prvom kroku sa vyhl'adáva riešenie vlnovej rovnice u oboch médiách, akoby boli nekonečné.. Následným použitím okrajových podmienok kontinuity tangenciálnych zložiek elektrických a magnetických polí na rozhraní sa získajú požadované riešenia. Pre polarizáciu *s*- a *p* vln je teda koeficient odrazu r_s a r_p získaný vo Fresnelových vzťahoch daný ako:

$$r_s = \frac{N_i \cos \theta_i - N_t \cos \theta_t}{N_i \cos \theta_i + N_t \cos \theta_t} \quad (13)$$

$$r_p = \frac{N_t \cos \theta_i - N_i \cos \theta_t}{N_t \cos \theta_i + N_i \cos \theta_t} \quad (14)$$

kde N_i a N_t sú príslušné komplexné indexy lomu okolia a vzorky.



Obrázok 3.5: Kartézské súradnicové systémy definované základnými vektormi *s* a *p* pre dopadajúce a odrazené vlny. Indexy lomu okolia a vzorky sú označené N_i a N_t , v danom poradí

Uhly dopadu a lomu, ktoré súvisia so Snellovým zákonom, sú označené θ_i a θ_t . Pri odvodzovaní Fresnelových rovníc (14) by sa malo postupovať opatrne vzhľadom na súradnicový systém, ktorý si vyberieme. V skutočnosti môže tento výber ovplyvniť znak koeficientu r_p . Ako môžeme vidieť na Obr. 3.5, smer vektorov dopadajúcej a odrazenej s -vlny sa v prípade kolmého dopadu vzájomne zhoduje, zatiaľ čo u p -vlny je orientácia vektorov opačná.

Z elipsometrických parametrov Ψ a Δ môžeme priamo vypočítať optické konštanty n (reálna časť indexu lomu) a k (extinkčný koeficient) ľubovoľnej vzorky pomocou nasledujúceho dôležitého vzťahu

$$n - ik = \sqrt{\sin^2 \theta_i \left(1 + \tan^2 \theta_i \left(\frac{1 - \rho}{1 + \rho} \right)^2 \right)}, \quad (15)$$

kde

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \Psi e^{i\Delta}, \quad (16)$$

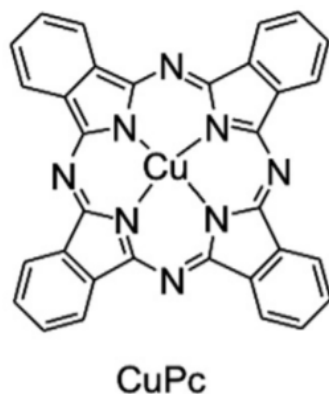
(Mistrík, 2019, strany 435–464).

Rovnica (15) je kľúčová pre určenie optických konštánt nami študovaného CuPc, ako uvidíme v nasledujúcich kapitolách.

4 EXPERIMENT

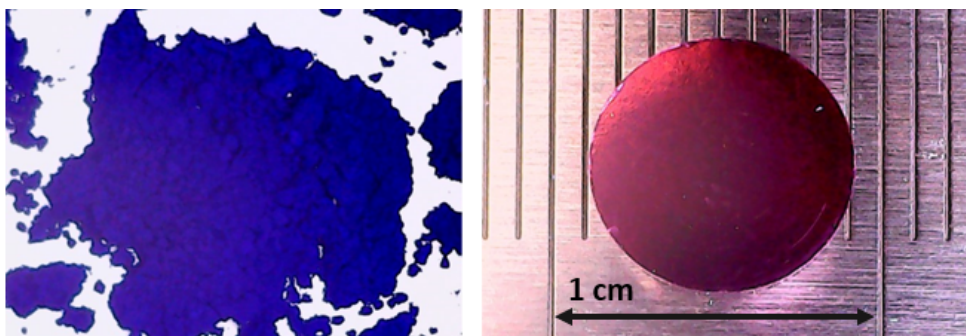
4.1 Príprava vzorku pre meranie

Vzorka práškoveho organického pigmentu- meďnatého ftalocyanínu, ktorého molekula je zobrazená na Obr. 4.1, bola pomocou ručného hydraulického lisu zlisovaná do tablety s priemerom cca 8 mm a hrúbkou 4 mm (viď Obr. 4.2 (vpravo)).



Obrázok 4.1: Molekula meďnatého ftalocyanínu. Prevzaté z (Wang et al., 2014)

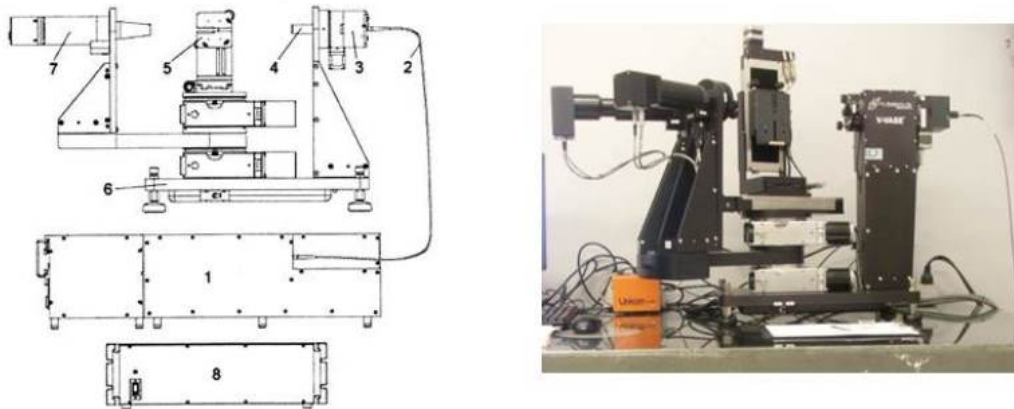
Lisovanie bolo uskutočnené pomocou ocelových matric a raznice, ktorej lisovacia plocha musela byť čo najhladšia, kvôli tomu, aby povrch tablety vykazoval kvalitu blízku kvalite optickej. Inými slovami, aby odraz svetla nebol difúzny, ale spekulárny, čo má svoj význam pre vyhodnocovanie elipsomterických spektier. Proces lisovania prebehol postupne s maximálnym tlakom 6 MPa.



