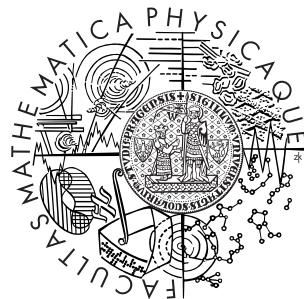


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Marek Scholz

Role antioxidantů v biologických systémech

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.,
Studijní program: Fyzika
Studijní obor: Obecná fyzika

2009

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé práce, RNDr. Romanu Dědicovi, Ph.D., za jeho obětavé vedení a mnoho hodnotných rad. Poděkování patří rovněž mým rodičům za veškerou podporu, které se mi dosud dostávalo.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne

Marek Scholz

Obsah

Seznam častých zkratek	5
1 Úvod	6
2 Reaktivních formy kyslíku a antioxidanty	8
2.1 Reaktivní formy kyslíku	8
2.2 Chemické vlastnosti $^1\text{O}_2$	8
2.3 Chemické vlastnosti kyslíkových radikálů	9
2.4 Vznik ROS v živých organismech	10
2.5 Antioxidanty	11
2.6 Antioxidanty a lidské zdraví	13
2.7 Fotodynamická terapie	14
3 Singletní kyslík	15
3.1 Singletní a tripletní stavy	15
3.2 Klasifikace stavů $^1\text{O}_2$	17
3.3 Vznik $^1\text{O}_2$ fotosensibilizačním procesem	17
3.4 Rychlostní konstanty pro vznik a zánik ^3PS a $^1\text{O}_2$	18
3.5 Časový vývoj koncentrace $^1\text{O}_2$ po excitačním pulsu	22
4 Experimentální uspořádání	24
5 Materiály a příprava vzorků	26
5.1 Příprava roztoků	26
5.2 Spektrální vlastnosti použitých látek	26
6 Výsledky měření a diskuse	27
6.1 Experimentální protokol	27
6.2 Luminiscence $^1\text{O}_2$ – měření v rozsahu 1242 nm až 1306 nm	30
6.3 Doba života $^1\text{O}_2$ určená z kinetik fosorescence $^1\text{O}_2$	32
6.4 Zhášecí rychlostní konstanta $^1\text{O}_2$ pro β -karoten	32
6.5 Doba života ^3PS určená z kinetik fosorescence $^1\text{O}_2$	35
6.6 Doba života ^3PS určená z kinetik fosorescence ^3PS	37
6.7 Degradace karotenu	41
6.8 Poznámky k experimentu	42
7 Závěr	44
Literatura	45

Název práce: Role antioxidantů v biologických systémech

Autor: Marek Scholz

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

e-mail vedoucího: Roman.Dedic@mff.cuni.cz

Abstrakt: Reaktivní formy kyslíku přispívají k řadě destruktivních a degenerativních pochodů v biologických systémech. Antioxidanty jsou látky poskytující organismům přirozenou ochranu proti reaktivním formám kyslíku. Jednou ze zvláště nebezpečných reaktivních forem kyslíku je singletní kyslík. Experimentální část předkládané práce zkoumá interakci singletního kyslíku a tripletu fotosensibilizačního barviva s β -karotenem. Byla měřena doba života singletního kyslíku a tripletu barviva a byly vyhodnoceny zhášecí rychlostní konstanty pro β -karoten. Výsledně byla zhodnocena účinnost β -karotenu jakožto antioxidantu při fotosensibilizaci singletního kyslíku. Součástí práce je rovněž základní seznámení s problematikou antioxidantů a rešerše dosud publikovaných výsledků.

Klíčová slova: antioxidant, β -karoten, singletní kyslík

Title: Role antioxidantů v biologických systémech

Author: Marek Scholz

Department: Department of chemical physics and optics

Supervisor: RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: Roman.Dedic@mff.cuni.cz

Abstract: Reactive oxygen species participate in many destructive and degenerative processes in biological systems. Antioxidants are chemical substances which naturally protect organisms against reactive oxygen species. One of the most dangerous reactive oxygen species is singlet oxygen. The experimental part of the work studies interaction of singlet oxygen and triplets of photosensitizer with β -carotene. Lifetime of singlet oxygen and triplets of photosensitizer is measured and respective quenching rate constants for β -carotene are evaluated. The efficiency of β -carotene as antioxidant during photosensitizing process of singlet oxygen was assessed. The work also presents an introduction to antioxidant issue and background search of published results.

Keywords: antioxidant, β -carotene, singlet oxygen

Seznam zkratek

Δ	označení singletního kyslíku zvláště v indexech
k_{dif}	difusní limita pro rychlostní konstantu
$k_{\Delta Q}$	zhášecí konstanta singletního kyslíku pro β -karoten
K_{Δ}	celková rychlostní konstanta zániku $^1\text{O}_2$.
K_{Δ}^0	celková rychlostní konstanta zániku $^1\text{O}_2$ bez přítomnosti zhášeče.
$k_{T_1 Q}$	zhášecí konstanta tripletu fotosensibilizátoru pro β -karoten
$k_{T_1 S_0}$	rychlostní konstanta zhášení tripletu fotosensibilizátoru jeho základním singuletem
K_{T_1}	celková rychlostní konstanta zániku tripletu fotosenzibilizátoru.
τ_{Δ}	doba života singletního kyslíku
τ_{T_1}	doba života tripletu fotosensibilizátoru
τ'_{T_1}	doba života déle žijící formy tripletu fotosensibilizátoru
$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
PDT	fotodynamická terapie (Photodynamic therapy)
PS	fotosensibilizátor (Photosensitizer)
^3PS	triplet fotosensibilizátoru
Q	zhášec (Quencher)
ROS	reaktivní forma kyslíku (Reactive oxygen species)
S_1, S_0	první excitovaný a základní singlet fotosensibilizátoru
T_1	označení tripletu fotosensibilizátoru zvláště v indexech
THF	tetra-hydro-furan
TPP	tetra-fenyl-porfin

Kapitola 1

Úvod

V poslední době se poměrně často můžeme setkat se slovem antioxidant, které se dokonce stalo jakýmsi zaklínadlem pro výrobce některých potravin a nutričních doplňků. Rovněž jsou široce prováděny klinické studie zkoumající pozitivní terapeutické či preventivní účinky antioxidantů při nejrůznějších chorobách. V popředí zájmu je také vliv antioxidantů na obecný jev stárnutí. Obzvláště diskutovaným antioxidantem je β -karoten, který je v řadě organismů hojně zastoupen. Antioxidanty však nejsou diskutovány jen v kontextu lidského zdraví, velice významnou úlohu zřejmě hrají v procesu fotosyntézy a v řadě dalších životních funkcí organismů rostlinné i živočišné říše.

Ruku v ruce s pojmem antioxidant často slýcháme pojem volný radikál. Vedle kyslíkatých radikálů existují i další nebezpečné reaktivní formy kyslíku, jako je například singletní kyslík (dále $^1\text{O}_2$), proti kterým je třeba organismu poskytovat ochranu.

Působení antioxidantů v biologických systémech je, stejně jako další procesy v živých organismech, záležitost složitá a komplexní. Experimentální část předkládané práce se zabývá témi nejzákladnějšími mechanismy jejich působení; zaměřuje se na vyšetřování interakce β -karotenu se singletním kyslíkem a s fotosensibilizátorem tetrafenylporfinem (TPP), který je po osvícení schopný přenosem excitační energie vybudit kyslík do singletního stavu. Je zkoumán jednoduchý systém – roztok fotosensibilizátoru TPP a β -karotenu v tetrahydrofuranu (THF) v rovnováze se vzdušným kyslíkem. Pozornost je věnována sledování časového průběhu koncentrace singletního kyslíku a koncentrace tripletních stavů fotosensibilizátoru bezprostředně po excitačním laserovém pulsu. Ke sledování koncentrací slouží unikátní aparatura pro časově a spektrálně rozlišené měření infračervené (IR) luminiscence jednak singletního kyslíku a jednak fotosensibilizátoru (PS).

Těžištěm experimentální části práce je měření dob života singletního kyslíku a tripletního stavu barviva v závislosti na koncentraci antioxidantu β -karotenu a určení rychlostních zhášecích konstant. Cílem práce je vyhodnotit účinnost β -karotenu jakožto zhášeče při fotosensibilizaci a studium mechanismů probíhajících v modelovém systému. Závěr experimentální práce se snaží vložit výsledky měření do kontextu doposud získaných poznatků o funkci antioxidantů v biologických systémech.

Teoretická část práce si klade za cíl dát čtenáři úvodní vhled do problematiky a upozornit na některé zajímavosti vztahující se k tématu. Nejprve stručně vysvětluje pojem *reaktivní forma kyslíku* (dále ROS) a podává stručný průřez chemií radikálů a singletního kyslíku, rovněž v krátkosti uvádí různé zdroje ROS v živých organismech. Následuje vymezení pojmu antioxidant a kapitola o antioxidačních účincích β -karotenu. Je zařazena také kapitolka nastiňující hypotetické možnosti využití antioxidantů v medicíně. Dále se práce zabývá podrobnějším osvětlením pojmu singlet a triplet, které jsou stěžejními termíny pro popis fosforescence a fyziku singletního kyslíku. Nechybí kapitoly zabývající se fotosensibilizací singletního kyslíku a jednou z jeho moderních aplikačních možností, fotodynamickou terapií.

Druhá část textu je věnována vlastnímu experimentu. Nejdříve je pozornost zaměřena na

odvození časových závislostí intenzity luminiscence singletního kyslíku při fotosensibilizačním procesu za přítomnosti zhášeče – antioxidantu – a je identifikován vztah časového průběhu k dobám života a rychlostním konstantám. Následuje stručný popis aparatury pro měření časově a spektrálně rozlišené IR luminiscence a popis přípravy měřených roztoků. Dalsí kapitoly se již věnují vyhodnocení změrených kinetik luminiscence a výpočtu dob života a rychlostních zhášecích konstant, a to jednak pro případ luminiscence $^1\text{O}_2$ a jednak pro případ luminiscence PS. Diskuse výsledků měření se snaží naměřené hodnoty uvést do kontextu teoretické části práce a upozornit na některé zajímavé aspekty studovaného problému.

Kapitola 2

Reaktivní formy kyslíku a antioxidanty

2.1 Reaktivní formy kyslíku

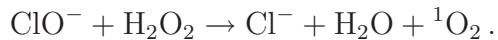
Mezi reaktivní formy kyslíku, dále ROS, je řazeno mnoho chemických látek. Tyto látky je možné rozčlenit do tří skupin podle podstaty jejich zvýšené reaktivity. Do první skupiny budiž zařazen pouze singletní kyslík ($^1\text{O}_2$). Zde je reaktivita $^1\text{O}_2$ dána spinovým stavem tohoto excitovaného stavu, jak je diskutováno v kapitole 3.1.

Druhá skupina je již značně početnější a obsahuje molekulové radikály, tedy molekuly s nevypárovaným elektronem, který je příčinou jejich zvýšené reaktivity. Patří sem například superoxidový anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), peroxylový radikál ($\text{R}-\text{OO}\cdot$) a další, tečka ve vzorci označuje radikálový elektron.

Do třetí skupiny lze řadit neradikálové molekuly, jako například peroxid vodíku (H_2O_2), organické peroxididy ($\text{R}-\text{OOH}$) či ozon (O_3), které jsou oxidačními činidly.

2.2 Chemické vlastnosti $^1\text{O}_2$

V laboratorním podmínkách se $^1\text{O}_2$ často připravuje fotosensibilizační procesem, který bude dále popsán, nebo chemicky reakcí kyseliny chlorné s peroxidem vodíku podle rovnice

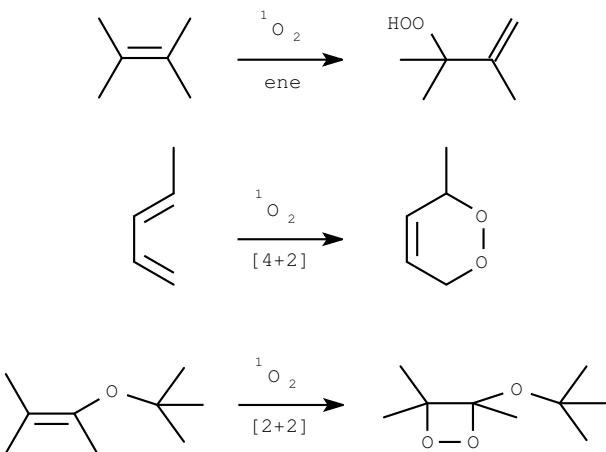


Jiným způsobem přípravy může být termický rozklad endoperoxidů.

Co se týče destruktivní činnosti $^1\text{O}_2$ v biologických systémech, nejvýznamnější roli hrají reakce $^1\text{O}_2$ s dvojnou uhlíkovou vazbou. Významná je takzvaná ene-reakce (ze slova alkene), kdy $^1\text{O}_2$ rozpojuje dvojnou vazbu alkenu, z přilehlého uhlíku odtrhne vodíkový atom a vzniká hydroperoxid ($\text{R}-\text{OOH}$) a dvojná vazba se posouvá. Dále to jsou cykloadiční reakce, kdy se ze dvou π -vazeb stávají dvě σ -vazby. V reakcích $^1\text{O}_2$ rozlišujeme [4+2] a [2+2] cykloadici, uvedená čísla udávají délky řetězců účastníků se reakce, O_2 považujeme za řetězec délky 2. [4+2] cykloadice kyslíku se účastní čtyřuhlíkatá část řetězce molekuly, která obsahuje dvě konjugované dvojné vazby, produktem je endoperoxid. [2+2] cykloadice kyslíku se účastní pouze dva uhlíky svázané dvojnou vazbou (viz obrázek 2.1).

Díky elektrofilnímu charakteru může $^1\text{O}_2$ reagovat s heteroatomy v organické sloučenině, které nesou volný elektronový pár. Takovým heteroatomem může být třeba dusík, síra nebo fosfor. Heteroatom se buď kyslíkem oxiduje, nebo může působit jako fyzikální zhášeč $^1\text{O}_2$, kdy finálním produktem je $^3\text{O}_2$ v základním stavu a původní nezměněná látka.

Uvedené reakce jsou známé již dlouhou dobu a zodpovídají za převážnou část biologických účinků $^1\text{O}_2$. První tři z uvedených reakcí působí na uhlíkovou dvojnou vazbu. Dvojnou vazbu obsahují například nenasycené mastné kyseliny, jako kyselina olejová nebo linoleová, které



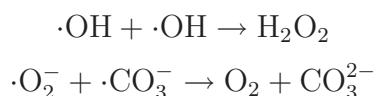
Obr. 2.1: Typické organické reakce ${}^1\text{O}_2$.

jsou součástí tuků či fosfolipidů. Fosfolipidy jsou stavebním kamenem buněčné membrány. ${}^1\text{O}_2$ oxiduje některé aminokyseliny. V souladu s popsanými reakčními mechanismy ${}^1\text{O}_2$ napadá tryptofan, tyrosin a histidin, které obsahují dvojnou vazbu uvnitř cyklu, a dále methionin a cystein, které obsahují heteroatom síry. Stejně jako aminokyseliny mohou s ${}^1\text{O}_2$ reagovat i proteiny, jež jsou z aminokyselin složené. Uchráněné nezůstávají ani nukleové kyseliny, kde ${}^1\text{O}_2$ zpravidla napadá guaninovou bázi. Dvojnou vazbu, tentokrát zabudovanou v šestičetném kruhu, obsahuje také například cholesterol. Zde ${}^1\text{O}_2$ působí ene-reakčním mechanismem.

Podrobný souhrn chemie ${}^1\text{O}_2$ je možné nalézt například v [6].

2.3 Chemické vlastnosti kyslíkových radikálů

Mezi kyslíkové radikály patří například $\cdot\text{O}_2^-$, $\text{R}-\text{OO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$. Radikály obecně mají nespárovany elektron. Například OH^- je běžný hydroxylový anion vznikající při disociaci vody, zatímco $\cdot\text{OH}$ je sice nenabitý, ale je to radikál. Radikál může ochotně reagovat s jiným radikálem, což vede ke spárování elektronů. Uvedeme jako příklad reakce dvou stejných a dvou odlišných radikálů:



Při reakci radikálu s běžnou molekulou, jež má spárované elektrony, zpravidla dochází k záměně radikálu, nikoli však k jeho zániku. Příkladem takové reakce je oddělení jednoho atomu A z molekuly M–A působením radikálu $\cdot\text{R}$, schematicky



kdy původní radikál $\cdot\text{R}$ zaniká, zatímco vzniká nový $\cdot\text{M}$. Rychlosť reakce závisí na rozdílu disociačních energií M–A a R–A. Oddělovaným atomem může být například vodík. Praktickým příkladem takové reakce je chlorace alkanů, kdy vstupujícím radikálem je $\cdot\text{Cl}$, vzniklý homolytickým termickým štěpením Cl_2 , a produktem je chlorovaný alkán a HCl. Oddělovat vodík se daří například i radikálu $\cdot\text{OH}$ za vzniku vody.

Radikály mohou vznikat působením ionizujícího záření na tkáně, např. voda se rozkládá za vzniku $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$, H_2O_2 a dalších produktů. V biologických systémech se mohou ROS

působením různých katalyzátorů přeměňovat vzájemně mezi sebou, příkladem budiž vznik $\cdot\text{OH}$ z H_2O_2 v přítomnosti iontů železa



přičemž volné železnaté ionty jsou uvolňovány z molekul obsahujících železo působením radikálu $\cdot\text{O}_2^-$, který je schopen redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} .

Působením vysoce reaktivního $\cdot\text{OH}$ na organickou molekulu R dojde k přesunu elektronu a vzniku OH^- a $\cdot\text{R}$. Rychlosť reakce $\cdot\text{OH}$ je omezena pouze rychlosťí difuse. Radikál $\cdot\text{R}$ rychle reaguje s obyčejným kyslíkem za vzniku radikálu R-OO \cdot . Ten je opět vysoce reaktivní a schopný reagovat s dalšími organickými molekulami za vzniku radikálů. Dochází tak k řetězové reakci. Radikály mohou tím pádem být mnohem nebezpečnější, než by se na první pohled mohlo zdát.

Velký fyziologický význam mají reakce radikálů s uhlíkovou dvojnou vazbou, přičemž radikály se chovají jako elektrofilní činidla a rozbíjejí dvojnou vazbu.

Radikál $\cdot\text{O}_2^-$ je někdy označován jako primární kyslíkový radikál, protože vzniká přímo z kyslíku přijetím jednoho elektronu, což se může dít v přirozených metabolických procesech nebo třeba v důsledku ozáření. Reakce $\cdot\text{O}_2^-$ s bioorganickými sloučeninami jsou v porovnání s jinými radikály překvapivě pomalé [13, strana 39]. Jak bylo ale naznačeno, $\cdot\text{O}_2^-$ může stát u vzniku jiných daleko reaktivnějších radikálů. Koncentrace $\cdot\text{O}_2^-$ je v těle regulována enzymem superoxidová dismutása, která katalyzuje přeměnu $\cdot\text{O}_2^-$ na O_2 a H_2O_2 . Koncentrace H_2O_2 , který rovněž řadíme mezi ROS, je regulována enzymem katalása, který katalyzuje rozklad H_2O_2 na O_2 a H_2O .

Chemie jednotlivých ROS je probrána v [13, kapitola 2], stručný souhrn chemie radikálů lze nalézt například v [36].

2.4 Vznik ROS v živých organismech

Zabývejme se přirozenými cestami vzniku ROS v živých organismech. V některých případech ROS vznikají cíleně, v jiných jako nežádoucí vedlejší produkt.

Významným zdrojem ROS a zvláště $^1\text{O}_2$ je fotosyntéza. Schematicky, zjednodušeným způsobem je popsán její mechanismus, detaily lze najít například v [2]. Proces fotosyntézy probíhá ve dvou fázích; jednak ve fází světelné, jednak v temnostní. Temnostní fáze využívá produktů světelné fáze – NADPH a ATP – k tvorbě cukru, přičemž uhlík pro tvorbu cukrů pochází z CO_2 . Pro nás je zvláště zajímavá světelná fáze.