Obrázok 4.2: Práškový meďnatý ftalocyanín (vľavo) a tableta z neho vylisovaná (vpravo)

4.2 Spektroskopický elipsometer

Spektroskopický elipsometer je určený na meranie zmeny polarizačného stavu svetla, ktorá nastáva pri jeho interakcii so vzorkou a pre následné určenie jeho optických vlastností, tak ako je opísané v kapitole 3.



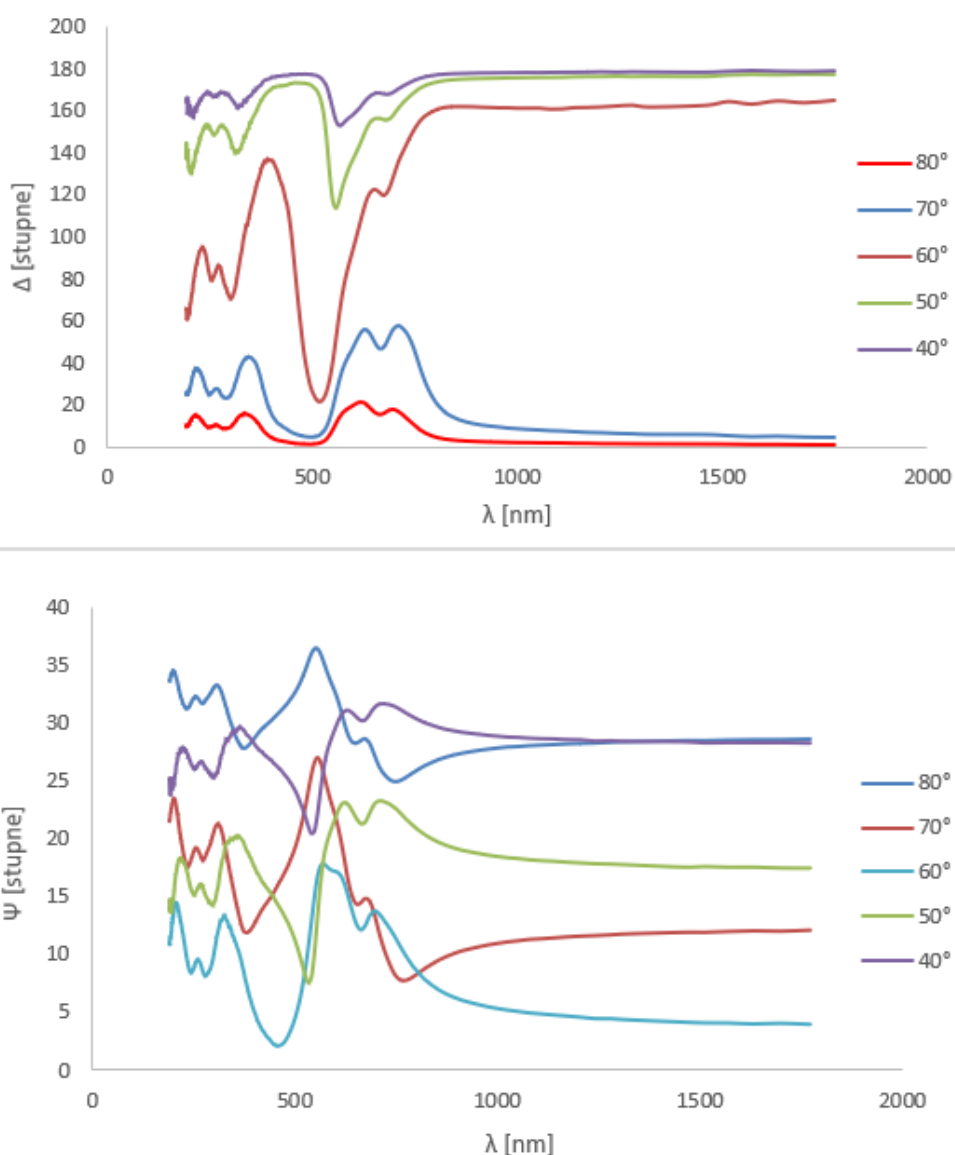
Obrázok 4.3: Schéma (zľava) a foto (zprava) elipsometra VASE (Woollam Ltd.). 1 - monochromátor, 2 - optické vlákno, 3 - kompenzátor, 4 - štvor-zónový detektor, 5 - držiak vzoriek, 6 - goniometer, 7 - detektor, 8 - riadiaca jednotka.

V našom prípade sme pracovali s elipsometrom VASE (Woollam Ltd.) zobrazeného na Obr. 4.3. Zdrojom svetla je Xenónová výbojka, z ktorej vychádza polychromatické svetlo sústredené na vstupnú štrbinu monochromátora. Spektrálne rozložený zväzok je naviazaný do optického vlákna a následne navedený do vstupnej jednotky, ktorá obsahuje kompenzátor a polarizátor. Práve pomocou týchto elipsometrických komponent môžeme nastaviť požadovaný polarizačný stav svetla zaostrého na skúmanú vzorku. Do detekčnej jednotky, ktorá zahŕňa rotujúci polarizátor a detektor, vstupuje odrazený zväzok. Aby elipsometer vyhovel širokému spektrálnemu oboru, je vybavený troma detektormi, a to fotonásobičom (pre UV oblasť), Si-diódou (pre VIS oblasť) a InGaAs detektorom (pre NIR oblasť). Na uchytenie vzorky slúži vertikálny stolček, ktorý je umiestnený na priamo motorizovanom goniometre. Ovládanie elipsometra so zhromažďovaním dát je plnoautomatizované. Pre vyhodnotenie nameraných závislostí je k dispozícii komerčný software WVASE32.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

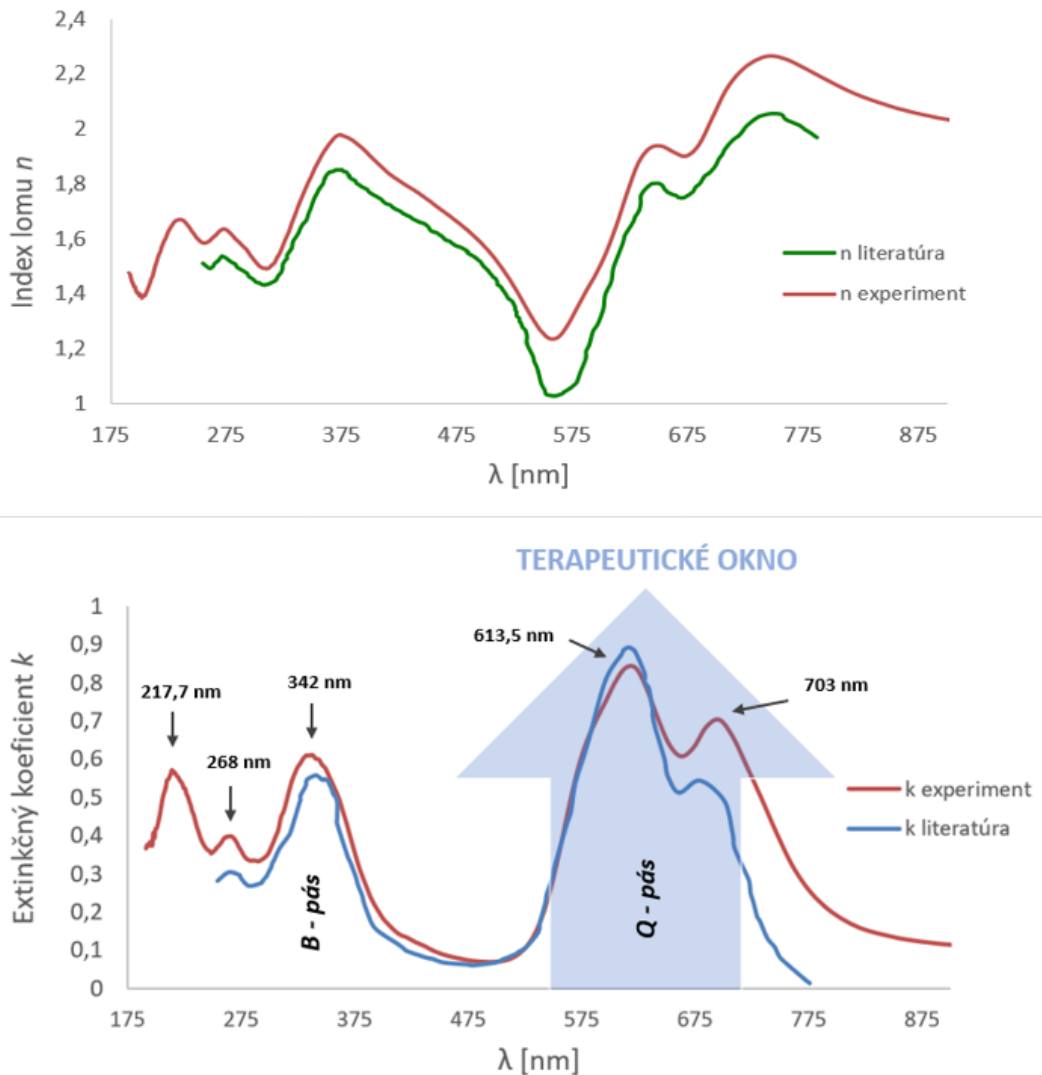
5.1 Určenie optických konštánt med'natého ftalocyanínu

Zmerané spektrálne závislosti elipsometrických parametrov Ψ a Δ sú pre všetky uhly dopadu vynesené v Obr. 5.1. Vzhľadom k tomu, že zlisované tablety sú dostatočne hrubé, inými slovami, ku zmene polarizácie dochádza iba na povrchu tablety, môžeme vplyv odrazu na spodnom rozhraní zanedbať a pre výpočet komplexného indexu lomu ($n-ik$) použiť známy analytický vzťah, ktorý je odvodený vyššie (viď rovnica (15)).