Světelná fáze probíhá v chloroplastech. Fotochemické procesy fotosyntézy se odehrávají ve fotosystému I a II, které jsou zabudované v membráně thylakoidu. Fotosystém II absorbuje světelné záření a tuto energii využívá k oxidaci vody na molekulární kyslík, dva elektrony a dva protony, které zůstávají v lumen thylakoidu. Elektron je elektronovým transportním řetězcem v membráně přenášen postupně na další molekuly (ty se přijmutím elektronu redukují), navíc jsou na úkor oxidoredukčního potenciálu přenášeného elektronu transportovány další protony přes thylakoidní membránu ze stromatu chloroplastu do lumen thylakoidu, což přispívá ke vzniku protonového gradientu. Elektron je předán fotosystému I, který absorbuje světlo a využívá jeho energii k přenosu elektronu na ferredoxin, což je silně redukční činidlo, jež redukuje NADP^+ na NADPH. Konečně ATP-syntháza využívá vzniklého protonového gradientu k tvorbě ATP z ADP. Hlavními fotosyntetickými pigmenty jsou chlorofily, jež jsou řazeny mezi tetrapyroly, stejně jako tetrafenylporfin využívaný v experimentální části práce.

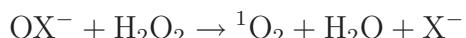
V případě vysoké ozářenosti nebo různých stresů, vedoucích ke zpomalení procesů přenosu elektronu, nestačí uvedený transportní řetězec odvádět absorbovanou excitační energii, což prodlužuje dobu života excitovaných stavů pigmentů, jež pak mohou s větší pravděpodobností přejít do tripletního stavu. Tyto tripletní stavy fotosyntetických pigmentů mohou přímo reagovat s molekulami ve svém okolí za vzniku volných radikálů nebo fotosensibilizovat nebezpečný singletní kyslík.

Ochrana proti tomuto fotooxidativnímu poškození může být jednou z rolí karotenoidů obsažených ve fotosyntetických systémech. Předpokládá se, že karotenoidy mohou zhášet jednak triplet pigmentu a jednak samotný singletní kyslík a jsou proto nazývány antioxidanty. Bližší rozbor mechanismu jejich působení bude uveden dále a je hlavním předmětem experimentální části práce. Kromě ochranné funkce karotenoidy slouží i jako pigmenty pro sběr sluneční energie, stejně jako chlorofyl. Druhý excitovaný singlet S_2 karotenu je schopen předávat energii chlorofylu *a* [10].

Při velkém osvětlení je rovněž mnoho redukovaných přenašečů elektronu a elektrony nestačí být přenášeny k redukci NADPH. Redukované přenašeče v nadbytku dávají vzniknout $\cdot O_2^-$, který však je schopný elektron opět předávat fotosystému a svým způsobem chrání organismus před vznikem nebezpečnějších ROS. V případě fotooxidativního stresu tedy $\cdot O_2^-$ hraje v podstatě ochranou roli, zatímco v běžné situaci je třeba se jeho účinkům bránit.

V tělech živočichů jsou ROS produkovány například v mitochondriích, tzv. buněčných elektrárňách, které produkují ATP. Podobně jako v případě fotosyntézy může během přenosu elektronu transportním řetězcem dojít k jeho zachycení molekulou kyslíku a vzniká $\cdot O_2^-$ [13, kapitola 3].

Při fotosyntéze 1O_2 vzniká jako nežádoucí vedlejší produkt. V živých organismech ale existuje celá řada pochodů, ve kterých ROS hrají významnou úlohu a jsou za tím účelem organismem cíleně produkovaný. Ruku v ruce s cílenou produkcí ROS zpravidla běží i zvýšená produkce antioxidantů, které mají regulovat účinky ROS. Příkladem budí produkce ROS některými typy bílých krvinek, které v tělech živočichů bojují proti infekcím. Nejdříve je vyroben $\cdot O_2^-$. Ten jednak samovolně ve vodném prostředí a jednak účinkem enzymu superoxidová dismutása rychle přechází na H_2O_2 . Samotný H_2O_2 je spíše slabý oxidant a navíc je katalásou úspěšně rozkládán na kyslík a vodu. Nebezpečí peroxidu vodíku spočívá v tom, že může být prekurzorem pro tvorbu agresivnějších oxidantů. Katalyzovanou reakcí H_2O_2 a anionu halogenů X^- vznikají především OCl^- a $OBBr^-$, aniony od slabých kyselin. Jak bylo již zmíněno, reakcí

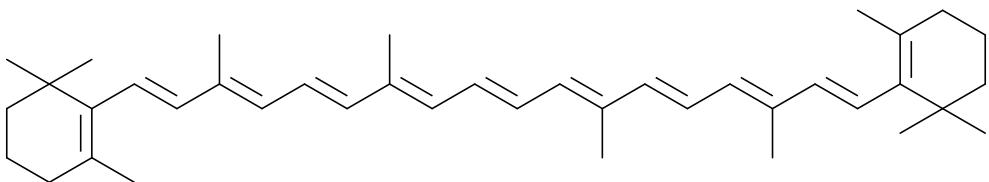


vzniká singletní kyslík. Produkce 1O_2 bílými krvinkami byla experimentálně potvrzena [19]. Není náhodou, že se 1O_2 v praxi někdy používá k dezinfekci vody či ke sterilizaci krevní plazmy [11].

Informace k této kapitole byly čerpány převážně z [13, kapitoly 2, 18, 19].

2.5 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky chránící organismus před účinkem a vznikem oxidantů – ROS. Mezi významné neenzymatické antioxidanty patří například karotenoidy, flavonoidy, kyselina askorbová či tokoferol. Mezi enzymatické antioxidanty patří již zmíněná kataláza, superoxidová dismutása a další [13, kapitola 8]. Zaměřme se především na rozbor činnosti karotenoidů a speciálně β -karotenu.



Obr. 2.2: β -karoten

Karotenoidy jsou jedny z nejběžnějších přírodních pigmentů. Dávají oranžovou barvu rostlinným plodům, květům či třeba vaječnému žloutku. Rostliny umí karotenoidy syntetisovat, živočichové je přijímají v potravě. Rozeznáváme stovky různých karotenoidových sloučenin.

Rozlišujeme dvě významné podskupiny karotenoidů, a to karoteny a xantofily. Karoteny mají souhrnný vzorec $C_{40}H_n$, xantofily jsou kyslíkaté deriváty karotenů. Dále se budeme zabývat hlavně karoteny. Nejběžnějším zástupcem je β -karoten, znázorněný na obrázku 2.2. Karoteny vznikají biochemickou syntézou z osmi isoprenových jednotek, výsledkem je řetězec s konjugovanými dvojnými vazbami. Konjugované dvojné vazby dávají molekule resonanční charakter, který má pravděpodobně příznivý vliv na antioxidační schopnosti. Jakožto čisté uhlovodíky jsou karoteny rozpustné v tucích, nikoli ve vodě.

Karoteny jsou účinnými zhášeči 1O_2 . Kyslíkový singlet může interagovat se základním singletem karotenu za vzniku prvního excitovaného tripletu karotenu, přičemž kyslík přechází do základního tripletu. Podmínkou účinného zhášení touto cestou je, aby energetický rozdíl singlet-triplet u karotenu byl o trochu menší než rozdíl singlet-triplet u kyslíku, takže proces probíhá jedním směrem. *Energie tripletů většiny karotenů jsou nižší než energie singletu kyslíku, což dává karotenům antioxidační účinky* [12,32]. Tripletní stav karotenu již nepřenáší energii zpět na kyslík a do singletního stavu přechází neškodnou disipací energie. Rychlostní konstanty zhášení 1O_2 pro karoteny a xantofily jsou většinou omezeny rychlostí difuse [32].

Jak bylo zmíněno při popisu fotosyntézy, má se za to, že singlet karotenu je schopný zhášet i triplet chlorofylu a zabránit tak vzniku 1O_2 fotosensibilizací. Vzniká základní singlet chlorofylu a neškodný excitovaný triplet karotenu. Všimněme si, že se jedná o interakci singlet–triplet. Energetický rozdíl mezi základním a nejnižším excitovaným stavem se snižuje v řadě chlorofyl, 1O_2 , β -karoten. Schopností karotenu zhášet triplet barviva se bude mezi jinými věcmi zabývat experimentální část práce.

Karotenoidy jsou dle uvedeného zvláště významné pro boj s fotooxidativním poškozením. Dokladem toho je pravděpodobně i hojná přítomnost karotenoidů ve žluté skvrně v oku [16]. Nesmíme také opomenout fakt, že karotenoidy absorbuje hlavně v oblasti modrého světla a působí tak jako světelný filtr. To je důležité vzhledem k tomu, že četné fotosensibilizátory jsou excitovány právě světlem z modré oblasti.

Zhášení 1O_2 karotenoidy probíhá převážně fyzikálně, to znamená, že nedochází k chemické přeměně – oxidaci – karotenoidu. Jedna molekula karotenoidu je tak schopna pracovat mnohokrát opakováně. V malé míře, přibližně podílem 0,05% [35], se podílí i chemické zhášení 1O_2 , kdy je molekula karotenoidu sama oxidována a nadále již není použitelná jako účinný antioxidant. Rychlostní konstanta pro zhášení 1O_2 se liší mezi jednotlivými zástupci karotenoidů. Se vzrůstajícím počtem konjugovaných dvojných vazeb klesá energie stavu T_1 karotenoidu. Výsledkem je rostoucí rychlostní konstanta pro zhášení 1O_2 , což bylo experimentálně ověřeno [12]. Z tohoto hlediska je nejúčinnějším zhášečem lycopén, který na rozdíl od β -karotenu neobsahuje cykly. Na druhou stranu ale snáze než β -karoten podléhá oxidaci,

takže se dříve vyčerpá.

Kromě $^1\text{O}_2$ jsou karoteny účinnými zhášeči R-OO $^\cdot$ [16], které vznikají převážně působením kyslíkových radikálů na lipidy. Lipidy jsou obsaženy hlavně v membránách, kde se však díky své hydrofobicitě shromažďuje i karoten. Při reakci karotenoidů s radikály vzniká radikál karotenu, který je díky rezonančnímu charakteru molekuly relativně stabilní.

Působení antioxidantů je dobře experimentálně prozkoumáno *in vitro* a jsou spolehlivě naměřeny rychlostní konstanty. Mechanismy působení antioxidantů *in vivo* jsou však mnohem komplexnější a jejich účinnost v živých systémech se může značně lišit od účinnosti změřené *in vitro*.

O karotenoidech a jejich antioxidačních účincích stručně pojednává [23, 35], podrobnější rozbor lze nalézt v [12].

2.6 Antioxidanty a lidské zdraví

V nedávné době se i mezi laickou veřejností hojně hovořilo o hypotetické odpovědnosti ROS za stárnutí. Přirozeně je potom třeba uvažovat o možnosti příznivého vlivu antioxidantů na zpomalení stárnutí.

Bylo zjištěno, že vnitrobuněčná koncentrace oxidovaných proteinů roste exponenciálně s věkem živočicha, přičemž výzkum byl prováděn na různých zástupcích živočišné říše. Bylo odhadnuto, že oxidované proteiny mohou tvořit až 50% z celkového množství proteinů v těle osmdesátiletého člověka. Schopnost odbourávat oxidované proteiny se u stárnoucího organismu snižuje, stejně tak jako jeho antioxidační kapacita. Oxidované proteiny mají tendenci se v těle akumulovat. Popsaný mechanismus by mohl přispívat k jevům, které jsou spojeny se stárnutím [13, kapitola 27]. Bohužel zatím žádná klinická studie přesvědčivě neprokázala přímou souvislost mezi zvýšeným příjemem antioxidantů a prodloužením života.

Alzheimerova choroba patří mezi degenerativní nemoci mozku, přičemž se zpravidla objevuje až ve stáří. Bylo navrženo, že za vývoj Alzheimerovy choroby je odpovědný oxidativní stres, přičemž dochází k peroxidaci membránových lipidů, destrukci membrány a nакonec ke smrti neuronů. Vzhledem k vyšší spotřebě kyslíku mozkovými tkáněmi oproti jiným částem těla je mozek náchylnější k oxidativnímu stresu. Většina klinických studií potvrdila, že zvýšený příjem vybraných antioxidantů, třeba vitaminu E, má pozitivní terapeutické účinky na Alzheimerovu chorobu. Podobným příkladem je i Parkinsonova choroba, blíže [13, 36].

Bylo vypozorováno, že zvýšený příjem karotenoidů i jiných antioxidantů pravděpodobně snižuje riziko kardiovaskulárních chorob. Ateroskleróza je onemocnění projevující se zúžením či dokonce ucpáním tepen v důsledku interakce oxidovaného LDL (Low Density Lipoprotein) s jejími stěnami. LDL fungují jako přenašeče ve vodě nerozpustného cholesterolu, stejně tak mohou přenášet i karotenoidy. K oxidaci LDL dochází převážně právě působením ROS. Bohužel seriózní lékařské výzkumy opět neprokázaly jasnou souvislost mezi zvýšeným příjemem karotenoidů či jejich zvýšenou koncentrací v séru a nižším rizikem kardiovaskulárních chorob [36].

Výzkumy ukazují, že β -karoten snižuje počet mutací v genetické informaci, které byly vyvolány expozicí γ -záření. Tento efekt může být připisován antioxidačním účinkům, protože ionizující záření je zdrojem radikálů. β -karoten rovněž snižuje nebezpečí samovolných genetických mutací, ke kterým dochází v buňkách s nedostatečnými opravnými mechanismy [24].

Již byla řeč o ochranné roli karotenoidů ve žluté skvrně oka, kde se vyskytují xantofily lutein a zeaxanthin. Ve žluté skvrně jsou hojně zastoupeny lipidy a rovněž je zde relativně vy-

soká tenze kyslíku. Vzhledem ke značnému vystavení světlu dochází ke zvýšenému nebezpečí photooxidativního stresu. Bylo prokázáno, že zvýšený příjem luteinu a zeaxanthinu v potravě snižuje nebezpečí degenerace žluté skvrny. Není ale jasné, zda jejich příznivý vliv mají anti-oxidační účinky nebo fakt, že filtrují modré světlo [16, 24].

Karotenoidy jsou v lidském séru velmi snadno spektroskopicky detekovatelné látky. Jejich koncentrace často slouží jako indikátor dobrého zdraví a zdravého životního stylu. Jak již ale bylo naznačeno, není nijak spolehlivě prokázáno, že zvýšení příjmu karotenoidů vede obecně ke zlepšení zdravotního stavu [16].

O účincích β -karotenu na lidské zdraví a jeho terapeutických účincích pojednává podrobně [24, 36] stručnější přehledy najdeme v [16, 31]. Spojitost antioxidantů s Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou chorobou či se stárnutím je probrána v [13, kapitoly 24, 25, 27]

2.7 Fotodynamická terapie

Velice zajímavou aplikací $^1\text{O}_2$ v medicíně je fotodynamická terapie (PDT), užívaná především v léčbě rakoviny. Tuto aplikaci PDT zde probereme blíže. Jedná se o způsob likvidace nádorů působením singletního kyslíku s použitím laseru a fotosensibilizátoru (PS). Do těla je vpraven PS. V místě osvětlení laserem je generován $^1\text{O}_2$ mechanismem fotosensibilizace popsaným v kapitole 3.3. Singletní kyslík způsobuje v místě vzniku poškození buněk, vedoucí k apoptóze (řízené buněčné smrti) či nekróze (neřízené buněčné smrti) tkáně. Doba života $^1\text{O}_2$ v tkáni dovoluje molekule difundovat v rozmezích přibližně 20 nm [5], což řádově odpovídá sub-buněčným rozměrům. Místo působení $^1\text{O}_2$ je tudíž dobře vázán na místo působení laseru a na místo lokalizace PS.

Snahou lékařů je najít takový způsob léčby rakoviny, který bude selektivní k nádoru, tedy proběhne destrukce nádorové tkáně, zatímco zdravá lidská tkáň zůstane v maximální možné míře nepoškozena. Různé PS mají tendenci shromažďovat se v různých buněčných strukturách a PDT má potenciál být vysoce selektivní metodou se sub-buněčným směrováním.

Velké úsilí je věnováno nalezení nevhodnějších PS. Obecným požadavkem je nízká toxicita PS a rychlé odbourávání PS z těla, aby nehrzoila fotosensibilizace kyslíku při normálním osvětlení. V oblasti viditelného světla je lidská tkáň více propustná pro delší vlnové délky, je proto výhodné, aby PS absorboval spíše v červené oblasti. To je zvláště podstatné pro léčbu vnitřních nádorů. Navíc intenzita dopadajícího slunečního záření klesá v červené oblasti. Na druhou stranu IR záření již není dostatečně energetické k tomu, aby došlo k přenosu excitační energie na $^1\text{O}_2$, a navíc IR záření je značně absorbováno tkáněmi. V neposlední řadě samozřejmě požadujeme vysoký kvantový výtěžek produkce $^1\text{O}_2$.

V současné době je rovněž zkoumán vliv antioxidantů během PDT. Antioxidanty jednak mohou snižovat nepříznivé vlivy PDT, na druhou stranu bylo objeveno, že ve vysokých koncentracích mohou působit prooxidačně a zesílit tak účinek PDT [27]. Blíže k principům PDT v [5, 33], o nových přístupech k vývoji nevhodnějšího PS pojednává [7].

Kapitola 3

Singletní kyslík

3.1 Singletní a tripletní stavy

V celé práci hrají stežejní roli pojmy singlet a triplet, zde je nastíněn význam těchto pojmu.

Uvažujme systém dvou elektronů, například v atomu nebo v molekule. Po elektronové vlnové funkci systému požadujeme, aby byla antisymetrická vůči záměně libovolných dvou elektronů. Celková vlnová funkce může být násobkem symetrické prostorové Φ_s a antisymetrické spinové funkce χ_a , případně násobkem antisymetrické prostorové Φ_a a symetrické spinové χ_s .

Spinové funkce volíme

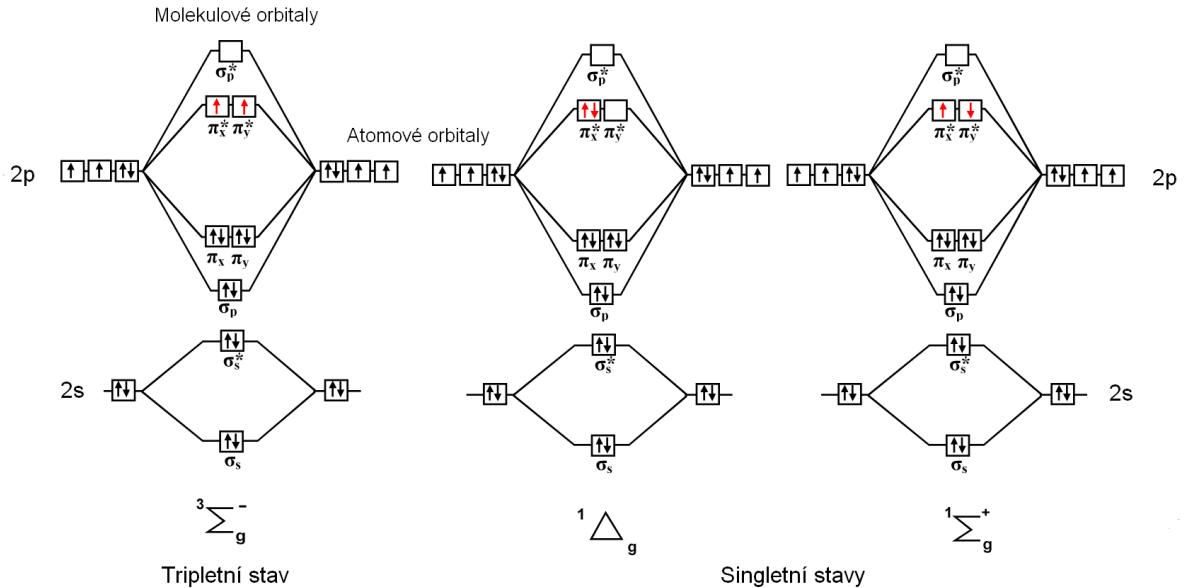
$$\begin{aligned}\chi_a &= \frac{1}{\sqrt{2}}(|\uparrow\downarrow\rangle - |\downarrow\uparrow\rangle) \\ \chi_{s,1} &= |\uparrow\uparrow\rangle \\ \chi_{s,0} &= \frac{1}{\sqrt{2}}(|\uparrow\downarrow\rangle + |\downarrow\uparrow\rangle) \\ \chi_{s,-1} &= |\downarrow\downarrow\rangle\end{aligned}\tag{3.1}$$

Tyto spinové funkce jsou vlastními funkcemi kvadrátu celkového momentu hybnosti $\mathbf{S}^2 = (\mathbf{s}_1 + \mathbf{s}_2)^2$ a jeho z-ové složky $S_z = s_{1z} + s_{2z}$, jím přiřazená kvantová čísla jsou značena po řadě S a M . Funkci χ_a odpovídají vlastní čísla $S = 0, M = 0$, funkci nazýváme singletem. Funkcím χ_s odpovídají vlastní čísla $S = 1, M = 1, 0, -1$, funkce nazýváme tripletom. Předpokládáme, že Hamiltonián \hat{H} celkového systému nezávisí na spinu, v tom případě \hat{H} nepůsobí na spinové části (3.1).