Obrázok 5.1: Experimentálne zmerané elipsometrické parametre Ψ a Δ

Index lomu a extinkčný koeficient ftalocyanínu, uvedený na Obr. 5.2, sú vypočítané zo spektier elipsometrických parametrov nameraných pre uhol dopadu 70° . K samotnému výpočtu bol využitý komerčný software WVASE, a taktiež program vypracovaný v Scilabe (viď príloha A). Spektrálne závislosti indexu lomu n a extinkčného koeficientu k , pre ostatné uhly dopadu, sú v rámci experimentálnej chyby merania zhodne, čo je v súlade s uvažovanou aproximáciou jednoduchého rozhrania.



Obrázok 5.2: Optické konštanty odpovedajúce experimentálne zmeraným elipsometrickým parametrom Ψ a Δ porovnanými s literatúrou (DJURIŠIĆ A.B., 2002)

Spektrá optických konštánt boli parametrizované sadou šiestich Lorentzových oscilátorov odpovedajúcim jedno-elektrónovým prechodom molekulových orbitálov. Určené vlnové dĺžky jednotlivých rezonancií sú v obrázku 5.2 zviditeľnené a dobre odpovedajú údajom publikovaným

v literatúre (DJURIŠIĆ A.B., 2002). Pri porovnávaní údajov, s menšími odchýlkami, sme brali do úvahy fakt, že sme pracovali s ftalocyanínom zlisovaným do tablety, kým v publikovanej práci sa jednalo o ftalocyanín nanosený na tenkej vrstve.

Pokiaľ sa zameriame na spektrá samotné, vykazujú zhodu v tvare, ako je možné vidieť u indexu lomu n (viď Obr. 5.2 (hore)), avšak amplitúda našich experimentálnych hodnôt je väčšia (približne o 0,2), ako amplitúda hodnôt publikovaných v literatúre.

Pri koncových bodoch a bodoch pri cca 570 nm je odlišnosť amplitúd dokonca väčšia ako 0,2. U extinkčného koeficientu k sa rozdiel amplitúd ukázal hlavne v oblasti 268 nm až 350 nm, kde sa jednalo o menší rozdiel cca 0,1, a následne pri koncových bodoch (cca 680 nm a viac), kde nastal ich rozdiel o cca 0,2. V oblastiach od 350 nm až 600 nm vykazovali hodnoty veľmi malú až žiadnu odchýlku amplitúd, kým nedošli ku cca 614 nm, kde hodnoty publikované v literatúre dokonca prevýšili hodnoty nami nameraných dát.

U absorpčného spektra ftalocyanínu (všeobecne porfirínov) sa stretávame s modelom „štyroch orbitálov“ (jedná sa o dva najvyššie obsadené π a dva najnižšie neobsadené π^* orbitály). Lineárnou kombináciou týchto prechodov s jedným elektrónom vznikajú tzv. Q a B pásy (Hashimoto Tomohiro et al., 1999).

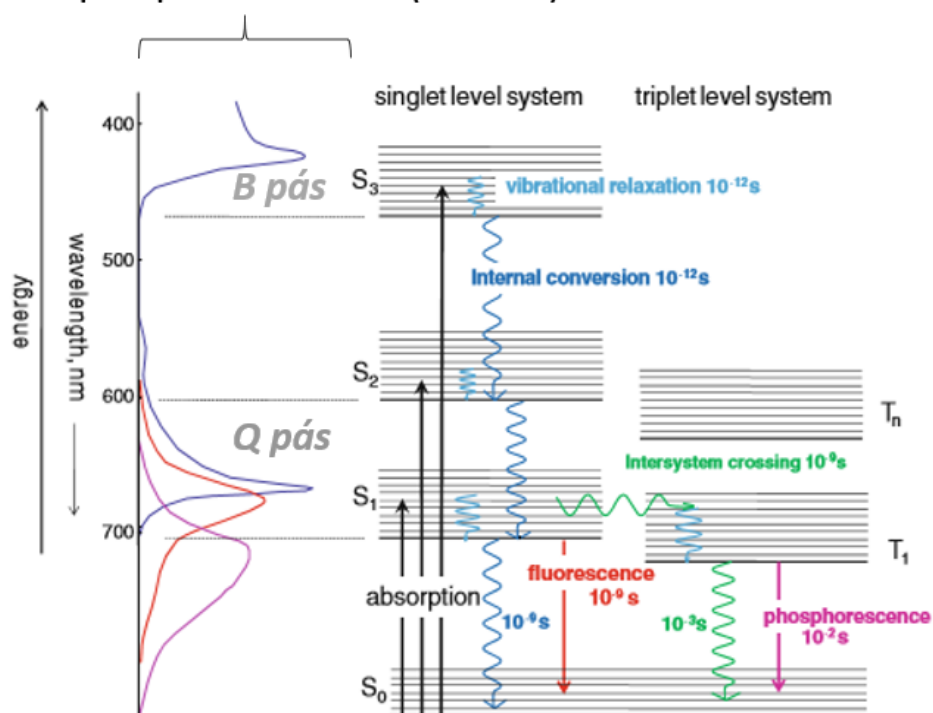
V porovnaní s literatúrou (DJURIŠIĆ A.B., 2002) sme, u extinkčného koeficientu k priradili dané oblasti Q a B pásov (viď Tab. 5.1), k jednotlivým Lorentzovým oscilátorom, ktoré sme následne vyznačili v Obr. 5.2 (dole).