O singletním a tripletním stavu lze hovořit i v případě molekul s více než dvěma elektryny. Elektryny jsou do molekulových orbitalů uspořádány zpravidla tak, že se obsazují orbitaly od nejnižší energie po nejvyšší, přičemž než se začne obsazovat energeticky bohatší orbital, jsou předchozí orbitaly zaplněny dvěma elektryny, v souladu s Hundovými pravidly. Molekuly v základním stavu mají zpravidla spárované elektryny. Když molekula obsahuje nespárovaný elektron, hovoříme o radikálu.

Pokud se dva elektryny nacházejí ve stejném orbitalu, pak jejich prostorová funkce je automaticky symetrická, spinová funkce musí být potom antisymetrická, spinovým stavem je tedy singlet. To je samozřejmě v souladu s Pauliho vylučovacím principem.

V případě degenerace orbitalů se nejprve orbitaly obsadí každý jedním elektronem se vzájemně paralelními spiny. Elektryny nacházející se v různých orbitalech mají nižší energii, pokud je jejich spinová funkce symetrická (triplet) a prostorová antisymetrická. Tento efekt je zásadní pro vysvětlení podstaty singletního kyslíku a objasnění fosforecence. Energetické zvýhodnění antisymetričnosti prostorové části můžeme kvalitativně zdůvodnit následující jednoduchou úvahou. V případě funkce Φ_a je pravděpodobnost nalezení obou elektronů ve stejném místě nulová, zatímco pro Φ_s je nenulová. Funkce Φ_a lépe respektuje korelací pohybu



Obr. 3.1: Molekulové orbitaly tripletního a singletního kyslíku, upraveno na základě [28].

odpuzejících se elektronů a je proto energeticky výhodnější. Exaktněji bychom rozdíl energií stavů odpovídajících Φ_a , Φ_s vyjádřili pomocí hodnoty výměnného integrálu [9, kapitola IX].

Naprostá většina molekul má základní stav singletní. Tak tomu bude v případě, že jsou ve všech orbitalech spárované elektrony, což je běžná situace. V případě prvního excitovaného stavu se jeden z původně spárovaných elektronů nachází v energeticky bohatším orbitalu. *Potom ale první excitovaný tripletní stav běžné molekuly leží níže než první excitovaný singletní stav*, a to z důvodu energetické výhodnosti antisymetrie prostorové části, probrané výše.

Ovšem molekula O_2 je jednou z výjimek a její základní stav je triplet. Jak to lze vysvětlit? Jednotlivé molekulové orbitaly molekuly O_2 vidíme rozkreslené na obrázku 3.1. O_2 je homonukleární dvouatomová molekula. Díky její vysoké symetrii dochází k degeneraci vazebních orbitalů π_x a π_y , stejně tak jsou degenerované jím odpovídající antivazebné orbitaly π_x^* a π_y^* . Energeticky nejnižší základní stav proto nebude se spárovanými elektrony. V základním stavu budou orbitaly π_x a π_y obsazeny po jednom elektronu, přičemž jejich spinovou funkcí bude triplet. První excitovaný stav bude singlet, kdy orbital π_x obsahuje spárované elektrony. Všimněme si, že O_2 v základním stavu je vlastně biradikál. Nakreslíme-li si podobné schéma jako 3.1 například pro molekuly N_2 či Cl_2 , snadno nahlédneme, že zde základní stav je singlet a k anomálii na rozdíl od O_2 nedochází.

Základní stav běžné molekuly je singlet a nejnižší excitovaný je triplet. Základní stav molekuly kyslíku je triplet a nejnižší excitovaný je singlet. V obou případech se základní a excitovaný stav liší spinovou multiplicitou. Z toho plyne zakázanost optického přechodu mezi těmito stavami. Zakázanost optického přechodu singlet \leftrightarrow triplet dostaneme díky ortogonalitě singletních a tripletních spinových funkcí. Při vyšetřování pravděpodobnosti přechodu z počátečního stavu $|p\rangle$ do koncového stavu $|k\rangle$ je zpravidla užíván časový poruchový počet, jehož výsledkem je soustava diferenciálních rovnic pro koeficienty $c_k(t)$ rozvoje vlnové funkce $|\Psi(t)\rangle$ do vlastních stavů $|\Psi_j^0\rangle$ neporušeného Hamiltoniánu \hat{H}^0 . Máme

$$i\hbar \dot{c}_k(t) = \sum_{j=1}^{\infty} \langle \Psi_j^0 | \hat{W}(t) | \Psi_j^0 \rangle e^{i\omega_{kj} t} c_j(t), \quad (3.2)$$

kde $\omega_{kj} = (E_k - E_j)/\hbar$ a $\hat{W}(t)$ je Hamiltonián poruchy. V dipólovém přiblížení je podle Fermiho pravidla (plynoucího z (3.2)) pravděpodobnost přechodu za jednotku času spontánní emisí ze stavu $|p\rangle$ do $|k\rangle$ úměrná hodnotě $|\langle p|\hat{r}|k\rangle|^2$, kde \hat{r} operátor polohy hraje roli poruchy. Předpokládáme, že počáteční stav je jedním ze stacionárních stavů \hat{H}^0 , tedy $\Psi(t=0) = \Psi_p^0$, nechť je jím triplet. Maticové elementy poruchy $\langle \Psi_k^0 | \hat{W}(t) | \Psi_j^0 \rangle$ jsou vždy nulové mezi libovolným tripletem a singletem, pokud porucha nepůsobí na spinovou část vlnové funkce, jako tomu je třeba v dipólovém přiblížení. Koeficienty $c_j(t)$ odpovídající singletním stavům potom zůstávají podle (3.2) po celou dobu nulové a pravděpodobnost optického přechodu singlet \leftrightarrow triplet je na základě uvedeného nulová; hovoříme o spinově zakázaném přechodu. Například i chemické reakce zpravidla ochotněji probíhají mezi reagenty se stejnou spinovou multiplicitou.

Při konstrukci vlastních funkcí neporušeného Hamiltoniánu jsme předpokládali, že \hat{H}^0 nepůsobí na spin, a také jsme předpokládali, že ani porucha nepůsobí na spin. To však v reálné situaci jistě není pravda; uplatňuje se spin-orbitální interakce, interakce spinu s magnetickým polem a Hamiltonián obecně obsahuje členy, pro něž (3.1) nejsou vlastními stavy. Vlastní stavy celkového \hat{H} proto nejsou čistě singlety či triplety, ale jsou do určité míry vždy smíšené, a hodnota $\langle p|\hat{r}|k\rangle$ není nulová. Pravděpodobnosti optických přechodů singlet \leftrightarrow triplet jsou potom sice malé, ale nenulové.

3.2 Klasifikace stavů ${}^1\text{O}_2$

V literatuře se v případě singletního kyslíku často setkáme s klasifikací stavů pomocí spektroskopických termů, která je přizpůsobena pro popis homonukleárních dvouatomových molekul.

Například základní stav se značí ${}^3\Sigma_g^-$. Označení Σ udává, že výsledný průměr orbitalního momentu ve směru osy molekuly je nulový. Levý horní index odpovídá hodnotě výrazu $2S+1$, kde S je číslo kvantující kvadrát celkového momentu hybnosti. Zde je tedy $S = 1$ a jedná se o tripletní stav. Písmeno g (gerade) říká, že celková vlnová funkce je sudá při inverzi vůči středu molekuly, písmeno u (ungerade) by značilo lichost při inverzi. Symbol $-$ značí lichost (+ sudost) při zrcadlení vůči rovině procházející spojnicí jader.

První excitovaný singlet se pak značí ${}^1\Delta_g^+$, kde Δ znamená, že číslo kvantující výsledný průměr orbitalního momentu ve směru osy molekuly je rovno dvěma. Další text se přidrží uvedené klasifikace a singletní stav molekuly kyslíku bude v některých případech značen zjednodušeně Δ .

Zavedení použité klasifikace viz například [34].

3.3 Vznik ${}^1\text{O}_2$ fotosensibilizačním procesem

PS je látka, jejíž světelně excitovaný stav je schopný předat energii kyslíku za vzniku ${}^1\text{O}_2$. PS jsou zpravidla látky vykazující silnou fosforenci.

Základní stav molekuly PS je singlet, stejně jako pro drtivou většinu ostatních molekul. Stejnemu elektronovému stavu molekuly mohou odpovídat různé jaderné vibrační stavy, což vede k jemnějšímu štěpení molekulárních energetických hladin. V základním stavu je energie jaderných vibrací dána tepelnou rovnováhou s okolím. Při absorpci fotonu přechází základní singlet v první excitovaný singlet ${}^1\text{PS}^*$. Pokud excitace proběhne do vyššího excitovaného

stavu, rychlým nezářivým přechodem molekula zpravidla přejde do prvního excitovaného stavu a zároveň může být vybuzena do vyšší jaderné vibrační hladiny. Energie jaderných vibrací velice rychle disipuje a v nanosekundových časových škálách přechází molekula do rovnovážného vibračního stavu.

Ze stavu ${}^1\text{PS}^*$ přechází bud' do základního stavu fluorescencí nebo vnitřní konverzí, případně nezářivým mezisystémovým přechodem do tripletního stavu, jehož energie je zpravidla menší než pro excitovaný singlet, jak bylo ukázáno v kapitole 3.3. Vnitřní konverzí se míní samovolný přechod v rámci látky mezi stavy shodné spinové multiplicity, v případě mezisystémového přechodu se jedná o přechod v rámci látky mezi stavy rozdílné spinové multiplicity. Optický přechod z tripletu PS do základního singletu je spinově zakázán a hovoříme o metastabilním tripletním stavu, jehož doba života je řádově větší než doba života ${}^1\text{PS}^*$. Blíže k excitovaným singletům a tripletům v [18].

Nyní dochází ke stežejnímu momentu. Triplet barviva je schopný interagovat se základním stavem O_2 , rovněž tripletem, za vzniku ${}^1\text{O}_2$ při současném přechodu fotosensibilizátoru do základního, singletního stavu. Povšimněme si, že se jedná o interakci stavů se stejnou spinovou multiplicitou, což je umožněno anomalitou základního stavu kyslíku, a přenos energie z ${}^3\text{PS}$ na kyslík je spinově povolen.

Pro efektivní fotosensibilizaci je výhodné, aby energetický rozdíl mezi ${}^3\text{PS}$ a základním stavem ${}^1\text{PS}$ byl o málo větší než energetický rozdíl mezi základním ${}^3\text{O}_2$ a ${}^1\text{O}_2$, tak, aby proces probíhal dostatečně rychle, a zároveň dostatečně velký na to, aby proces neprobíhal i opačným směrem. Schematicky je fotosensibilizační proces znázorněn na obrázku 3.2.

Účinnost PS lze vyjádřit pomocí kvantového výtěžku Φ singletního kyslíku, který je definován $\Phi = N_{\text{O}_2}/N_a$, kde N_a je počet absorbovaných kvant záření molekulou PS a N_{O_2} je počet vygenerovaných molekul ${}^1\text{O}_2$. Kvantový výtěžek závisí jednak na podílu molekul PS, které projdou mezisystémovým přechodem singlet \rightarrow triplet, jednak na podílu tripletních stavů PS, jež dají vznik molekule ${}^1\text{O}_2$.

Jako PS může v živých organismech působit mnoho různých molekul, které jsou schopny fosforescence. Příklady jsou porfyriny, chlorofily či riboflavin. Fotosensibilizační proces tedy v organismech běžně probíhá, aniž bychom zasahovali. Pro aplikace, jako je třeba PDT (je diskutováno v kapitole 2.7), se samozřejmě užívají PS s vysokým kvantovým výtěžkem ${}^1\text{O}_2$ a dalšími speciálními vlastnostmi. Aplikačně hojně užívanými PS jsou například deriváty fluoresceinu nebo různé deriváty porfyrinů, jako protoporfyrin IX nebo hematoporfyrin (photofrin). V experimentální části práce je použit tetra-fenyl-porfin (TPP).

3.4 Rychlostní konstanty pro vznik a zánik ${}^3\text{PS}$ a ${}^1\text{O}_2$

Ve středu našeho zájmu jsou cesty vzniku a zániku ${}^1\text{O}_2$. V kapitole 3.3 byl popsán způsob vzniku ${}^1\text{O}_2$ fotosensibilizačním procesem pomocí PS. Množství ${}^1\text{O}_2$ přítomné v systému je rovněž silně ovlivněno dalšími přítomnými chemikáliemi, např. rozpouštědlem nebo takzvanými zhášeči (quencher, značeno Q), což jsou látky regulující koncentraci a vznik ${}^1\text{O}_2$, tedy třeba právě antioxidanty.

V použitém experimentálním uspořádání se k vybuzení PS užívá pulsního laseru. Popišme si stručně pochody, které se dějí ve směsi rozpouštědla, PS, Q a kyslíku po aplikaci laserového pulsu. Laserový puls excituje PS ze základního singletního stavu (${}^1\text{PS}$) do excitovaného singletního stavu ${}^1\text{PS}^*$. Část ze stavu ${}^1\text{PS}^*$ přejde fluorescencí nebo vnitřní konverzí zpět do základního stavu a část přejde mezisystémovým přechodem do tripletního stavu ${}^3\text{PS}$, který

má větší energii než základní stav, ale nižší než ${}^1\text{PS}^*$. Tyto děje se uskutečňují v časové škále odpovídající době života stavu ${}^1\text{PS}^*$, čemuž přímo odpovídá doba života fluorescence, která činí zpravidla rádově nanosekundy až desítky nanosekund [18].

Tripletní stav ${}^3\text{PS}$, první excitovaný singletní stav ${}^1\text{PS}^*$ a základní singletní stav ${}^1\text{PS}$ budeme někdy pro úspornost značit po řadě T_1 , S_1 , S_0 .

Metastabilní stav ${}^3\text{PS}$ může přejít zpět do základního stavu ${}^1\text{PS}$ několika cestami. Každé této cestě zániku je možné přisoudit určitou rychlostní konstantu k_i . Pro naše účely rychlostní konstantu k_i definujeme vztahem $R_i = k_i N$, kde N je počet molekul v původním stavu a R_i je počet rozpadů tohoto stavu za jednotku času po té které cestě; k_i má rozměr $[\text{s}^{-1}]$. Uvažujeme-li pouze zánik původního stavu molekuly, lze psát $\frac{d}{dt}N = -N \sum k_i$, řešením je $N(t) = \exp(-t \sum k_i)$. Doba života τ původního stavu, definovaná jako čas, za který koncentrace klesne na $1/e$, je potom dána $\tau = 1 / \sum k_i$. Rychlostní konstanta může rovněž záviset například na koncentraci nějaké chemické látky, třeba $[\text{Q}]$. Potom platí $R_i = k_i [\text{Q}] N$ a samotné k_i má rozměr $[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$.

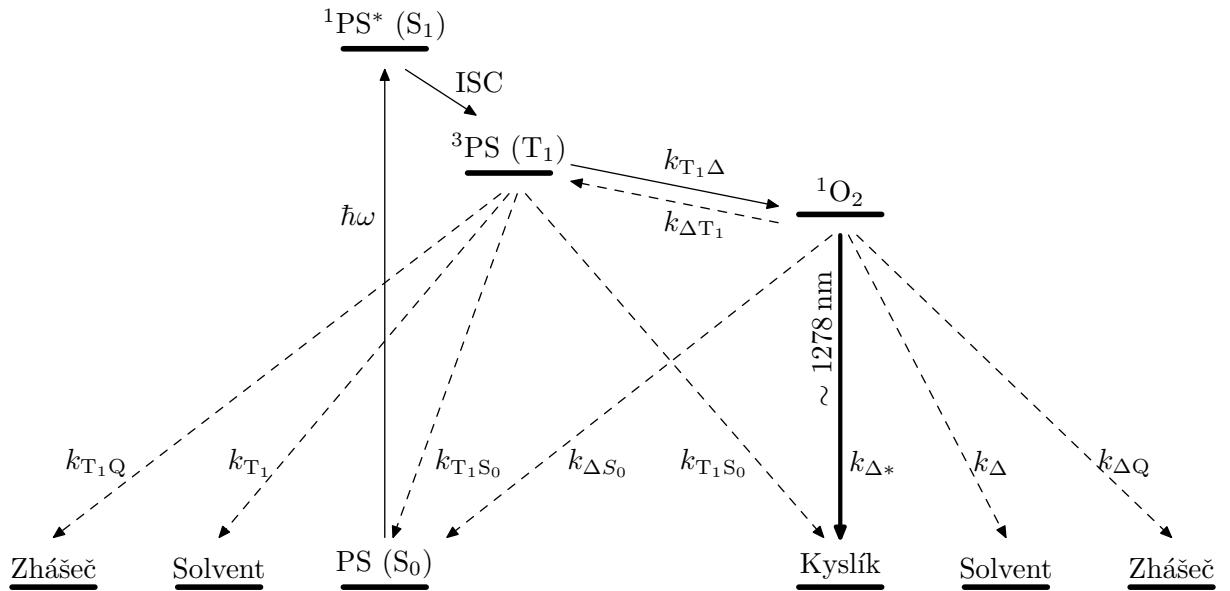
V úvahu jsou vzaty následující cesty zániku ${}^3\text{PS}$ spolu s jejich rychlostními konstantami:

1. $k_{\text{T}_1\Delta}$... nezářivě interakcí s ${}^3\text{O}_2$, molekulárním kyslíkem v základním stavu, za vzniku ${}^1\text{O}_2$.
2. $k_{\text{T}_1\text{Q}}$... nezářivě interakcí se zhášečem Q .
3. k_{T_1} ... nezářivě interakcí s rozpouštědlem a mezisystémovým přechodem s následnou vnitřní konverzí.
4. $k_{\text{T}_1\text{S}_0}$... nezářivě deaktivací základním singletním stavem PS.
5. $k_{\text{T}_1\text{O}_2}$... nezářivě deaktivací základním stavem kyslíku, kdy ${}^1\text{O}_2$ nevzniká.
6. k_{T_1*} ... zářivě fosforescencí, tento zářivý přechod je spinově zakázán, protože se mění spinová multiplicita.
7. k_{TT} ... interakce ${}^3\text{PS}$ s ${}^3\text{PS}$ za vzniku základního stavu PS a ${}^1\text{PS}^*$, kterou nazveme triplet-tripletovou anihilací. Následně může docházet ke zpožděné fluorescence.

Fosforescenční přechod ${}^3\text{PS}$ do ${}^1\text{PS}$ je zaznamenán použitým experimentálním zařízením.