	Q pás		B pás
$\lambda_{experiment}$	703,0 nm	613,5 nm	342,0 nm
$\lambda_{literatura}$	724,5 nm	589,9 nm	353,9 nm

Tabulka 5.1: Experimentálne a teoretické hodnoty elektrónových prechodov ftalocyanínu porovnané s literatúrou (DJURIŠIĆ A.B., 2002)

Prominentný absorpčný pás v oblasti vlnových dĺžok 600-700 nm, ktorý spadá do intervalu terapeutického okna, teda spektrálnej oblasti s najväčšou penetračnou hĺbkou tkaniva, je na Obr. 5.2 (dole) tiež zvýraznený.

Absorpčné spektrum molekúl PS (všeobecne)



Obrázok 5.3: Prepojenie absorpčného spektra s Jablonského schémou, predstavujúcou typické fotofyzikálne procesy v molekulách všeobecne. Prevzaté z (KADER, 2014b)

Ako je vidieť na Obr. 5.3, práve v tejto oblasti, terapeutického okna (600-700 nm), dochádza v molekule PS k tzv. inter - crossingu, ktorý je dôležitým dejom pri prenose energie molekule kyslíku, a tým vzniku ROS. Hodnota optickej absorpcie práve v tejto spektrálnej oblasti je jedna zo zásadných vlastností fotosenzitizéru používaného pre PDT.

5.2 Zrovnanie experimentálnych hodnôt optických konštánt s ab - initio výpočtami

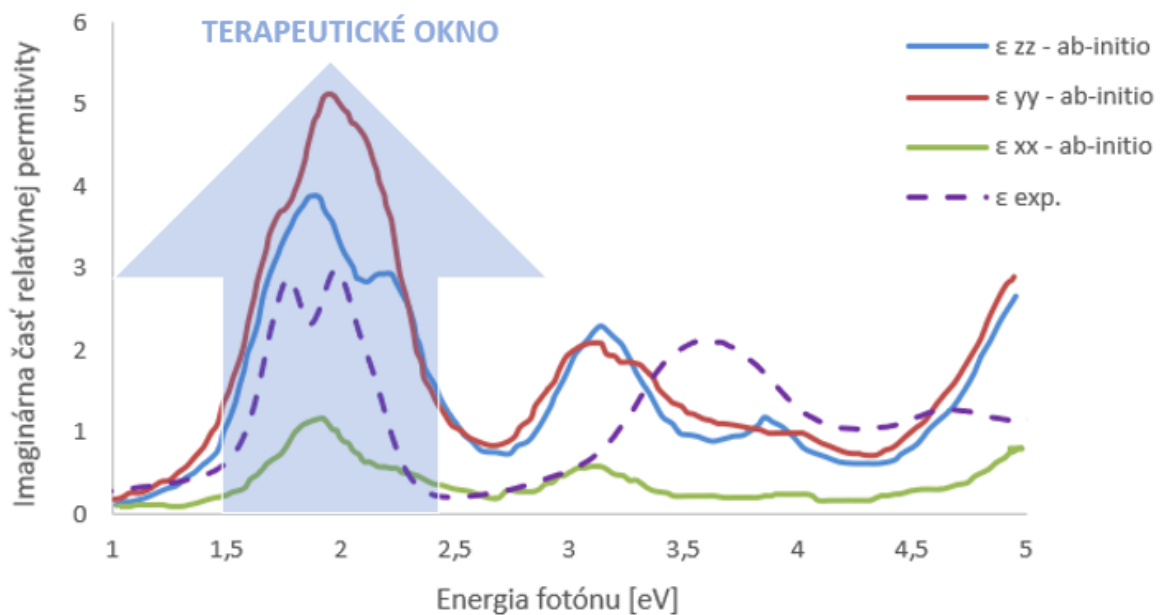
Na druhú stranu, určenie optických konštánt v širšej spektrálnej oblasti ma svoj význam taktiež pre ladenie teoretických postupov ab-initio výpočtov optických konštánt rôznych materiálov. Po doladení daných postupov, môžu byť použité pre výpočty funkcionalizácie ftalocyanínu v snahe maximalizovať absorpciu v terapeutickom okne (≈ 650 nm).

Experimentálne určené spektrá optických konštánt tvoria v tomto prípade referenciu, ku ktorej sa teoretické výpočty majú priblížiť. Pre posúdenie nastávajúceho stavu úrovne výpočtov

uvádzame zrovnanie oboch prístupov pre nami študovaného med'natého ftalocyanínu. Optické konštanty v tomto prípade prepočítavame (pre potreby zrovnania) z indexu lomu na hodnotu elektrickej permitivity vzť ahom

$$n - ik = \sqrt{\epsilon_r - i\epsilon_i}, \quad (17)$$

kde ϵ_r a ϵ_i je reálna a imaginárna časť relatívnej permitivity ftalocyanínu. Zrovnanie ab-initio s nami určenými opt. konštantami je zobrazené na Obr. 5.4 prostredníctvom imaginárnej časti elektrickej permitivity. Teoretické výpočty vychádzajú zo symetrie molekuly, a teda získané hodnoty nadobúdajú v rôznych smeroch rôznych hodnôt označených ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{zz} , ako je bežné pre anizotropné materiály (BIRNBAUM Tobias, 2014). Nami zlisovaná tableta obsahuje náhodne orientované pigmentové častice, a preto je vo výsledku opticky izotropná a určená elektrická permitivita je skalárna veličina.



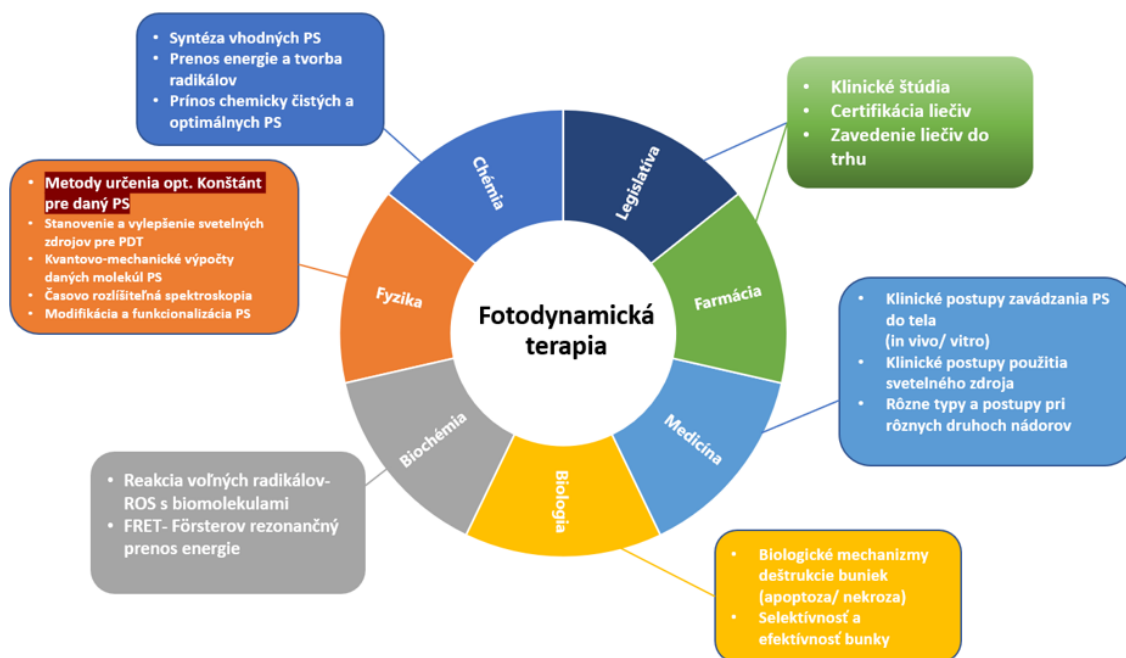
Obrázok 5.4: Teoreticky vypočítané spektrá imaginárnej časti elektrickej permitivity ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{zz} (BIRNBAUM Tobias, 2014) a im odpovedajúca nami experimentálne určená závislosť (fialová)

V spektrálnej oblasti terapeutického okna teoretické výpočty kvalitatívne správne postihujú experimentálne dáta. Napriek tomu v oblasti malých vlnových dĺžok (vyšších hodnôt energie fotónu) sa zo spektra príliš nezhodujú. Nami experimentálne určené konštanty ftalocyanínu tak dávajú možnosť doladenia rôznych prístupov v teoretických výpočtoch používaných, ktoré na

druhú stranu, po svojej maturácii, môžu predikovať vplyv rôznej funkcionalizácie ftalocyanínu na sledované hodnoty extinkčného koeficienta, a tým dielčím spôsobom napomôcť procesu zefektívnenia PDT.

6 ZÁVER

Fotodynamická terapia, ako interdisciplinárny celok, je zložená z rôznych okruhov vedeckej sféry nevyhnutných k jej správnej funkcii (vid' Obr. 6.1). Táto práca sa zameriava na okruh zo sféry fyziky, kde bolo cieľom určiť optické konštanty PS, v našom prípade med'natého ftalocyanínu, pomocou spektroskopickéj elipsometrie, a tým prispieť k novším poznatkom merania pre určenie vlastností vhodného PS. Jednalo sa presnejšie o určenie relatívnej fázovej zmeny (elipsometrický parameter Δ) a zmeny amplitúdy (elipsometrický parameter Ψ), z ktorých boli následne za pomoci analytických vzťahov vypočítaný index lomu n a extinkčný koeficient k .



Obrázok 6.1: Interdisciplinárny prístup a vybrané príspevky rôznych disciplín v PDT

Experimentálne hodnoty spolu s hodnotami publikovanými v literatúre (vid' (DJURIŠIĆ A.B., 2002)) boli porovnateľné, čím sa daná metóda elipsometrie ukázala, ako metóda adekvátne a nápomocná v oblasti PDT. Menšie odlišnosti medzi hodnotami experimentálnymi a hodnotami publikovanými v literatúre by mohli byť spôsobené rôznymi faktormi, vplyvujúcimi na rôznosť študovaných vzoriek. Mohlo sa jednať o hrúbku vylisovanej tablety, jej povrch či tlak, pod ktorým lisovanie prebiehalo. Zmienené faktory otvárajú novú ponuku pre skúmanie a zpresnenie experimentálnej práce, a tým priblíženiu sa k vierohodnejším hodnotám.