Při prvním procesu vzniká ${}^1\text{O}_2$, který se dále postupně rozpadá (zaniká) prostřednictvím obdobných procesů jako výše. Jsou zavedeny rychlostní konstanty:

1. $k_{\Delta\text{T}_1}$... nezářivě interakcí s S_0 , základním stavem PS, za vzniku T_1 .
2. $k_{\Delta\text{Q}}$... nezářivě interakcí se zhášečem Q .
3. k_{Δ} ... nezářivě interakcí s rozpouštědlem a mezisystémovým přechodem s následnou vnitřní konverzí.
4. $k_{\Delta\text{S}_0}$... nezářivě deaktivací základním singletním stavem PS.
5. $k_{\Delta\text{O}_2}$... nezářivě deaktivací základním stavem kyslíku.
6. $k_{\Delta*}$... zářivě fosforescencí, tento zářivý přechod je opět spinově zakázán.



Obr. 3.2: Schéma rozpadu T_1 a 1O_2 : Znázornění významu jednotlivých rychlostních konstant, které jsou popsány v textu. Plná šipka označená $\hbar\omega$ znázorňuje absorpci, ISC (intersystem crossing) značí mezisystémový přechod. Tučná šipka značí fosforescenci 1O_2 , kterou měříme. Vytvořeno podle obrázku z [1].

Popsané děje jsou zaneseny na obrázku 3.2. Fosforescenční přechody jsou v obou případech velmi slabé a nepodílejí se významně na zániku populace 3PS ani 1O_2 . *Stěžejní pro naše účely ovšem je, že intenzita fosforecence odráží okamžitou velikost populace 3PS respektive 1O_2 , stejně tak jako například intenzita radioaktivního záření přímo odráží počet nerozpadnutých částic v radioaktivním vzorku.*

Časový vývoj populací 3PS a 1O_2 ve vzorku je řízen následujícími diferenciálními rovnicemi:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[^1O_2] &= k_{T_1\Delta}[T_1][^3O_2] - (k_{\Delta T_1}[S_0] + k_{\Delta S_0}[S_0] + k_{\Delta O_2}[^3O_2] + k_\Delta + k_{\Delta*} + k_{\Delta Q}[Q]) [^1O_2] \\ \frac{d}{dt}[T_1] &= k_{\Delta T_1}[^1O_2][S_0] - \\ &\quad - (k_{T_1\Delta}[^3O_2] + k_{T_1 S_0}[S_0] + k_{T_1 O_2}[^3O_2] + k_{T_1} + k_{T_1*} + k_{T_1 Q}[Q] + k_{TT}[T_1]) [T_1] \end{aligned}$$

Vztahy jsou téměř symetrické. V rovnicích vystupují koncentrace $[S_0]$ a $[^3O_2]$, tedy koncentrace základních stavů PS a kyslíku. Při malé intenzitě excitačního pulsu je do stavu T_1 vybuzen jen malý zlomek počtu molekul PS, stejně tak potom fotosensibilizačním procesem vznikne jen malé množství 1O_2 . Koncentrace $[S_0]$ a $[^3O_2]$ lze v tomto přiblížení považovat za konstantní a rovné počáteční koncentrací, jež jsou značeny $[PS]$ a $[O_2]$. Rovněž koncentraci $[Q]$ je možno považovat během děje za konstantní. Člen k_{TT} vyjadřující triplet-tripletovou anihilaci zřejmě narušuje linearitu rovnic, jejichž řešením potom nejsou jednoduše lineární kombinace exponenciál. Triplet-tripletová anihilace nebude pro zjednodušení brána v úvahu.

Oprávněnost uvedených přiblížení bude diskutována v kapitole 6.8. Lze potom psát

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}[T_1] &= -K_{T_1}[T_1] + k_{\Delta T_1}[^1O_2][PS] \\ \frac{d}{dt}[^1O_2] &= -K_\Delta[^1O_2] + k_{T_1\Delta}[T_1][O_2]\end{aligned}\quad (3.3)$$

kde

$$\begin{aligned}K_{T_1} &= k_{T_1\Delta}[O_2] + k_{T_1O_2}[O_2] + k_{T_1} + k_{T_1*} + k_{T_1Q}[Q] \\ K_\Delta &= k_{\Delta T_1}[PS] + k_{\Delta S_0}[PS] + k_{\Delta O_2}[O_2] + k_\Delta + k_{\Delta*} + k_{\Delta Q}[Q]\end{aligned}\quad (3.4)$$

jsou konstanty shrnující možné cesty zániku T_1 resp. 1O_2 . Rovnice (3.3) tvoří homogenní soustavu dvou diferenciálních rovnic s konstantními koeficienty.

Všimněme si ale, že soustava se zjednoduší, pokud bychom uvažovali $k_{\Delta T_1} = 0$; zanedbali bychom takzvaný zpětný přenos. Tento předpoklad je skutečně odůvodněný [1], což bude diskutováno v kapitole 6.8. Konstanta K_{T_1} se nemění a K_Δ přechází v

$$\tilde{K}_\Delta = k_{\Delta S_0}[PS] + k_{\Delta O_2}[O_2] + k_\Delta + k_{\Delta*} + k_{\Delta Q}[Q]\quad (3.5)$$

a soustava (3.3) se zjednoduší na

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}[T_1] &= -K_{T_1}[T_1] \\ \frac{d}{dt}[^1O_2] &= -\tilde{K}_\Delta[^1O_2] + k_{T_1\Delta}[T_1][O_2].\end{aligned}\quad (3.6)$$

Koncentrace $[T_1]$ pouze ubývá ze svých počáteční hodnoty dané excitací laserovým pulsem. Excitace laserem je považována v porovnání s ostatními ději za okamžitou a uvedené diferenciální rovnice tento děj nijak nezachycují. Pro představu, doba trvání pulsu je 7 ns a typické doby života 1O_2 jsou řádově μs až desítky μs . V experimentu navíc prvních cca 100 ns signálu není vůbec vyhodnocováno, jak bude vysvětleno později.

Doby života 1O_2 resp. T_1 jsou dány jako převrácené hodnoty konstant K_Δ resp. K_{T_1} , neboli

$$\tau_\Delta = \frac{1}{K_\Delta} \quad \tau_{T_1} = \frac{1}{K_{T_1}}.\quad (3.7)$$

V kapitole 2.5 bylo zmíněno, že zhášení karotenů je často omezeno rychlostí difuze. Pokud by každá srážka molekuly zhášeče a zhášené molekuly vedla k zániku zhášené molekuly, pak by rychlosť zhášení byla omezena pouze rychlosťí difuze molekul v roztoku. Teoretickou hodnotu rychlostní konstanty odpovídajícího procesu lze přibližně odhadnout Debyovým vztahem

$$k_{\text{dif}} = \frac{8RT}{3\eta},\quad (3.8)$$

kde R je univerzální plynová konstanta, T teplota a η viskozita rozpouštědla [29]; hodnota k_{dif} je v textu rovněž označována jako *difusní limita*. Vztah (3.8) je odvozen ze Stokesovy-Einsteinovy formule za velmi zjednodušujících předpokladů, poskytuje ovšem relativně uspokojivý odhad k_{dif} . V případě, že velikost molekuly zhášeče či zhášené látky je výrazně menší než velikost molekuly rozpouštědla, jak je tomu třeba pro molekulu 1O_2 , Nepraš a Titz [29] doporučují namísto (3.8) použít vztah

$$k_{\text{dif}} = \frac{4RT}{\eta}.\quad (3.9)$$

Lakowicz [25] ovšem uvádí, že uvedené vztahy mohou podhodnocovat difusní limitu pro malé molekuly, jako je právě kyslík.

3.5 Časový vývoj koncentrace ${}^1\text{O}_2$ po excitačním pulsu

Pokusme se na základě teoretického modelu určit, jak bude vypadat časový průběh fosforescence ${}^1\text{O}_2$ a ${}^3\text{PS}$ po aplikaci laserového pulsu. Snažme se také zjistit, jak z naměřených hodnot získat rychlostní konstanty zhášecích procesů probíhajících po vybuzení PS do tripletového stavu.

Případ $k_{\Delta T_1} = 0$

Po aplikaci krátkého laserového pulsu v čase $t = 0$ dostaneme určitou koncentraci $[T_1]$ tripletových stavů PS v roztoku. Populace T_1 zaniká různými kanály, jak bylo uvedeno výše, přičemž jedním z kanálů je interakce s ${}^3\text{O}_2$ vedoucí ke vzniku ${}^1\text{O}_2$. Koncentrace T_1 je dána exponenciálním poklesem podle vztahu

$$[T_1](t) = [T_1]_0 e^{-K_{T_1} t}, \quad t > 0,$$

kde $[T_1]_0$ je koncentrace ${}^3\text{PS}$ těsně po excitaci laserem v čase 0. Rychlosť vzniku ${}^1\text{O}_2$, kterou popíšeme funkcí $f(t)$, je dána

$$\begin{aligned} t > 0, \quad f(t) &= k_{T_1 \Delta} [T_1] = k_{T_1 \Delta} [T_1]_0 e^{-K_{T_1} t}. \\ t < 0, \quad f(t) &= 0. \end{aligned}$$

Vzniklý ${}^1\text{O}_2$ se poté opět exponenciálně rozpadá různými kanály, přičemž rozpadová funkce $g(t)$, vyjadřující pravděpodobnost přežití po čas t od vzniku, je určena vztahem

$$\begin{aligned} t > 0, \quad g(t) &= e^{-\tilde{K}_\Delta t}, \\ t < 0, \quad g(t) &= 0. \end{aligned}$$

Koncentrace $[{}^1\text{O}_2](t)$ je dána konvolucí funkcí $f(t)$ a $g(t)$. Lze proto psát

$$[{}^1\text{O}_2](t) = f(t) * g(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau)g(t - \tau)d\tau = g(t) \int_0^t f(\tau)g(-\tau)d\tau,$$

kde při úpravě integračních mezí bylo využito nulovosti funkcí f, g v záporných časech. Dále dosadíme za f a g , upravíme a integrál spočteme.

$$\begin{aligned} [{}^1\text{O}_2](t) &= [T_1]_0 k_{T_1 \Delta} e^{-K_{T_1} t} * e^{-\tilde{K}_\Delta t} = [T_1]_0 k_{T_1 \Delta} e^{-\tilde{K}_\Delta t} \int_0^t e^{(\tilde{K}_\Delta - K_{T_1})\tau} d\tau \\ &= [T_1]_0 \frac{k_{T_1 \Delta}}{\tilde{K}_\Delta - K_{T_1}} e^{-\tilde{K}_\Delta t} (e^{(\tilde{K}_\Delta - K_{T_1})t} - 1) \\ &= [T_1]_0 \frac{k_{T_1 \Delta}}{K_{T_1} - \tilde{K}_\Delta} (e^{-\tilde{K}_\Delta t} - e^{-K_{T_1} t}). \end{aligned} \tag{3.10}$$

Ke stejnemu vztahu pro $[{}^1\text{O}_2](t)$ lze samozřejmě snadno dojít i řešením (3.6), homogenní soustavy lineárních diferenciálních rovnic 1. rádu.

Přesně vzato, koncentrace T_1 v čase není ani při zanedbání zpětného přenosu dána jednoduše exponenciálním poklesem, ale dokonce konvolucí tří funkcí, konkrétně konvolucí

časového průběhu excitačního pulsu, časového průběhu vzniku T_1 z S_1 a konečně exponenciálního zániku T_1 . Na experimentem zkoumaných časových škálách lze však koncentraci T_1 považovat za jednoduše exponenciálně klesající.

Je zřejmé, že naměřením časového průběhu fosforecence 1O_2 při různých koncentracích $[Q]$, $[O_2]$, $[PS]$ lze fitováním podle modelu (3.10) získat hodnoty K_Δ a K_{T_1} v závislosti na těchto koncentracích. Následným fitováním závislostí $K_\Delta([Q])$, $K_\Delta([PS])$, $K_{T_1}([O_2])$ aj. podle modelu (3.4) je možno spočítat další jednotlivé rychlostní konstanty. Experimentu je omezen jen na změnu $[Q]$ a je pak možno spočítat pouze konstanty $k_{\Delta Q}$, $k_{T_1 Q}$ a porovnat je s celkovými K_Δ a K_{T_1} .

Případ $k_{\Delta T_1} \neq 0$

Řešením původní soustavy (3.3) dostáváme

$$\begin{aligned} [{}^1O_2](t) &= \frac{[T_1]_{t=0} k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\lambda_{T_1} - \lambda_\Delta} (e^{-\lambda_\Delta} - e^{-\lambda_{T_1}}) \\ T_1(t) &= \frac{[T_1]_{t=0}}{\lambda_{T_1} - \lambda_\Delta} ((\lambda_{T_1} - K_\Delta)e^{-\lambda_{T_1}} - (K_\Delta - \lambda_\Delta)e^{-\lambda_\Delta}) \\ \lambda_{T_1, \Delta} &= \frac{1}{2}(K_{T_1} + K_\Delta \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_\Delta)^2 + 4k_{T_1 \Delta} k_{\Delta T_1} [O_2][PS]}) \end{aligned} \quad (3.11)$$

odkud lze vyjádřit

$$\begin{aligned} K_{T_1} &= \frac{1}{2} \left(\lambda_{T_1} + \lambda_\Delta + \sqrt{(\lambda_{T_1} - \lambda_\Delta)^2 - 4x} \right) \\ K_\Delta &= \frac{1}{2} \left(\lambda_{T_1} + \lambda_\Delta - \sqrt{(\lambda_{T_1} - \lambda_\Delta)^2 - 4x} \right), \end{aligned}$$

kde $x = k_{T_1 \Delta} k_{\Delta T_1} [O_2][PS]$. Striktně vzato, bez znalosti x nelze pouze z λ_{T_1} , λ_Δ určit konstanty K_Δ , K_{T_1} . Jak postupovat při započtení zpětného přenosu je rozebráno v [1]. Pokud $4x \ll (\lambda_{T_1} - \lambda_\Delta)^2$, potom $K_\Delta \approx \lambda_{T_1}$, $K_{T_1} \approx \lambda_\Delta$.

Kapitola 4

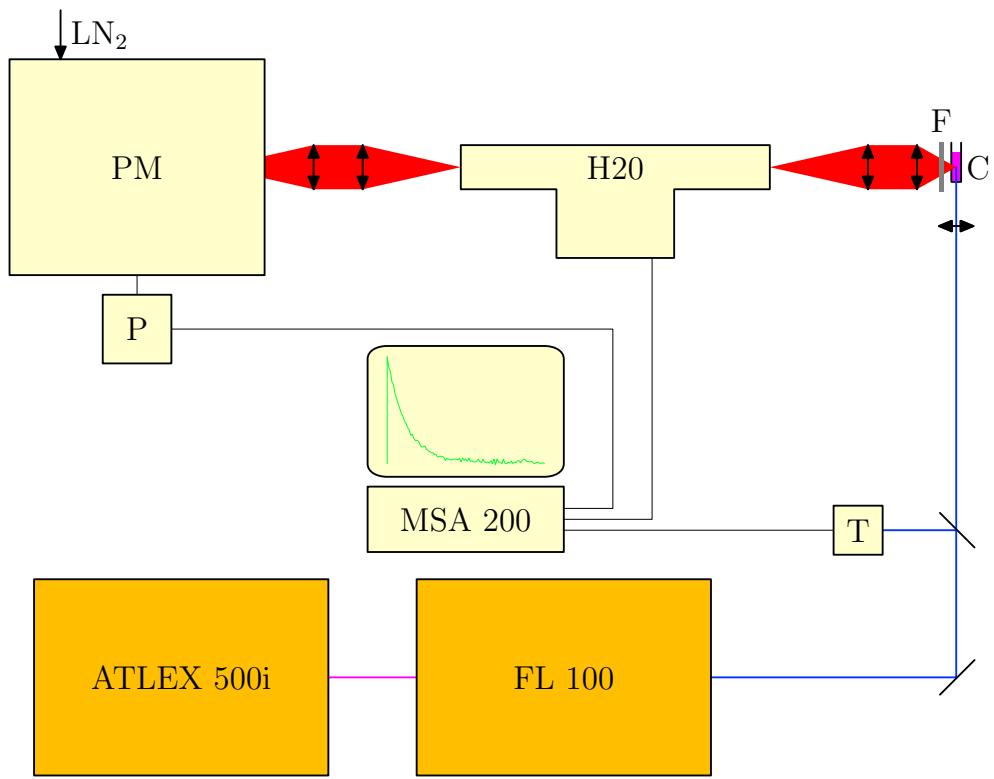
Experimentální uspořádání

Experimentálním cílem práce je vygenerovat v kyvetě singletní kyslík pomocí fotosensibilizátoru, který je aktivován laserem, a následně změřit časový průběh (kinetiku) luminiscence $^1\text{O}_2$ a PS, které jsou spektrálně odděleny.

Na obrázku 4.1 je vidět zjednodušené schema měřící aparatury pro měření časové a spektrálně rozlišené luminiscence v infračervené oblasti. Excimerový laser ATLEX-500i (ATL Lasertechnik) čerpá pulsní barvivový laser FL1000 (Lambda Physik, barvivo Stilben 3), který emisuje UV svazek na vlnové délce 420 nm. Délka脉冲 je 7 ns, energie před vstupem do vzorku se pohybuje v okolí 20 μJ , opakovací frekvence 400 Hz.

Vlnová délka emitovaná laserem leží v oblasti maximální absorpce TPP a je tak vhodná pro jeho aktivaci. Laserový svazek je spojnou čočkou zaostřen do kyvety (10 mm \times 10 mm), přičemž do ní vstupuje opticky leštěným dnem zespoda svislým směrem. Část svazku se od spojené čočky odráží na fotocitlivou PIN diodu. Na PIN diodě, která má velmi krátkou časovou konstantu (řádově několik ns) se pomocí osciloskopu měří napětí. Signál z PIN diody slouží k synchronizaci měření, jak bude uvedeno dále. Laserový puls v kyvetě excituje PS a přenosem excitacní energie dojde ke vzniku $^1\text{O}_2$. Po aplikaci脉冲 dochází k fosforescenci ^3PS a $^1\text{O}_2$ v kyvetě. Fosforescenční fotony jsou soustavou čoček sbírány a zaostrovány a prochází dvojicí dlouhovlnných filtrů (Schott RG 7). Mřížkovým monochromátorem (Jobin-Yvon H20IR) je z fosforescence vybrána požadovaná měřená vlnová délka.

Fosforescence $^1\text{O}_2$ a ^3PS je tak slabá, že její měření vyžaduje čítání jednotlivých fotonů, a proto světlo dále skrz optickou soustavu putuje do fotonásobiče (Hamamatsu R5509) citlivého v IR oblasti, který je kapalným dusíkem chlazen na -80°C . Impulzy z fotonásobiče prochází přes předzesilovač a následně jsou čítány multikanálovým čítačem Becker-Hickl MSA 200 po dobu 300 μs s 5 ns časovým oknem. Časový průběh luminiscence je načten dvěstěkrát, načež jsou data odeslána do PC a čítání začíná znovu. Pro každou měřenou vlnovou délku je načteno 10000 časových průběhů luminiscence, které jsou poté sečteny a tvoří výsledek měření. Celý proces sběru dat je zahájen synchronizačním脉冲em od PIN diody.



Obr. 4.1: Schéma aparatury pro měření luminiscence ${}^1\text{O}_2$: Excimerový laser ATLEX 500i, barvičkový laser FL1000, T je PIN dioda, C kyveta, F dlouhovlnný filtr, monochromátor H20, PM je fotonásobič, P předzesilovač, čítač MSA 200. V kyvetě fotosensibilizací vzniká ${}^1\text{O}_2$, jehož slabá IR luminiscence je měřena.

Kapitola 5

Materiály a příprava vzorků

5.1 Příprava roztoků

Pro měření byla připravena řada roztoků obsahujících TPP, kyslík a proměnnou koncentraci β -karotenu. Jako rozpouštědlo byl použit tetrahydrofuran (THF), výrobce Fluka, čistota pro UV spektroskopii. Množství rozpuštěného kyslíku odpovídá rovnováze se vzduchem (cca 2 mM [15]). THF je použit proto, že se v něm dobře rozpouští jak TPP, tak β -karoten. Bylo připraveno 7 roztoků s proměnnou koncentrací β -karotenu (ampule Sigma Aldrich, katalogové označení C4582, čistota > 95%, syntetický), a to 0, 5, 10, 20, 30, 40 a 50 μM . Ve všech případech roztoky obsahují 100 μM TPP (Frontier Scientific, katalogové označení T614).

Nejprve byl připraven 200 μM roztok TPP v THF. Při přípravě roztoku β -karotenu je třeba postupovat opatrně, vzhledem k jeho tendenci k postupnému rozkladu. Obsah 5 mg ampule β -karotenu byl rozpuštěn v 5 ml THF. Vzniklý roztok byl pomocí mikropipety rovnoměrně rozdělen do pěti mikrozkumavek typu Eppendorf. Roztoky určené pro pozdější měření byly vysušeny stlačeným dusíkem a v mikrozkumavkách zůstalo dobře definované množství krystalického β -karotenu, který je stálejší než v roztoku; β -karoten byl opět rozpuštěn v THF až těsně před přípravou výsledného roztoku. Do kyvety byl odpipetován 1 ml zásobního 200 μM roztoku TPP, bylo přidáno potřebné množství roztoku β -karotenu a doplněno do množství 2 ml čistým THF. Chyba v přípravě koncentrace β -karotenu byla odhadnuta přibližně na 1%.

5.2 Spektrální vlastnosti použitých látek

β -karoten vykazuje charakteristický absorpční pás (cca 400 nm až 550 nm) s vibrační strukturou odpovídající absorpci do stavu S_2 . Jednofotonový přechod mezi S_0 a S_1 (~ 830 nm [3]) je zakázaný. Stav S_2 přechází velice rychle vnitřní konverzí do S_1 a ten opět rychlým přechodem ($\sim \text{ps}$) do S_0 . Velmi malý kvantový výtěžek fluorescence se pohybuje v rázech 10^{-5} [3, 10, 14], emise vykazuje slabý Stokesův posun. Fosforecence β -karotenu je rovněž slabá a na vlnové délce $\lambda = (1360 \pm 40)$ nm [26], první excitovaný triplet karotenu má tak v souladu s kapitolou 2.5 menší energii než první singlet kyslíku.

TPP vykazuje nejsilnější absorpci v oblasti okolo 420 nm a fosforecenční emisi mezi 800 nm a 900 nm [21], což odpovídá přechodu z T_1 do S_0 . Maximum fosforecence $^1\text{O}_2$ se objevuje v okolí 1278 nm. Pro selekci vlnové délky při měření je užita difrakční mřížka. Fosforecence TPP ani β -karotenu do měření na 1278 nm nezasahuje, stejně tak vyšší difrakční rády. Částečně by luminiscence $^1\text{O}_2$ mohla být překryta druhým či třetím rádem fluorescence β -karotenu a TPP, doba života fluorescence je však zanedbatelně krátká oproti zkoumaným časovým škálám.

Kapitola 6

Výsledky měření a diskuse

6.1 Experimentální protokol

Pro každý vzorek bylo provedeno měření na dvou rozsazích vlnových délek. Nejprve byl vzorek podroben měření na vlnových délkah 1242 nm až 1306 nm, tedy v okolí maxima fosforecence $^1\text{O}_2$, s krokem 4 nm, dále bylo provedeno měření na širším rozsahu 750 nm až 1350 nm s krokem 16 nm, kde se objevuje i fosforecence TPP. Časová závislost luminiscence s 5 ns časovým rozlišením, hlavní výstup měření, byla získána postupem popsaným v kapitole 4.

Po dobu 110 ns nebyl detekován žádný impuls, tato doba budiž označena jako t_0 . Měření se totiž spouští v okamžiku, kdy fotodioda zaznamená laserový puls. Jedná se o rychlou PIN diodu a celková prodleva mezi začátkem laserového pulsu a začátkem měření je maximálně v řádu jednotek ns. Průchod signálu mezi katodou a anodou fotonásobiče již ovšem není tak rychlý, což způsobuje zmíněné zpoždění, které však není nikterak na závadu. Čas t_0 je charakteristický pro měřící aparaturu a nezávisí na měřeném vzorku.

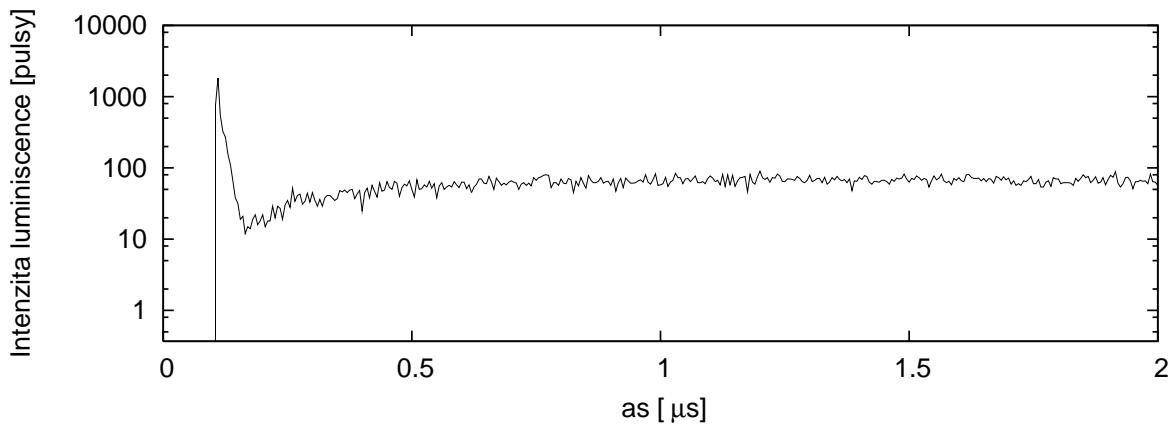
Počátek časové osy, časová nula, je posunut do okamžiku, kdy začíná být přijímán signál luminiscence, tedy 110ns po startovním signálu.

Mezi časy $t = 0$ ns až cca $t = 30$ ns byl naměřen velmi silný signál pocházející z fluorescence látek ve směsi a rozptyleného záření excitačního laseru. V čase 0 ns již samozřejmě začínaly být detekovány i fotony pocházející z fosforecence $^1\text{O}_2$, signál fosforecence byl však překryt mnohem silnější fluorescencí, která ale rychle dohasíná. V grafu 6.1 je zanesen signál během prvních 2 μs v logaritmické škále.

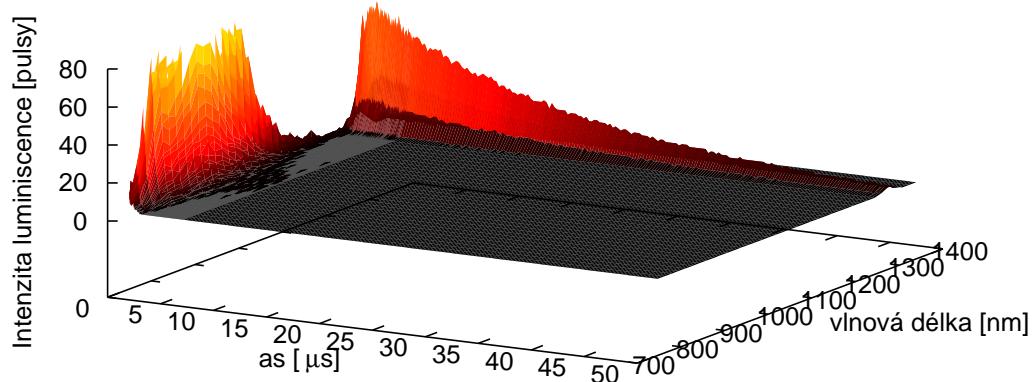
Celková doba načítání signálu po excitačním pulsu činila 300 μs . V druhé polovině tohoto intervalu bylo již zpravidla detekováno pouze pozadí, protože čas řádově stovky μs je výrazně větší než doba života $^1\text{O}_2$, která činí v případě bez zhášeče přibližně 17 μs , jak se ukáže později. Úroveň pozadí byla nízká a činila v průměru asi jeden impuls za 500 ns.

Časová závislost luminiscence byla měřena pro 7 různých koncentrací β -karotenu, a to 0, 5, 10, 20, 30, 40 a 50 μM . Pro každou koncentraci β -karotenu lze dostat 3D graf závislosti intenzity na vlnové délce a čase, příklady je vidět v grafech 6.2, 6.3, 6.4. V grafu 6.2 je v měřené spektrální oblasti patrný jednak široký pás fosforecence ^3PS mezi vlnovými délками 800 nm a 1100 nm, která rychle dohasíná, jednak užší pás fosforecence $^1\text{O}_2$, která má znatelně delší dobu života. Z grafu 6.3 je zřejmé zkrácení doby života $^1\text{O}_2$ při vyšší koncentraci β -karotenu, graf 6.4 poskytuje detail fosforecence $^1\text{O}_2$. Vykreslená data nejsou z důvodu názornosti grafů opravena na citlivost spektrometru.

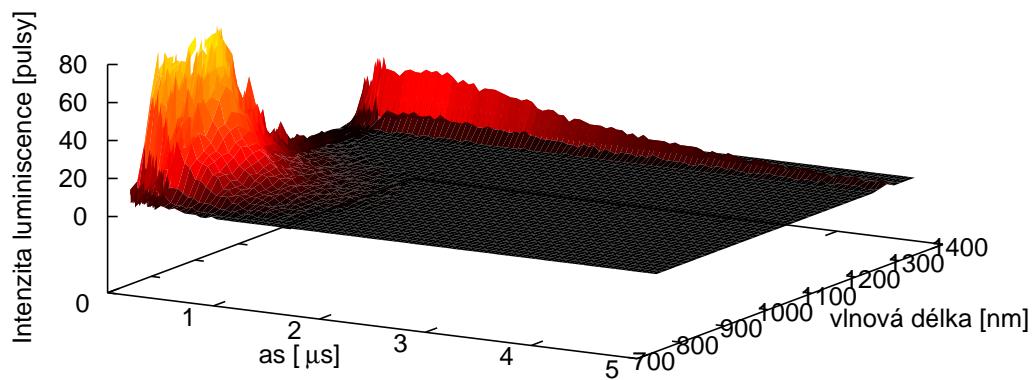
Graf 6.5 zobrazuje spektrum fosforecence jak ^3PS , tak $^1\text{O}_2$, přičemž naměřená data jsou opravena na spektrální citlivost aparatury. Vnesené hodnoty odpovídají intenzitě fosforecence v jejím maximu, která je určena na základě modelových funkcí proložených kinetikami fosforecence, do zpracování jsou zahrnuty i kinetiky pro nenulovou koncentraci β -karotenu.



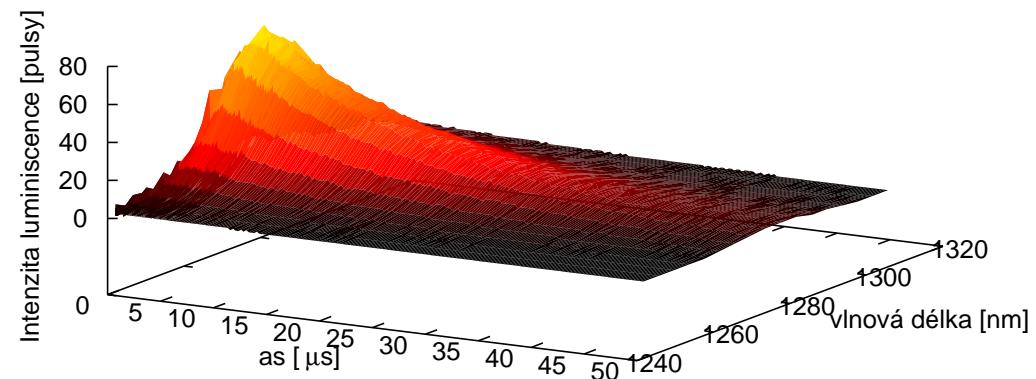
Graf 6.1: První $2\text{ }\mu\text{s}$ signálu při měření luminiscence ${}^1\text{O}_2$ v logaritmické škále, měřeno pro $\lambda = 1278\text{ nm}$ a nulovou koncentrací β -karotenu: Prvních 100 ns nebyl detekován žádný signál, poté byla pozorována silná fluorescence roztoku a rozptýlené záření, po jejím dohasnutí byla patrná fosforecence ${}^1\text{O}_2$, která měla zpočátku narůstající charakter.



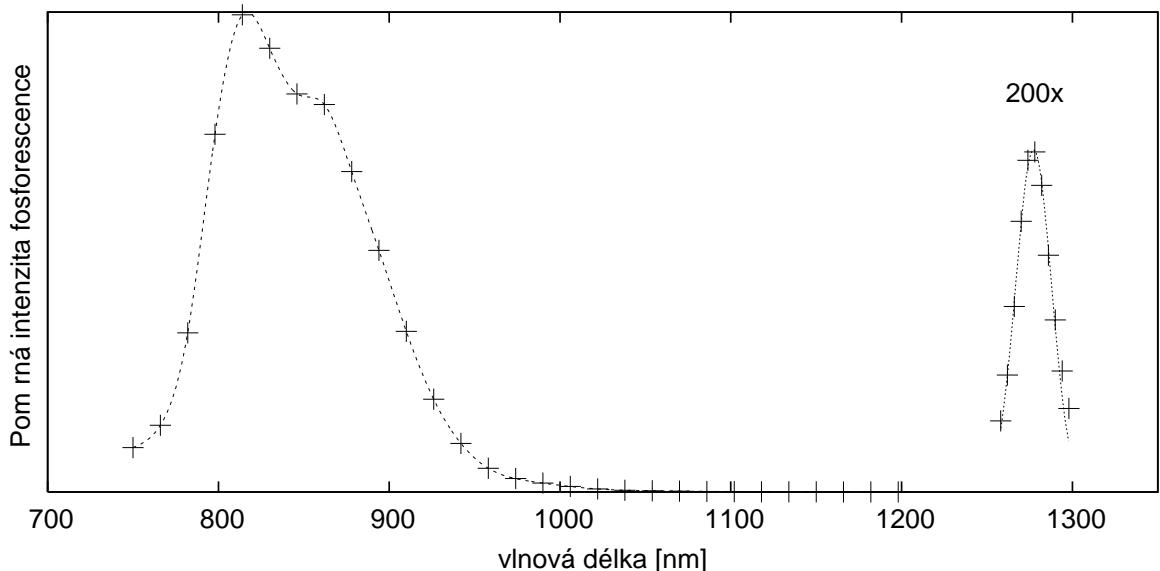
Graf 6.2: Časově a spektrálně rozlišená luminiscence vzorku, $[\beta\text{-karoten}] = 0\text{ }\mu\text{M}$: Vykreslování začíná v čase 100 ns, pro potlačení kolísání naměřených hodnot intenzity luminiscence jsou data vždy zprůměrována v rámci pěti časových okének, tedy pětadvaceti ns. Je patrné dlouhé dohasínání fosforecence ${}^1\text{O}_2$ v okolí 1278 nm a mnohem kratší dohasínání fosforecence ${}^3\text{PS}$ v okolí 900 nm. Vykreslená data nejsou z důvodu názornosti obrázku opravena na citlivost spektrometru.



Graf 6.3: Časově a spektrálně rozlišená luminiscence vzorku, $[\beta\text{-karoten}] = 50 \mu\text{M}$: Je vidět evidentně zkrácená doba života luminiscence $^1\text{O}_2$, v dané časové škále lze pozorovat také fosforenci ^3PS . Vykreslená data nejsou z důvodu názornosti obrázku opravena na citlivost spektrometru.



Graf 6.4: Časově a spektrálně rozlišená luminiscence vzorku, $[\beta\text{-karoten}] = 50 \mu\text{M}$, detail luminiscence $^1\text{O}_2$.



Graf 6.5: Poměrná intenzita fosforecence v jejím maximu v závislosti na měřené vlnové délce. Hodnota intenzity fosforecence v jejím maximu je určena na základě modelových funkcí proložených kinetikami fosforecence. Spektrum fosforecence $^1\text{O}_2$ je vynásobeno 200× a proloženo Gaussovou funkcí, spektrum fosforecence ^3PS je proloženo kubickou interpolační křivkou.

6.2 Luminiscence $^1\text{O}_2$ – měření v rozsahu 1242 nm až 1306 nm

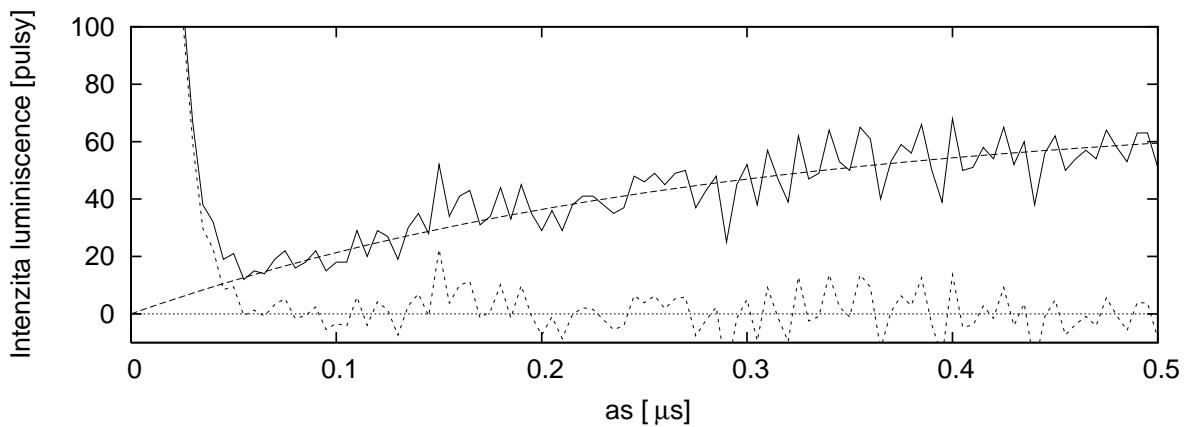
Zaměřme se na první sadu měření z rozmezí 1242 nm až 1306 nm s krokem 4 nm. V daném rozsahu vlnových délek se objevuje fosforecence $^1\text{O}_2$. Pro časový průběh fosforecence byl na základě teoretického modelu získán vztah (3.10) na straně 22; bude použit model se zanedbáním zpětného přenosu. Naměřené kinetiky fosforecence $^1\text{O}_2$ jsou proto fitovány funkci

$$f(t) = N(e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau_{T_1}}), \quad (6.1)$$

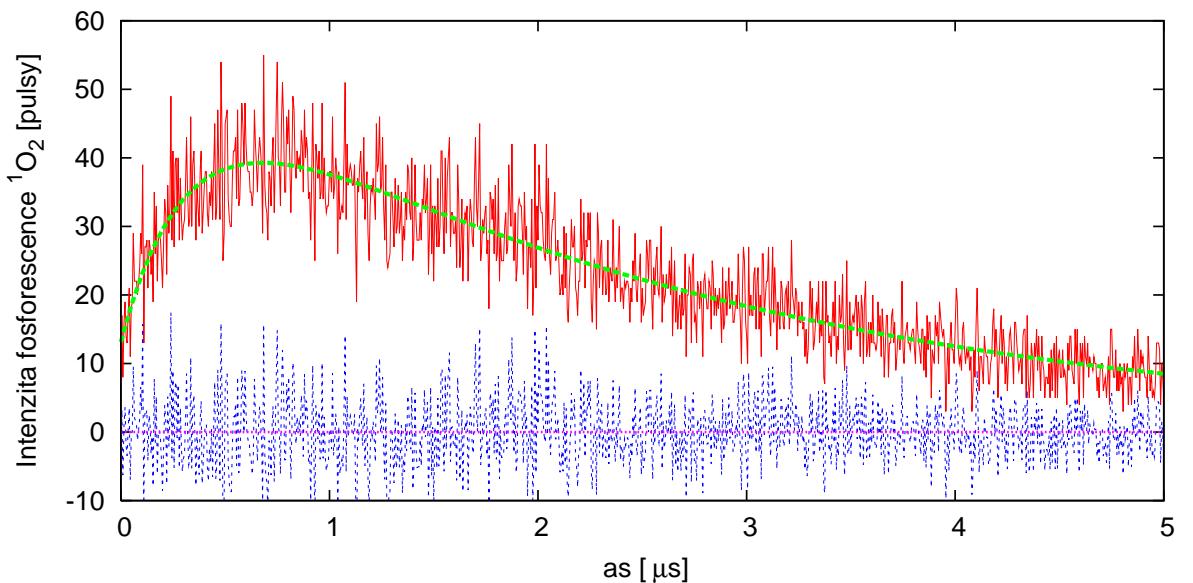
přičemž fitovací parametry jsou N , τ_{T_1} , τ_Δ . Parametry τ_{T_1} a τ_Δ odpovídají, za předpokladu $\tau_{T_1} < \tau_\Delta$, po řadě době života ^3PS a $^1\text{O}_2$, jak bylo ukázáno v kapitole 3.4. Fitovací parametr τ_{T_1} bude někdy nazýván dobou nárůstu kyslíku. Pokud $\tau_{T_1} > \tau_\Delta$, význam parametrů se prohodí, jak plyne z (3.10).