Tzv. oblasť terapeutického okna bola správne priradená do oblasti s najväčšou absorpciou. Táto oblasť môže byť prostredníctvom vhodných úprav v molekule ftalocyanínu a ladeným teoretických výpočtov upravená, a tým dosiahnuteľná zvýšená absorpcia, čo by malo veľký vplyv na penetračnú hĺbku do tkaniva. Jednalo by sa teda o nápomocný krok v oblasti terapie, keďže pri zvýšenej penetrácii svetla do tkaniva, je možné liečiť aj hlbšie nachádzajúce sa či zle dostupné nádorové ochorenia u pacientov.

Prostredníctvom tejto bakalárskej práce som nadobudla mnoho užitočných zručností, či praktických alebo teoretických, ktoré by som rada zmienila:

- bližšie teoretické zoznámenie sa a práca so spektroskopickým elipsometerom VASE
- teoretické poznatky z oblasti elipsometrie a polarizácie svetla
- práca s lisom a samotné lisovanie tablety z organického práškového pigmentu
- vyhodnocovanie nameraných spektier pomocou softwaru WVASE32
- práca pomocou programovania v oblasti SCILAB
- tvorba a editácia práce v prostredí LaTeX

POUŽITÁ LITERATÚRA

- AHSEN Vefa a Tebello NYOKONG, et al., 2012. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. 1. vydání. Netherlands: Springer Science. ISBN 978-90-481-3872-2. DOI: 10.1007/978-90-481-3872-2.
- ALL, Goubin F. et, 2004. Experimental and Theoretical Characterization of the Optical Properties of CeO₂, SrCeO₃, and Sr₂CeO₄ Containing Ce⁴⁺ (f₀) Ions. *ChemInform*. 04/2004, **16**, 662–669. DOI: 10.1002/chin.200417017.
- ALL, Niskanen I. et, 2007. Assessment of the complex refractive index of an optically very dense solid layer: Case study offset magenta ink. *Chemical Physics Letters*. **442**(4), 515–517. ISSN 0009-2614. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.06.036>.
- BIRNBAUM TOBIAS Torsten HAHN, et al., 2014. Optical and magneto-optical properties of metal phthalocyanine and metal porphyrin thin films. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **26**. ISSN 0953-8984. DOI: 10.1088/0953-8984/26/10/104201.
- CORNELL, B, 2016. *Zánik bunky*. Dostupné také z: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-death.html>. [Online; máj 5, 2020].
- DJURIŠIĆ A.B., C.Y. et al., 2002. Optical properties of copper phthalocyanine. *Optics Communications*. **205**, 155–162. ISSN 00304018. DOI: 10.1016/S0030-4018(02)01311-1.
- ERK, PETER a HEIDI HENGELSBERG, 2003. Phthalocyanine Dyes and Pigments. In: KADISH, Karl M. – Kevin M. SMITH a Roger GUILARD (editoři). *The Porphyrin Handbook*. Amsterdam: Academic Press, s. 105–149. ISBN 978-0-08-092393-2. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092393-2.50009-3>.
- FABER C. P. BOULANGER, et al., 2014. Excited states properties of organic molecules: from density functional theory to the GW and Bethe–Salpeter Green’s function formalisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical physical and engineering sciences*. **372**. ISSN 1471-2962. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsta.2013.0271>.

- FUJIWARA, H, 2007. *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*. 1. vydání. London: Wiley, John Wiley. ISBN ISBN 978-0-470-01608-4.
- GOLD, Michael H., 2011. Photodynamic Therapy in Dermatology. In: 1. vydání. New York: Springer-Verlag New York, s. 181–183. ISBN 978-1-4419-1298-5.
- HASHIMOTO TOMOHIRO, Yoong-Kee CHOE a Haruyuki NAKANO, 1999. Theoretical Study of the Q and B Bands of Free-Base, Magnesium, and Zinc Porphyrins, and Their Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A*. **131**, 1894–1904.
- HEUER, Jana – Ilpo NISKANEN – Susanne KLEIN a Kai PEIPONEN, 2011. Optical Properties of Suspensions of Organic and Inorganic Red Pigments. *Applied spectroscopy*. 10/2011, **65**, 1181–1186. DOI: 10.1366/11-06246.
- CHAKRABORTY, J.N. (editor), 2014. Dyeing with phthalocyanine dye. In: *Fundamentals and Practices in Colouration of Textiles*. Woodhead Publishing India, s. 169–176. ISBN 978-93-80308-46-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-93-80308-46-3.50014-5>.
- ISAGO, Hiroaki, 2015. *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds*. 1. vydání. Tokyo: Springer Science. ISBN 978-4-431-55102-7. DOI: 10.1007/978-4-431-55102-7.
- KADER Mahmoud H. Abdel, ed., 2014a. Photodynamic Therapy: From Theory to Application. In: 1. vydání. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, s. 3–18. ISBN 978-3-642-39629-8.
- KADER Mahmoud H. Abdel, ed., 2014b. Photodynamic Therapy: From Theory to Application. In: 1. vydání. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, s. 25–64. ISBN 978-3-642-39629-8.
- LAU, Janet T. F., 2013. Towards Dual and Targeted Cancer Therapy with Novel Phthalocyanine-based Photosensitizers. In: 1. vydání. Switzerland: Springer Science, s. 1–17. ISBN 978-3-319-00707-6. DOI: 10.1007/978-3-319-00708-3.
- LEVINE, Rachel a Eric KRENNING, 2017. Clinical History of the Theranostic Radionuclide Approach to Neuroendocrine Tumors and Other Types of Cancer: Historical Review Based on an Interview of Eric P. Krenning by Rachel Levine. *Journal of Nuclear Medicine*. 09/2017, **58**, 3S–9S. DOI: 10.2967/jnumed.116.186502.