Kinetiku není možno fitovat od času $t = 0$ kvůli rušivému signálu fluorescence. Graf 6.6 vyobrazuje naměřenou kinetiku luminiscence vzorku bez β -karotenu na vlnové délce 1278 nm, nafitovanou podle modelu (6.1) při počátečním čase fitování 250 ns. Lze odhadnout, že je možné začít fitovat v čase $t_{\text{fit}} \approx 100$ ns, který lze použít pro všechna měření bez ohledu na vlnovou délku a koncentraci β -karotenu.

Doba života fosforecence $^1\text{O}_2$ v roztoku bez β -karotenu je přibližně 17 μs , při předpokladu exponenciálního poklesu síla signálu klesne pod úroveň 10^{-3} impulsů v časovém okénku pro $t > 200 \mu\text{s}$. V intervalu od 200 μs do 300 μs bylo naměřeno cca $n = 200$ impulsů, úroveň signálu byla tedy 10^{-2} impulsů v časovém okénku a lze ji považovat za pozadí. Počet impulsů pozadí v určitém časovém intervalu je Poissonovsky rozdelený s odchylkou rovnou \sqrt{n} , což



Graf 6.6: Předběžný fit odečtený od naměřené kinetiky luminiscence ${}^1\text{O}_2$: Plnou čarou je znázorněna naměřená kinetika luminiscence vzorku bez β -karotenu na vlnové délce 1278 nm, čárkovaně fit podle modelu (6.1) při počátečním čase fitování 250 ns, tečkovaně rozdíl naměřených dat a naftované funkce.



Graf 6.7: Typický měřený signál fosforecence ${}^1\text{O}_2$ pro $\lambda = 1278 \text{ nm}$ a $30 \mu\text{M}$ β -karotenu: Červeně je znázorněna naměřená kinetika fosforecence, zeleně fit podle modelu (6.1), modře rozdíl naměřených dat a naftované funkce. Model dobře odpovídá naměřeným datům.

se experimentálně potvrdilo při analýze velkého množství kinetik. Počet luminiscenčních impulsů zaznamenaných v jednom časovém okénku je zřejmě také Poissonovsky rozdělený, což bylo ověřeno porovnáním počtu impulsů v několika sousedních okénkách. Hodnota pozadí byla spočtena pro každou kinetiku zvlášť a před fitováním podle (6.1) byla odečtena od naměřeného signálu. Úroveň pozadí byla nízká a neměnila se výrazně se změnou λ .

Pro každou koncentraci β -karotenu byly naměřeny kinetiky fosforecence $^1\text{O}_2$ na různých vlnových délkách. Typický časový průběh signálu je vidět v grafu 6.7. Signál fosforecence $^1\text{O}_2$ (viz graf 6.5) je nejsilnější pro vlnovou délku $\lambda = (1277,5 \pm 0,5)$ nm, přičemž tato hodnota je vypočtena fitováním získaného spektra fosforecence Gaussovou funkcí. Pro další zpracování byly použity signály v rozmezí 1258 nm až 1298 nm, což je dohromady 11 různých vlnových délek.

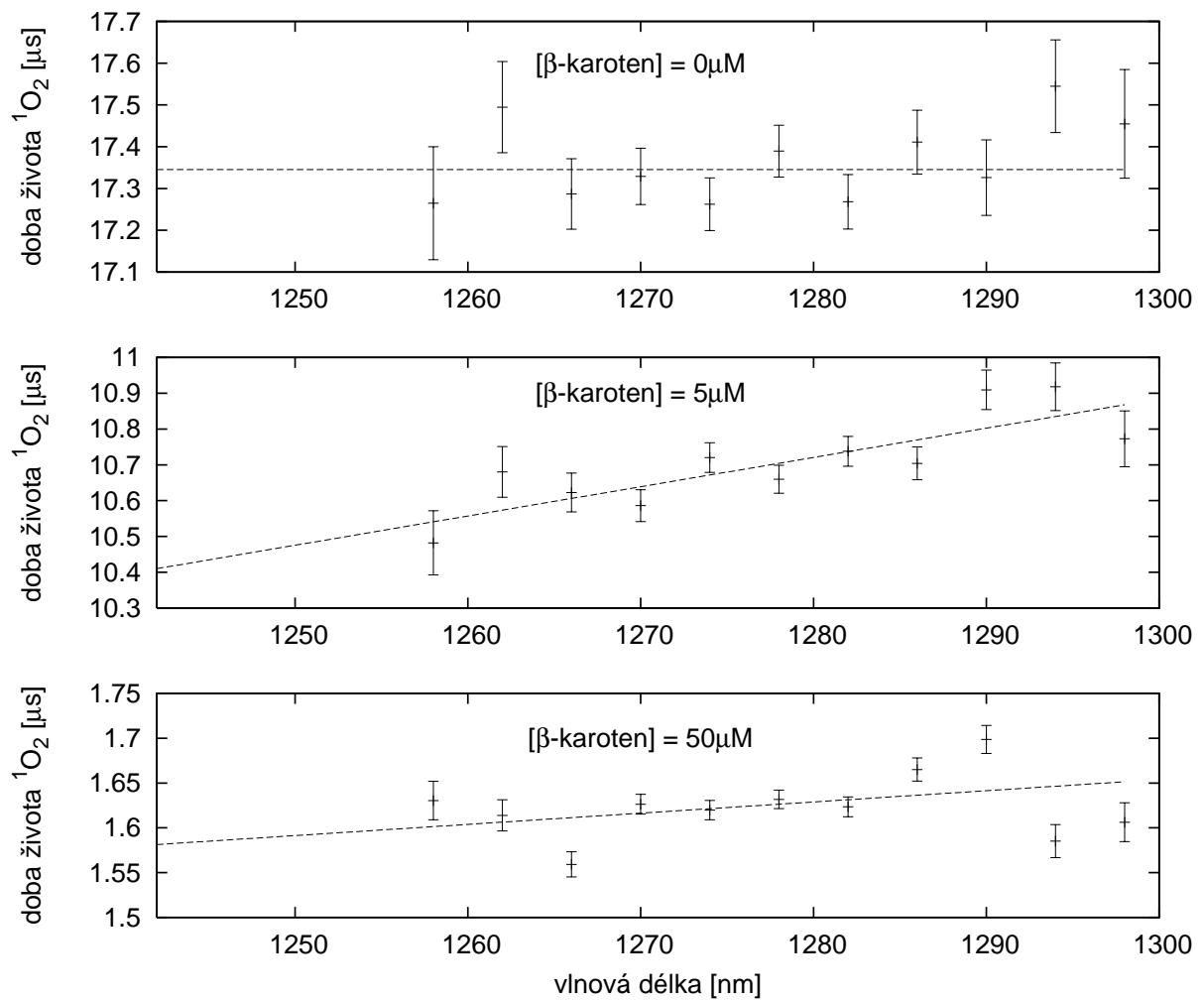
6.3 Doba života $^1\text{O}_2$ určená z kinetik fosforecence $^1\text{O}_2$

Parametry τ_Δ , odpovídající době života $^1\text{O}_2$ a získané fitováním kinetik fosforecence $^1\text{O}_2$ podle (6.1), vykazují v případě nenulové koncentrace β -karotenu systematický nárůst s vlnovou délkou. Ve skutečnosti se jedná o nárůst s dobou měření, což je způsobeno degradací karotenu v průběhu měření. Tento jev je blíže diskutován v kapitole 6.7. Závislost τ_Δ na vlnové délce při pevné koncentraci β -karotenu je znázorněna v grafu 6.8. Doba života $^1\text{O}_2$ pro každou koncentraci β -karotenu byla spočtena extrapolací k nulové době měření z hodnot τ_Δ naměřených na různých vlnových délkách a tedy zároveň v různých časech. Výsledná extrapolovaná hodnota byla získána váženou lineární regresí závislosti τ_Δ na pořadí měření, váženo bylo převrácenou hodnotou chyby parametru. Chyba výsledné doby života $^1\text{O}_2$ byla určena jako chyba absolutního parametru zmíněné lineární regrese. Rovněž byla započtena chyba vyplývající z volby počátečního času fitování, jehož optimální hodnota není přesně známa; porovnáním nafitovaných parametrů při různých volbách počátku fitování byla odpovídající chyba odhadnuta na 0,02 μs .

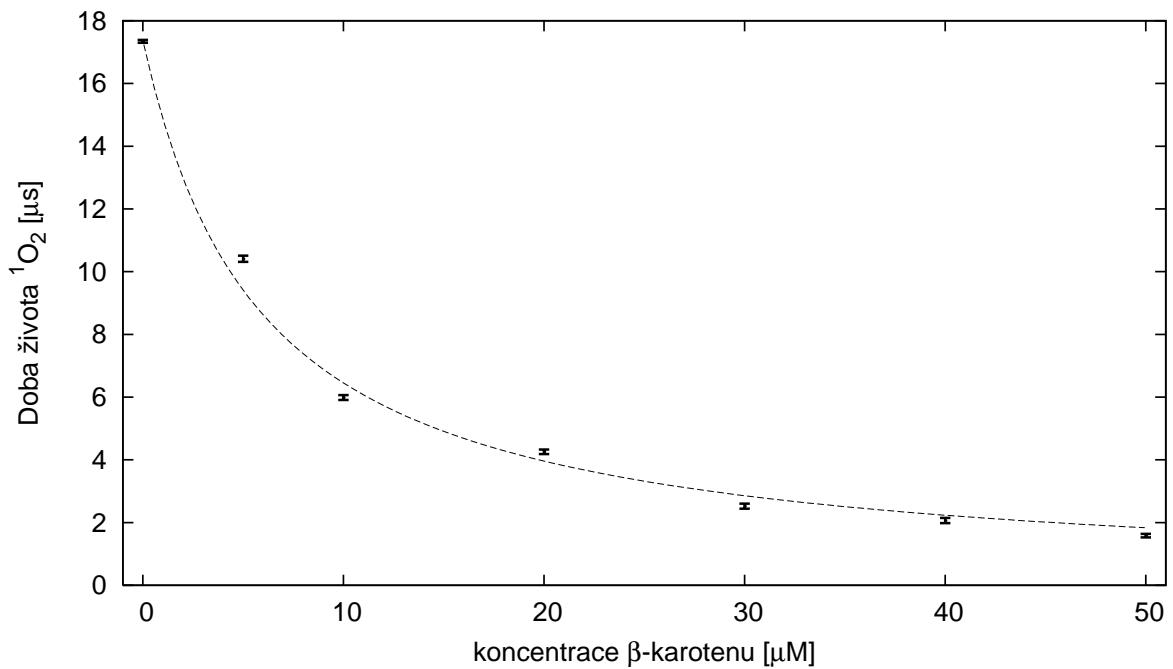
Graf 6.9 a tabulka 6.1 na straně 36 zobrazují závislost τ_Δ doby života $^1\text{O}_2$ na koncentraci β -karotenu ($[\beta\text{-karoten}]$). Doba života $^1\text{O}_2$ v THF při nulové koncentraci β -karotenu byla určena $\tau_\Delta = (17,35 \pm 0,05)$ μs . Hurst a kol. uvádí dobu života $^1\text{O}_2$ v THF při použití TPP k senzibilizaci rovnou 20 μs [17]. Základní singletní stav TPP rovněž působí jako zhášeč. V acetonu byla změřena rychlostní konstanta pro zhášení základním singletním stavem TPP, $k_{\Delta S_0} = (8,9 \pm 1,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [20]. Za předpokladu, že $k_{\Delta S_0}$ pro THF a pro aceton jsou srovnatelné, pro 100 μM TPP v THF se zhášení singletem TPP se podílí jen méně než dvěma procenty na celkovém zániku $^1\text{O}_2$ (viz kapitolu 6.4) a nebylo by možné takto vysvětlit rozdíl naměřené doby života $^1\text{O}_2$ a hodnoty uváděné v [17]. Pro zjištění spolehlivější hodnoty doby života $^1\text{O}_2$ v THF by však bylo třeba změřit závislost τ_Δ na koncentraci TPP a extrapolovat k nulové koncentraci. Doba života $^1\text{O}_2$ závisí také na koncentraci kyslíku, opět by bylo třeba změřit závislost τ_Δ na koncentraci kyslíku, což je však poměrně experimentálně náročné.

6.4 Zhášecí rychlostní konstanta $^1\text{O}_2$ pro β -karoten

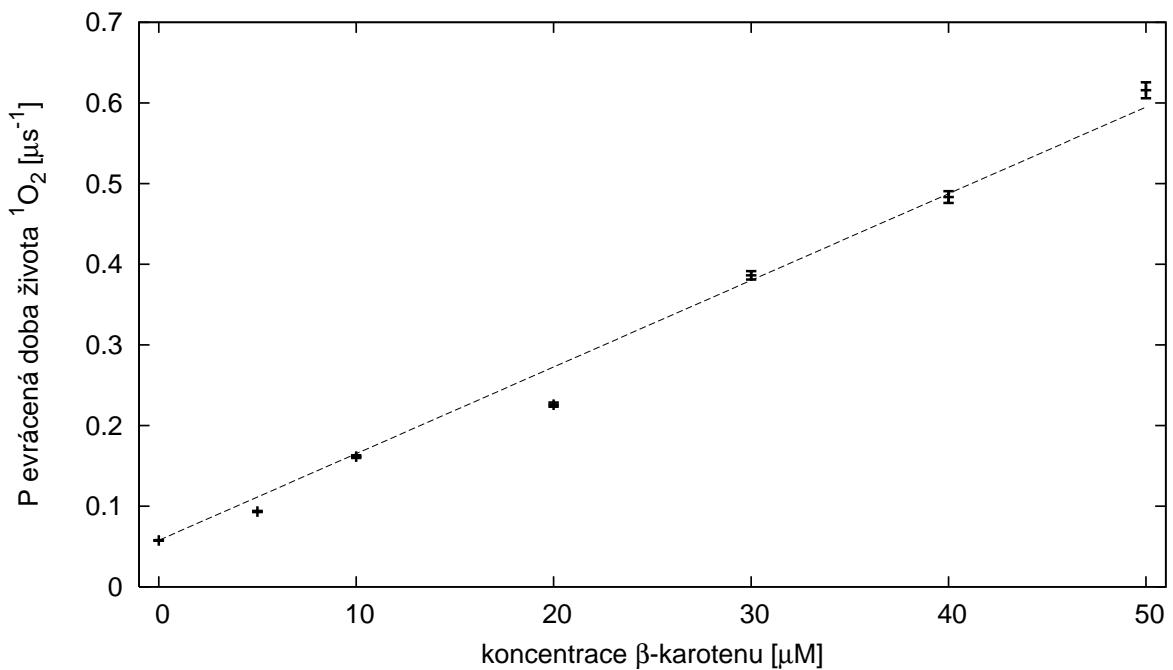
V předešlé kapitole byla určena doba života τ_Δ singletního kyslíku v závislosti na koncentraci β -karotenu. V grafu 6.10 je vynesena převrácená hodnota doby života $1/\tau_\Delta$, jež dle



Graf 6.8: Závislost doby života $^1\text{O}_2$ na vlnové délce pro vybrané koncentrace β -karotenu $0 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$. Pro nulovou koncentraci prokládáme data průměrem, při nenulové koncentraci β -karotenu prokládáme přímkou.



Graf 6.9: Doba života ${}^1\text{O}_2$: Patrně klesá s koncentrací β -karotenu, proloženo hyperbolou.



Graf 6.10: Pevrácená doba života ${}^1\text{O}_2$ v závislosti na koncentraci β -karotenu: Závislost je proložena lineární funkcí, směrnice odpovídá zhášecí konstantě $k_{\Delta Q}$.

kapitoly 3.4 odpovídá

$$1/\tau_\Delta = \tilde{K}_\Delta = K_\Delta^0 + k_{\Delta Q}[Q], \quad (6.2)$$

kde K_Δ^0 je rychlostní konstanta zániku ${}^1\text{O}_2$ bez přítomnosti Q a jedná se tak o tvar Stern–Volmerovy rovnice. Konstanta \tilde{K}_Δ je podle použitého teoretického modelu lineární v [Q], což i potvrzují naměřené hodnoty, které lze obstojně proložit přímkou $K_\Delta^0 + k_{\Delta Q}[Q]$, jak je vidět v grafu 6.10. Měření pro $[Q] = 5 \mu\text{M}$ a $[Q] = 20 \mu\text{M}$ se odchylují od proložené přímky; je možné, že došlo k chybě v přípravě koncentrace β -karotenu či jinému nepříznivému efektu. Z linearity závislosti zhášecí konstanty $k_{\Delta Q}$ na koncentraci β -karotenu plyne, že zhášení singletního kyslíku β -karotenem je bimolekulární proces.

Byly určeny hodnoty rychlostních konstant

$$\begin{aligned} k_{\Delta Q} &= (10,9 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \\ K_\Delta^0 &= (57,6 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ s}^{-1}, \end{aligned}$$

Je vidět, že již pro koncentrace kolem $5 \mu\text{M}$ se zhášení β -karotenem podílí přibližně 50% na zániku ${}^1\text{O}_2$, pro koncentraci $50 \mu\text{M}$ se podílí již 90%.

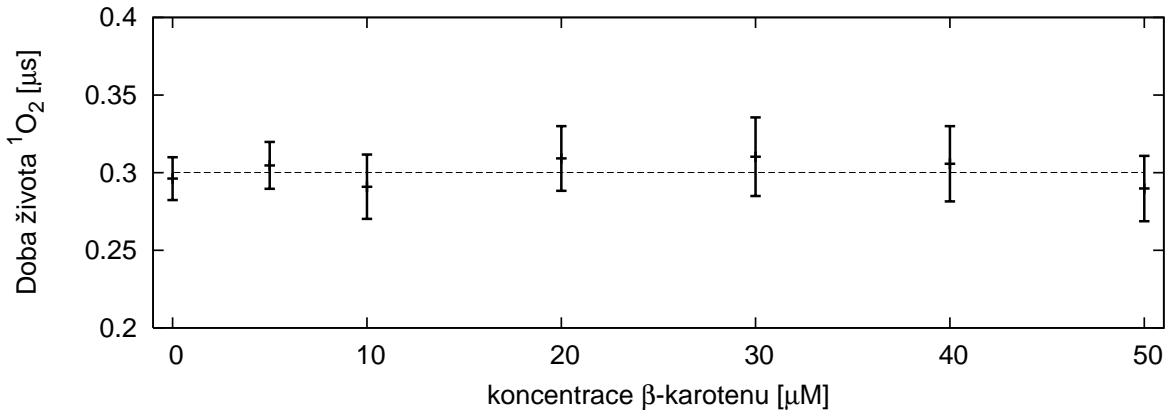
Na základě měření je možno usoudit, že β -karoten se skutečně chová jako antioxidant. Nielsen a kol. uvádějí hodnotu $k_{\Delta Q} = 13,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ naměřenou v benzenu. Uvážením, že zhášecí konstanta $k_{\Delta Q}$ je přibližně nepřímo úměrná viskozitě rozpouštědla [30], lze po korekci na viskozitu THF spočítat $k_{\Delta Q} = 10,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, což je hodnota blízká té v práci změřené. Difusní limity pro THF při teplotě 300 K vychází dle vztahu (3.9) $k_{\text{dif}} = 21 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, změřená hodnota $k_{\Delta Q}$ je tedy řádově srovnatelná.