- LINHART, Igor, 2012. *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-807-0808-061.
- LIU, Z – H. KWOK a A DJURIŠIĆ, 2004. The optical functions of metal phthalocyanines. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **37**, 678–688. DOI: 10.1088/0022-3727/37/5/006.
- LOTFY TAHA, Mohamed, 2013a. Photodynamic Therapy: New research. In: 1. vydání. New York: Nova Science Publishers, s. 5–13. ISBN 978-1-62417-660-9.
- LOTFY TAHA, Mohamed, 2013b. Photodynamic Therapy: New research. In: 1. vydání. New York: Nova Science Publishers, s. 40–47. ISBN 978-1-62417-660-9.
- MALI, Sawanta – Dhanaji DALAVI – Popatrao BHOSALE – C.A. BETTY – Anil CHAUHAN a P. PATIL, 2012. Electro-optical properties of copper phthalocyanines (CuPc) vacuum deposited thin films. *RSC Adv*. 02/2012, **2**, 2100–2104. DOI: 10.1039/C2RA00670G.
- MISTRÍK, J., 2019. Optical Characterization of Materials by Spectroscopic Ellipsometry. In: *Optical Properties of Materials and Their Applications*. John Wiley a Sons, Ltd, kapitola 15, s. 435–464. ISBN 9781119506003. DOI: doi:10.1002/9781119506003.ch15.
- MUSFELDT, J. – David TANNER a A. PAINE, 1993a. Method for the determination of the optical properties of highly conjugated pigments. *JOSA A*. 12/1993, **10**, 2648–2657. DOI: 10.1364/JOSAA.10.002648.
- MUSFELDT, J. – David TANNER a A. PAINE, 1993b. Method for the determination of the optical properties of highly conjugated pigments. *JOSA A*. 12/1993, **10**, 2648–2657. DOI: 10.1364/JOSAA.10.002648.
- PALUMMO, Maurizia – Conor HOGAN – Francesco SOTTILE – Paolo BAGALÁ a Angel RUBIO, 2009. Ab initio electronic and optical spectra of free-base porphyrins: The role of electronic correlation. *The Journal of chemical physics*. **131**, 1–7. DOI: 10.1063/1.3204938.

WANG, Huihui – Takamitsu FUKUDA – Naoto ISHIKAWA a Yutaka MATSUO, 2014.

Solvent-dependent morphology of thermally converted copper phthalocyanine for solution-processed small molecule organic photovoltaic devices. *Organic Electronics*. **15**(1), 139–143. ISSN 1566-1199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2013.10.023>.

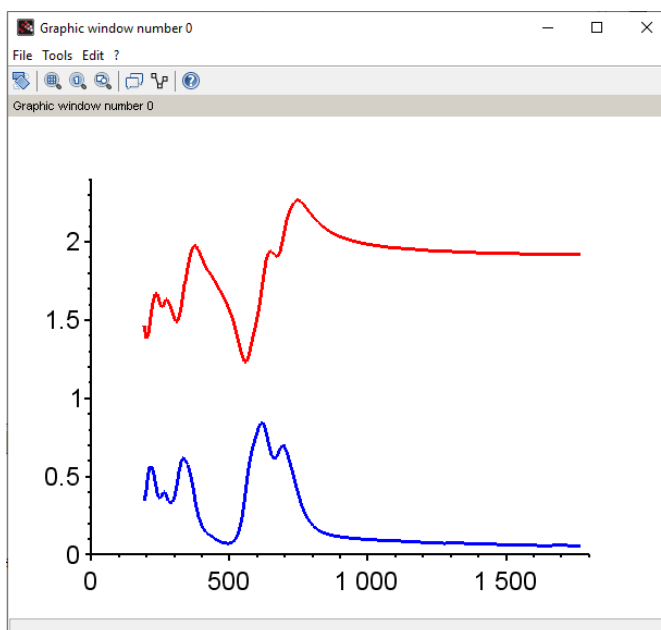
ZOZNAM PRÍLOH

A Program v Scilabe	45
-------------------------------	----

Príloha A: Program v Scilabe

Nasledujúci kód v programovom prostredí Scilab načítava experimentálne dáta elipsometrických parametrov Ψ a Δ . Prevádza ich hodnoty zo stupňov na radiány. Následne, pomocou rovnice (15) vypočítava spektra optických konštánt: indexu lomu a extinkčného koeficientu. Posledným príkazom získané spektra vykreslí ujem do grafu, ktorý prikladáme v obrázku A.1.

```
data=read('6mpa_1.txt',-1,4);
lam=1238.9./data(:,1);
psi=data(:,3);
psi_rad=psi/180*%pi;
delta=data(:,4);
delta_rad=delta/180*%pi;
rho=tan(psi_rad).*exp(%i*delta_rad);
rr=((1-rho)./(1+rho)).^2.0;
N=sqrt(3/4*(1+3*rr));
plot2d(lam,[real(N),-imag(N)]);
//plot2d(lam,real(N));
//plot2d(lam,-imag(N));
```



Obrázok A.1: Spektra optických konštánt ftalocyanínu spočítaných pomocou programového prostredia Scilab. Použité boli elipsometrické parametre merané pre uhol dopadu 70°