Koncentrace β -karotenu v lidském séru se pohybuje v okolí $1 \mu\text{M}$ [4], silně však závisí na výživě a konkrétním jedinců. Pokud by byla v měřeném roztoku koncentrace β -karotenu pouze $1 \mu\text{M}$, bude se na zhášení podílet zhruba šestnácti procenty. Celková rychlosť zániku ${}^1\text{O}_2$ závisí samozřejmě silně na rozpouštědle a ostatních obsažených látkách. Doba života ${}^1\text{O}_2$ v THF a acetonu bez přítomnosti antioxidantu se například liší přibližně dvojnásobně [37]. V živém organismu nelze očekávat ani jedno z těchto rozpouštědel a navíc je zde obsaženo mnoho dalších látok. Předpokládá se, že antioxidantní účinky β -karotenu mohou růst synergickým efektem v přítomnosti jiných antioxidantů [35]. Karoten se preferenčně shromažďuje v membránách a lipidových tkáních, které chrání a kde je jeho koncentrace zvýšená. Přestože jsou pochody *in vivo* mnohem komplikovanější a komplexnější než *in vitro*, na základě *in vitro* změřené rychlostní konstanty lze usoudit, že i v koncentracích běžných v lidském těle má β -karoten potenciál být účinným zhášečem ${}^1\text{O}_2$.

6.5 Doba života ${}^3\text{PS}$ určená z kinetik fosforecence ${}^1\text{O}_2$

Doba života τ_{T_1} je určena na základě fitování kinetik fosforecence ${}^1\text{O}_2$ podle modelu (6.1), který je probrán v kapitole 6.2. Takto určená doba života ${}^3\text{PS}$ se označuje rovněž jako doba nárůstu ${}^1\text{O}_2$. Na rozdíl od τ_Δ , závislost τ_{T_1} na době měření není patrná. Výsledné hodnoty τ_{T_1} pro různé koncentrace β -karotenu jsou spočteny jako vážený průměr parametrů τ_{T_1} určených z kinetik fosforecence ${}^1\text{O}_2$ pro danou koncentraci a různé vlnové délky, přičemž váhy odpovídají převrácené hodnotě chyby parametrů.

V grafu 6.11 je vidět, že při změně koncentrace β -karotenu nenastává žádný pozorovatelný trend ve změně τ_{T_1} . Hodnotu $k_{T_1 Q}$ nelze z naměřených dat spolehlivě určit, lze jen říci, že



Graf 6.11: Doba života ^3PS v závislosti na koncentraci β -karotenu určená z kinetik luminiscence $^1\text{O}_2$. Nepozorujeme závislost doby života ^3PS na koncentraci β -karotenu. Značky udávají hodnoty zprůměrované přes měřené vlnové délky, přerušovaná čára vyznačuje průměr.

[β -karoten] [μM]	τ_Δ [μs]	τ_{T_1} [μs]
0	$17,35 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,01$
5	$10,41 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,02$
10	$5,99 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,02$
20	$4,26 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,02$
30	$2,52 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,03$
40	$2,07 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,02$
50	$1,58 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,02$

Tabulka 6.1: Dobý života $^1\text{O}_2$ a tripletu PS na základě fitování kinetik luminiscence $^1\text{O}_2$ dle vztahu (6.1).

je malá oproti K_{T_1} . Na tomto místě je třeba si uvědomit, že i nejvyšší použitá koncentrace β -karotenu v roztoku je přibližně čtyřicetkrát menší než koncentrace rozpuštěného kyslíku. TPP fotosensibilizuje $^1\text{O}_2$ s kvantovým výtěžkem $0,65 \pm 0,05$ [22] a touto cestou je tudíž triplet TPP účinně zhášen. Navíc molekula kyslíku je malá oproti molekule β -karotenu a rychlosť její difuse bude větší. I v případě, že by rychlostní konstanta k_{T_1Q} zhášení tripletu TPP β -karotenem byla omezena pouze rychlosťí difuse, bude $k_{T_1Q}[Q]$ mnohonásobně menší oproti $k_{T_1\Delta}$ pro měřené koncentrace β -karotenu a zhášení tripletu TPP β -karotenem nebude možné v provedeném experimentu kvantifikovat ani pozorovat, neboť jeho vliv bude pod úrovní chyby měření.

Váženým průměrováním parametrů τ_{T_1} přes různé koncentrace i vlnové délky bylo určeno

$$\tau_{T_1} = (0,30 \pm 0,01) \mu\text{s},$$

kde chyba odpovídá 95% hladině spolehlivosti a byla do ní započtena odhadovaná nepřesnost $0,005 \mu\text{s}$ vyplývající z volby počátečního času fitování, jehož optimální hodnota není přesně známa. Převrácená hodnota τ_{T_1} , rychlostní konstanta zániku ^3PS , vychází

$$K_{T_1} = (3,3 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$$

6.6 Doba života ${}^3\text{PS}$ určená z kinetik fosforescence ${}^3\text{PS}$

Kinetiky luminiscence vzorku byly rovněž měřeny v rozsahu vlnových délek 750 až 1342 nm. Dobu života ${}^3\text{PS}$ je možné určit přímo na základě kinetik fosforescence ${}^3\text{PS}$, jež se objevuje v rozsahu přibližně od 800 nm do 1100 nm. V grafu 6.5 na straně 30, kde jsou data opravena na spektrální citlivost aparatury, si lze všimnout, že maximální intenzita fosforescence ${}^3\text{PS}$ nastává pro vlnové délky v okolí 814 nm.

Kinetiky fosforescence ${}^3\text{PS}$ byly nafitovány jen jednoexponenciálním poklesem dle (3.5) funkcí

$$f(x) = N e^{-t/\tau_{T_1}} \quad (6.3)$$

Jednoexponenciálně byla data fitována jen ve spektrální oblasti 800 nm až 1100 nm, kde je signál fosforescence ${}^3\text{PS}$ dostatečně silný. Kvůli oříznutí fluorescence PS je opět počátek fitování posunut do času $t = 100$ ns. Podobným způsobem jako výše byla určena a odečtena hodnota pozadí.

Graf 6.12 shrnuje výsledky měření doby života ${}^3\text{PS}$. Pro každou koncentraci β -karotenu je vynesena závislost doby života τ_{T_1} na vlnové délce. Pro všechny koncentrace β -karotenu, včetně nulové, je pozorovatelný nezanedbatelný nárůst doby života s vlnovou délkou emise. Tento jev lze vysvětlit následovně. ${}^3\text{PS}$ je v roztoce zastoupen ve dvou (či více) různých formách. Každá forma ${}^3\text{PS}$ má přitom odlišnou dobu života a jiný profil spektra fosforescence. Na vyšších vlnových délkách je pak vyšší podíl luminiscence déle žijící formy. Jedním z možných vysvětlení existenci více forem ${}^3\text{PS}$ by mohl být efekt agregace.

Kinetiky fosforescence ${}^3\text{PS}$ je pak třeba fitovat jako součet dvou exponenciálních poklesů

$$f(x) = N e^{-t/\tau_{T_1}} + N' e^{-t/\tau'_{T_1}}, \quad (6.4)$$

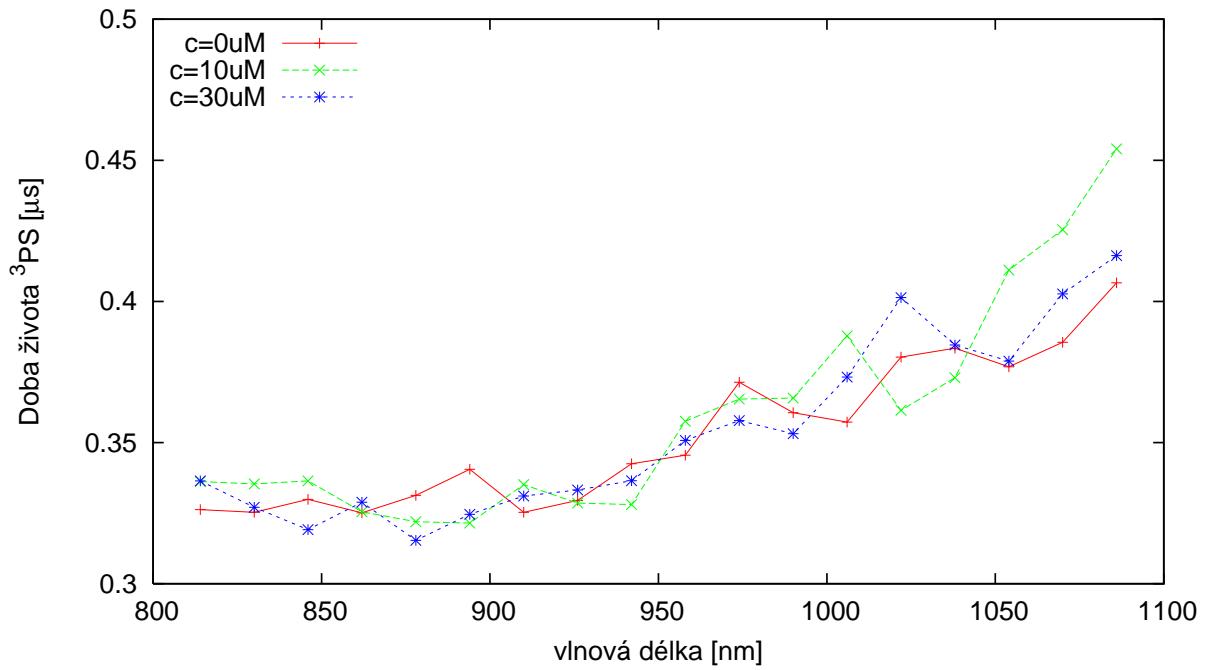
kde τ_{T_1} a τ'_{T_1} značí po řadě doby života krátce a déle žijící formy ${}^3\text{PS}$. Aby fit nebyl ovlivněn silnou fluorescencí, data byla fitována opět až od času $t = 100$ ns. Grafy 6.13 a 6.14 zobrazují závislost doby života τ_{T_1} a τ'_{T_1} na koncentraci $[Q]$.

Pro každou koncentraci β -karotenu byl vypočten průměr z fitovacích parametrů získaných na různých vlnových délkách, vážených převrácenou hodnotou chyby fitu. Fitovací parametry N , N' vypovídají o zastoupení jednotlivých forem, výraz $q = N'/(N + N')$ udává podíl déle žijící formy na počáteční intenzitě fosforescence ${}^3\text{PS}$; hodnota q byla určena z nafitovaných kinetik fosforescence ${}^3\text{PS}$ extrapolací k nulovému času. Závislost podílu q na vlnové délce emise je vynesen v grafu 6.16. To, že tento podíl není konstantní, odpovídá hypotéze o dvou či více fosforeskujících formách ${}^3\text{PS}$. Hodnotu q ale nelze ztotožnit s podílem koncentrací příslušných forem ${}^3\text{PS}$, neboť jejich kvantový výtěžek fosforescence může být rozdílný, a z měření tedy není možné podíl koncentrací určit.

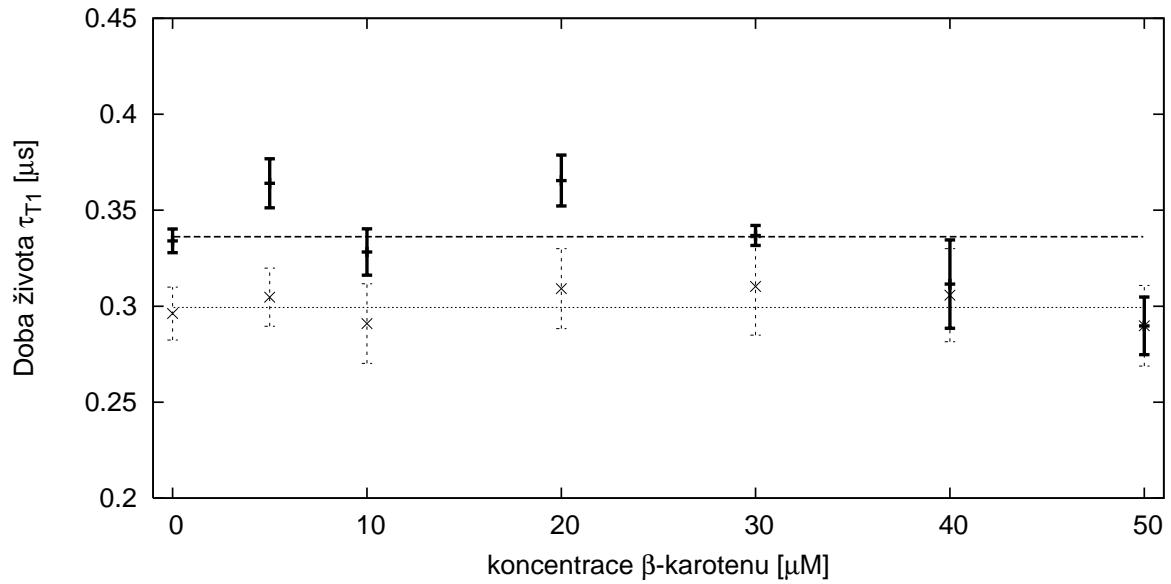
Z grafu 6.13 je patrné, že doba života krátce žijící formy ${}^3\text{PS}$ se nemění výrazně s koncentrací β -karotenu a je možno usoudit, že β -karoten v daném koncentračním rozsahu nehraje podstatnou roli ve zhášení. Váženým průměrováním τ_{T_1} přes koncentrace i vlnové délky bylo určeno

$$\tau_{T_1} = (0,34 \pm 0,03) \mu\text{s},$$

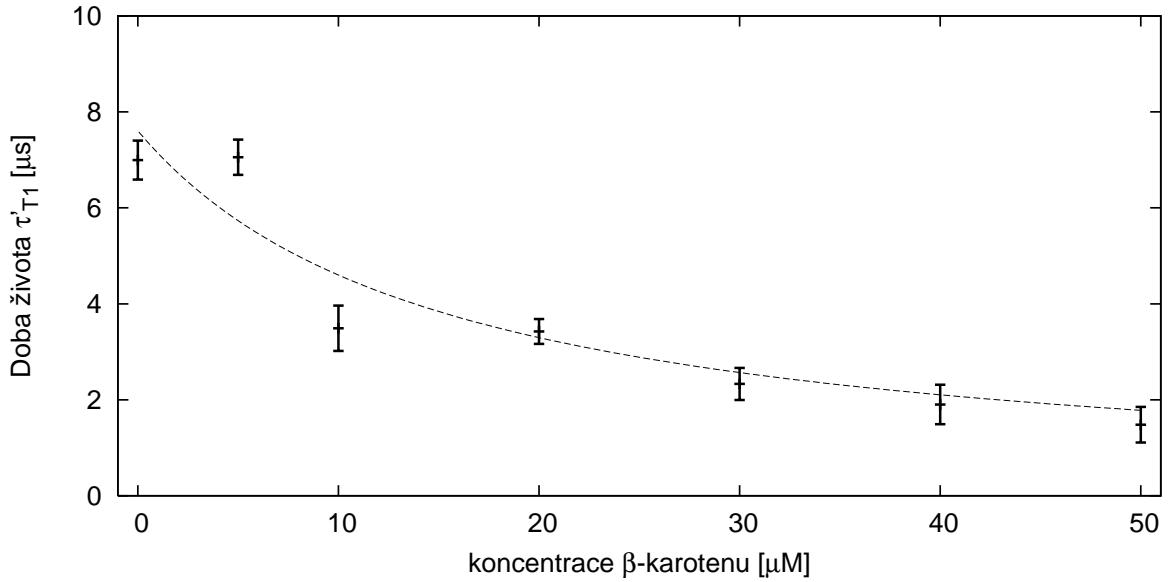
přičemž váhy odpovídají převrácené hodnotě chyby jednotlivých hodnot, chyba průměru byla spočtena pro 95% hladinu spolehlivosti při použití t-distribuce. Navíc bylo do chyby připočteno 0,01 μs vyplývající z možnosti neoptimální volby počátečního času fitování, podobně jako v kapitole 6.2. V rámci chyb se hodnota τ_{T_1} shoduje s dobou nárůstu ${}^1\text{O}_2$ $(0,30 \pm 0,01) \mu\text{s}$ (viz kapitolu 6.2).



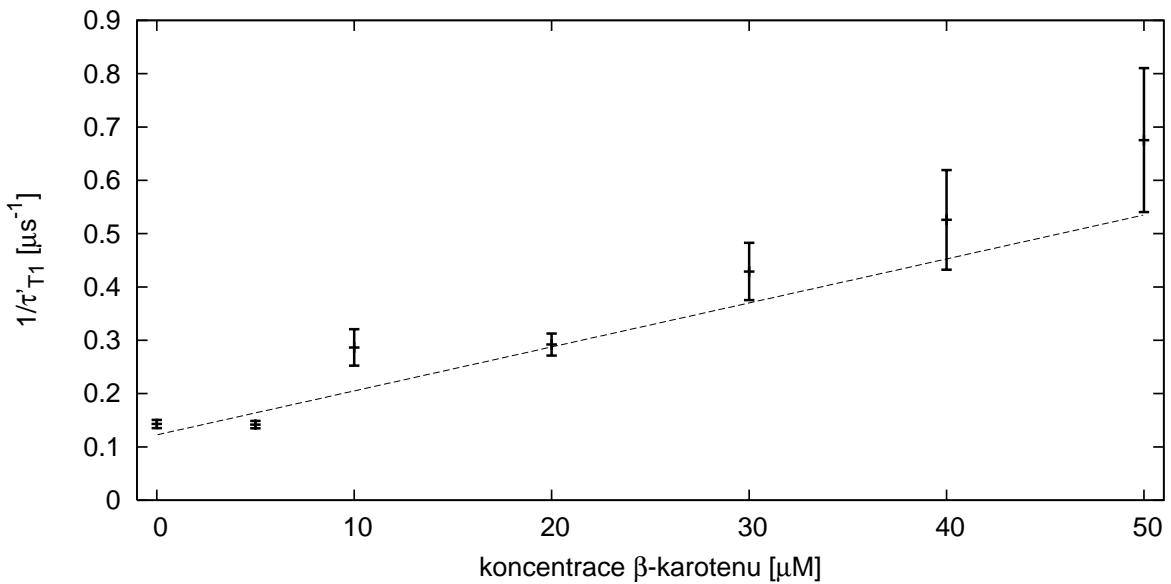
Graf 6.12: Doba života ${}^3\text{PS}$ v závislosti na vlnové délce pro vybrané koncentrace β -karotenu, určeno na základě monoexponenciálního fitování kinetiky fosforecence ${}^3\text{PS}$: Je patrná rostoucí hodnota fitovacího parametru s vlnovou délkou. Pro přehlednost jsou body odpovídající stejné koncentraci β -karotenu spojeny čarou.



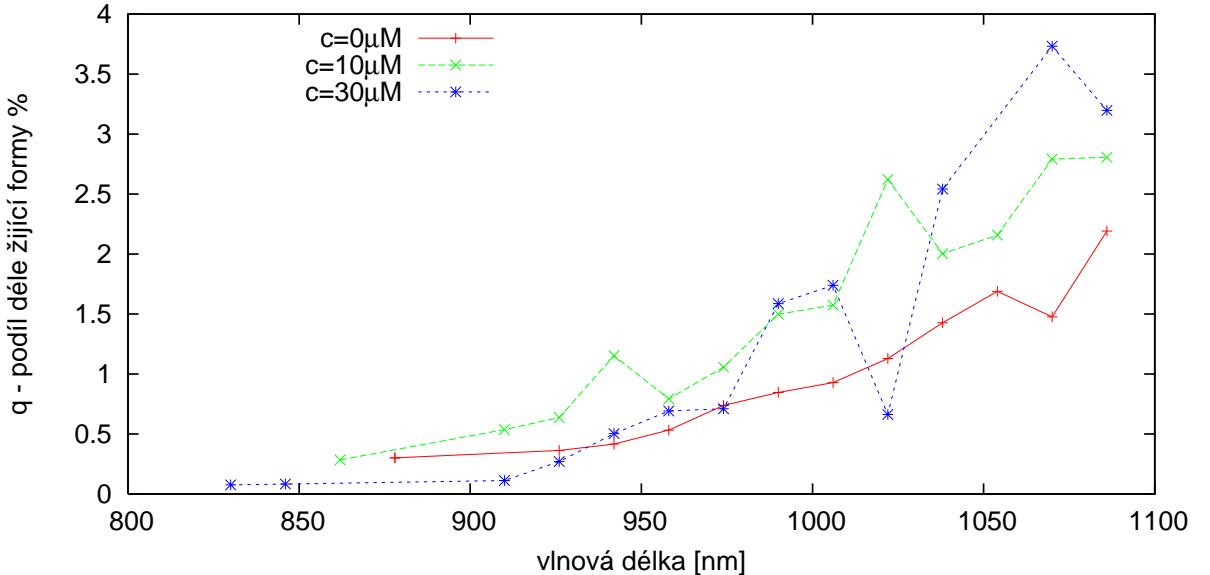
Graf 6.13: Doba života krátce žijící formy ${}^3\text{PS}$ v závislosti na koncentraci β -karotenu určená na základě dvojexponenciálního fitování fosforecence ${}^3\text{PS}$ dle vztahu (6.4). Tučně jsou značeny hodnoty určené z kinetik fosforecence ${}^3\text{PS}$, čárkovaně je proložen vážený průměr. Pro srovnání jsou slabě uvedeny doby života ${}^3\text{PS}$ zjištěné z kinetik fosforecence ${}^1\text{O}_2$, rovněž proložené průměrem.



Graf 6.14: Doba života déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ v závislosti na koncentraci β -karotenu určená na základě dvojexponenciálního fitování fosforecence ${}^3\text{PS}$. Závislost je proložena hyperbolou.



Graf 6.15: Převrácená doba života déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ v závislosti na koncentraci β -karotenu proložená přímkou. Při váženém fitování mají značnou váhu měření pro $0 \mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$ koncentraci β -karotenu, protože vykazují oproti ostatním měřením menší relativní chybu. V kapitole 6.4 je uvedeno, že měření pro $5 \mu\text{M}$ a $20 \mu\text{M}$ koncentraci β -karotenu nesedí zcela dobře do lineárního fitu. Měření pro $5 \mu\text{M}$ se zde také odchyluje od lineárního fitu; i odtud plyne velká chyba určení směrnice přímky. Fitování doby života déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ hyperbolou (graf 6.14) dává velice podobnou hodnotu $k_{T_1'} Q$.



Graf 6.16: Podíl q déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ na fosforescenci v čase $t = 0$ v závislosti na vlnové délce emise pro vybrané koncentrace β -karotenu. Pro přehlednost jsou body odpovídající stejné koncentraci β -karotenu spojeny čarou.

Naopak graf 6.14 naznačuje, že déle žijící forma ${}^3\text{PS}$ je nejspíše β -karotenem zhášena. Graf 6.15 zachycuje převrácenou hodnotu doby života déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ v závislosti na koncentraci β -karotenu. V souladu se Stern–Volmerovým vztahem závislost převrácených dob života na koncentraci fitujeme lineárně, přičemž vážíme převrácenou hodnotou chyby, a zhášecí konstanta je určena směrnicí přímky:

$$k_{T_1'Q} = (8 \pm 3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}.$$

Je pozoruhodné, že zhášecí konstanta déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ pro β -karoten vychází srovnatelně se zhášecí konstantou singletního kyslíku $k_{\Delta Q}$ (viz 6.4). Dle vztahu (3.8) je pro THF $k_{\text{dif}} = 14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a změřená hodnota zhášecí rychlostní konstanty déle žijící formy ${}^3\text{PS}$ β -karotenem je tedy řádově srovnatelná s k_{dif} .

Všimněme si shody doby života krátce žijící formy ${}^3\text{PS}$ s dobou nárůstu kyslíku, určené z kinetiky fosforescence ${}^1\text{O}_2$. (Z grafu 6.13 je vidět, že doba života krátce žijící formy ${}^3\text{PS}$ vychází dokonce o trochu větší, přičemž se tento rozdíl zmenšuje s rostoucí koncentrací β -karotenu.) Déle žijící forma ${}^3\text{PS}$ se tedy nepromítne do doby nárůstu ${}^1\text{O}_2$ a lze usoudit, že buď singletní kyslík vůbec negeneruje, nebo je její koncentrace tak malá, že k tvorbě ${}^1\text{O}_2$ nepřispívá významným způsobem. Toto vede k myšlence fitovat kinetiku fosforescence ${}^1\text{O}_2$ funkcí, která respektuje existenci dvou forem ${}^3\text{PS}$. Jednotlivé formy ${}^3\text{PS}$ generují ${}^1\text{O}_2$ nezávisle, a nová modelová funkce bude proto lineární kombinací původních modelových funkcí (6.1). Jelikož rychlosť zániku ${}^1\text{O}_2$ nezávisí na způsobu vzniku, dostáváme novou fitovací funkci

$$f(t) = N(e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau_{T_1}}) + N'(e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau'_{T_1}}). \quad (6.5)$$

Bylo provedeno fitování kinetik luminiscence ${}^1\text{O}_2$ podle modelu (6.5). Fitovací parametr N' zpravidla vychází velmi malý oproti parametru N , řádově stokrát, doba života τ'_{T_1} vycházela řádově v jednotkách μs , chyby parametrů N' , N a τ'_{T_1} byly ovšem několikanásobně větší než

$[\beta\text{-karoten}]$ [μM]	τ_Δ [μs]	τ_{T_1} [μs]
0	$17,31 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,01$
5	$11,68 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,03$
10	$6,77 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,03$
20	$5,04 \pm 0,14$	$0,31 \pm 0,04$
30	$2,76 \pm 0,12$	$0,30 \pm 0,03$
40	$2,20 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,02$
50	$1,71 \pm 0,15$	$0,29 \pm 0,02$

Tabulka 6.2: Doby života τ_Δ a τ_{T_1} určené z kinetik fosforecence $^1\text{O}_2$ při měření na širokém rozsahu.

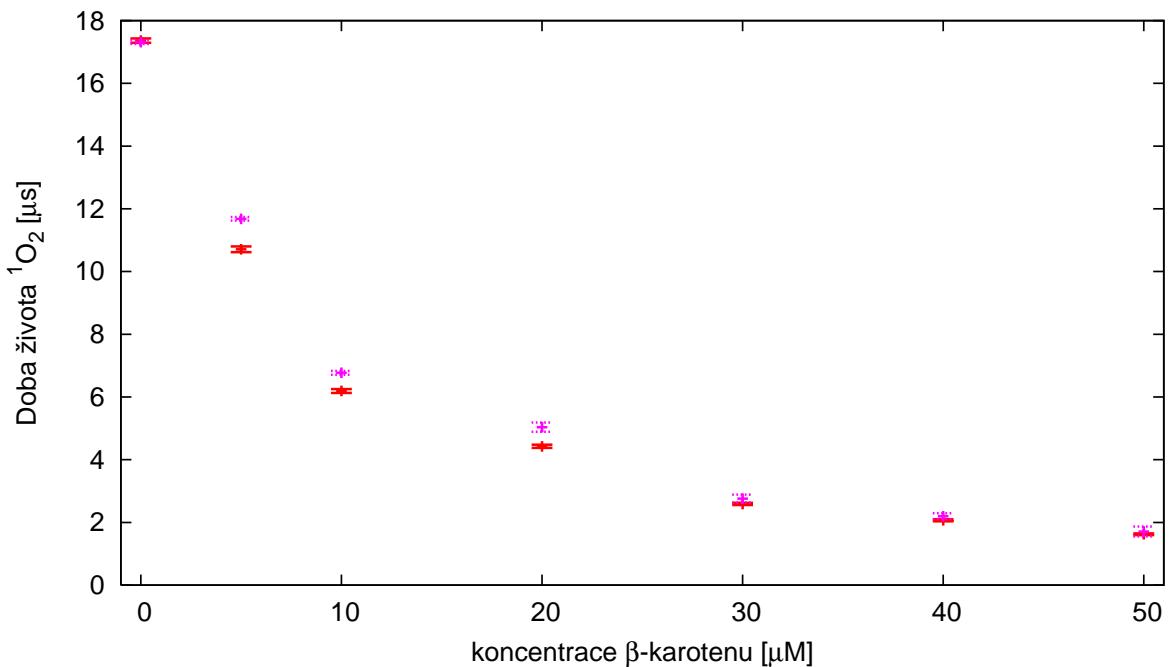
jejich hodnot. Parametry τ_Δ a τ_{T_1} vyšly srovnatelně jako při fitování podle (6.1), ale s většími chybami. Uvedené hovoří ve prospěch tvrzení, že déle žijící forma se nepodílí významně na generování $^1\text{O}_2$. Již samotná dlouhá doba života napovídá, že se tato forma pravděpodobně neúčastní fotosensibilizace.

Chlorofyl patří stejně jako TPP mezi tetrapyroly a je pravděpodobné, že se jako fotosensibilizátory budou oba chovat podobně. Jak bylo uvedeno dříve, předpokládá se, že ochranná role karotenoidů ve fotosyntéze spočívá mimo jiné právě v jejich schopnosti zhášet triplet přeexcitovaného chlorofylu [13, 38]. Z tohoto důvodu je zajímavé zkoumat interakci β -karotenu s tripletem TPP, je však třeba mít na paměti, že procesy *in vivo* jsou odlišné a mohou být daleko komplikovanější oproti procesům *in vitro* ve zkoumaném roztoku.

6.7 Degradace karotenu

Při měření v širokém rozsahu vlnových délek byly také naměřeny kinetiky fosforecence $^1\text{O}_2$ pro vlnové délky 1262 nm, 1278 nm, 1294 nm. Z těchto měření je možné stejně jako v kapitole 6.3 vyhodnotit parametry τ_{T_1} a τ_Δ , doby života ^3PS a $^1\text{O}_2$, a to na základě fitování podle funkce (6.1). Pro každou koncentraci β -karotenu bylo průměrováno přes vlnové délky. Tabulka 6.2 shrnuje získané fitovací parametry a graf 6.17 porovnává s výsledky získanými při měření na krátkém rozsahu. Lze pozorovat, že při měření na širokém rozsahu vlnových délek vycházejí doby života $^1\text{O}_2$ systematicky delší, než při měření na úzkém rozsahu (tabulka 6.1 na straně 36). Jedinou výjimkou je měření při nulové koncentraci β -karotenu. Vysvětlení je jednoduché: Vždy bylo nejdříve měření provedeno na úzkém rozsahu, následně tentýž vzorek byl proměřen na širokém rozsahu. Karoten však zřejmě při vystavení laserovým pulsům postupně degraduje. Čím déle je vzorek vystaven laseru, tím více vstřebá energie a tím více klesne koncentrace účinného β -karotenu. Takto lze vysvětlit prodlouženou dobu života $^1\text{O}_2$ při měření na širokém rozsahu. Systematický nárůst doby života $^1\text{O}_2$ s dobou měření je patrný i v grafu 6.8 na straně 33.

Lineárním itemem převrácené doby života $^1\text{O}_2$ je opět určena zhášecí konstanta $\tilde{k}_{\Delta Q}$, kterou



Graf 6.17: Srovnání dob života $^1\text{O}_2$ získaných z měření na úzkém a širokém rozsahu vlnových délek: Červené body odpovídají měření na úzkém rozsahu vlnových délek, růžové body odpovídají měření na širokém rozsahu vlnových délek. Při nenulové koncentraci β -karotenu vzorek déle vystavený měření vykazoval delší dobou života.

pro odlišení značíme s vlnkou.

$$\begin{aligned} k_{\Delta Q} &= (10,9 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \\ \tilde{k}_{\Delta Q} &= (10,0 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \end{aligned}$$

Je vidět, že β -karotenu ubylo oproti měření na krátkém rozsahu o $(8 \pm 4)\%$, což je celkem významný rozdíl.

Degradace β -karotenu může být způsobena jednak přímo fotodegradací [8], jednak chemickým zhášením $^1\text{O}_2$, jehož podíl je sice velmi malý oproti fyzikálnímu zhášení, ovšem přítomno stále je [35].

Vliv degradace karotenu by bylo možné snížit zavedením takového průtokového měření, kdy kvetu cirkuluje větší množství zásobního roztoku. Na realizaci průtokového měření se v laboratoři KChFO již pracuje.

6.8 Poznámky k experimentu

Funkce, které jsou fitovány do naměřených dat, byly odvozeny na základě zjednodušujících předpokladů. Byla předpokládána stálost koncentrací $[\text{PS}]$, $[\text{O}_2]$ a $[\text{Q}]$. V případě, že by se tyto koncentrace v průběhu měření jedné kinetiky výrazně měnily, by naše fitovací funkce nesledovaly dobře naměřená data, což by bylo odhaleno analýzou residiálního plotu. Například výrazná změna koncentrace $[\text{O}_2]$ během měření kinetiky by se projevila neexponencialitou

rozpadu stavu T_1 . Výrazné změny $[Q]$ během měření kinetiky, ke kterým by došlo hlavně v časech odpovídajících maximální koncentraci 1O_2 , by se zase projevily pomalejším poklesem intenzity luminiscence 1O_2 . Dobrá shoda naměřených dat a modelových funkcí napovídá, že uvedené approximace jsou oprávněné, což potvrzuje ve své publikaci i Baier a kol. [1].

V kapitole 3.4 bylo učiněno zanedbání triplet-tripletové anihilace, která by se projevila ne-exponencialitou dohasínání fosforecence 3PS . Dohasínání fosforecence 3PS bylo však možné dobře proložit součtem dvou exponenciálních poklesů (je respektována existence dvou form 3PS). Vzhledem k poměrně vyšší koncentraci kyslíku oproti tripletu TPP bude triplet-tripletové zhášení hrát jen malou roli.

Další approximací zjednodušující modelové funkce je zanedbání zpětného přenosu. Na základě našich měření nelze určit konstantu $k_{\Delta T_1}$. Bylo změřeno (graf 6.5), že maximální intenzita fosforecence 3PS nastává v okolí 814 nm, zatímco fosforenci 1O_2 pozorujeme pro vlnové délky blízké 1278 nm. Energetický rozdíl 3PS a 1O_2 je značný a zpětný přenos bude proto podle všeho velmi nepravděpodobný. Velice výrazný zpětný přenos by teoreticky bylo možné v našich měření vypočítat z malého poklesu τ_{T_1} při zvyšující se koncentraci Q , prakticky toho ovšem nedosáhneme. Zdroj [1] popisuje blíže, jak lze na základě měření kinetik luminiscence 1O_2 za různých podmínek určit hodnotu součinu $k_{\Delta T_1} k_{T_1 \Delta}$.

Zamysleme se nad kritériem hodnocení účinnosti zhášeče. Za hlavní ukazatel účinnosti zhášeče považujeme rychlostní konstantu $k_{\Delta Q}$, kterou získáváme z převrácené doby života 1O_2 . Doba života však není jediným ukazatelem účinnosti zhášeče, záleží i na množství 1O_2 , jež vznikne. Karoten například absorbuje v oblasti modrého světla laseru, což v experimentu vede k menšímu počtu vzniklých molekul 1O_2 , stejně tak jako případné zhášení tripletu TPP. Uvažujeme-li o škodách napáchaných vysoce reaktivním 1O_2 , jejich hlavním měřítkem je množství proběhnutých destruktivních chemických reakcí. Destruktivní reakce jsou stejně jako další popsáne procesy jednou z cest zániku 1O_2 , kterou lze popsat rychlostní konstantou. Počtu destruktivních reakcí tak přímo úměrně odpovídá počet emitovaných fosforecenčních fotonů po celý čas. Velmi užitečnou informací by tak byl součet všech událostí fotonásobiče odpovídajících fosforecenčním fotonům. V našem uspořádání bohužel ale tato informace užitečná není, protože výkon pulsního laseru během měření kolísá v rádu až desítek percent. Jelikož výkon není stabilní, srovnáváním celkového počtu fosforecenčních fotonů nelze dostat relevantní výsledky. Částečného zlepšení by šlo dosáhnout, pokud by kromě signálu z fotonásobiče byla zaznamenávána i hodnota napětí na PIN diodě, která odpovídá intenzitě laseru.

Kapitola 7

Závěr

Úvodní teoretická část shrnuje základní poznatky o reaktivních formách kyslíku a antioxidantech, včetně exkursu do oblasti jejich biologického účinku. Rovněž vysvětluje pojmy singlet a triplet, které jsou zásadní pro pochopení jevu fosforescence. Bylo probráno, jak experimentálně pomocí časově a spektrálně rozlišené luminiscence zkoumat antioxidanty a jak na základě měření časové závislosti luminiscence určit doby života ${}^1\text{O}_2$ a tripletu PS. Čtenáři tak byla poskytnuta úvodní orientace v dané oblasti.

Byla proměřena doba života singletního kyslíku v závislosti na koncentraci β -karotenu a s dobrou přesností určena zhášecí konstanta $k_{\Delta Q} = (10,9 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, která odpovídá dříve publikovaným výsledkům a je řádově srovnatelná s teoretickým odhadem difusní limity. Zhášení je bimolekulárního charakteru. Karoten se ve zkoumaném roztoku chová jako antioxidant – zháší singletní kyslík. Z hodnoty zhášecí konstanty a koncentrací β -karotenu ve vybraných tkáních živých organismů lze usoudit, že β -karoten má potenciál být účinným biologickým antioxidantem. V živých organismech jsou však procesy velmi složité a je možno očekávat různé synergické efekty, proto je pro přesnější pochopení funkce antioxidantů nutné zkoumat jejich působení *in vivo*.

Ukázalo se, že triplet TPP se pravděpodobně nalézá ve dvou formách, což by bylo možné připsat efektu agregace. Děle žijící forma se podle všeho účastní fotosensibilizace ${}^1\text{O}_2$ nevýznamně nebo vůbec a je zřejmě β -karotenem zhášena. Byla určena rychlostní konstanta pro zhášení děle žijící formy ${}^3\text{PS}$ β -karotenem $k_{T_1'Q} = (8 \pm 3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, která je také řádově srovnatelná s teoretickým odhadem difusní limity. Krátce žijící forma tripletu TPP generující ${}^1\text{O}_2$ není ve zkoumaném koncentračním rozsahu β -karotenem významně zhášena a z experimentu nelze usuzovat na hodnotu odpovídající rychlostní zhášecí konstanty. Rozpuštěný kyslík, vzhledem ke značné vyšší koncentraci oproti β -karotenu a vysokému kvantovému výtěžku fotosensibilizace, byl v experimentálních podmínkách dominantním zhášečem tripletu TPP. Získané výsledky jsou zajímavé v kontextu předpokládaného ochranného účinku β -karotenu ve fotosyntéze, který podle literatury spočívá ve zhášení excitovaného tripletu fotosyntetických pigmentů.

Vytyčené cíle práce byly splněny. Kromě toho, že práce poskytla odpovědi na některé zajímavé otázky, otevřela i celé spektrum možností navazujícího výzkumu. Některými z cílů další práce by mohlo být měření *in vitro* s dalšími druhy antioxidantů a fotosensibilizátorů, měření při změně koncentrací kyslíku a fotosensibilizátoru, pokus o lepší simulaci podmínek panujících v živých organismech a také rozvoj technik měření *in vivo* či *ex vivo*.

Literatura

- [1] BAIER, J.; FUSS, T.; POLLMANN, C.; a kol.: Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 87, Issue 3, 2007: s. 163–173.
- [2] BLANKENSHIP, R.: *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford, 2002, ISBN 0-632-04321-0.
- [3] BONDAREV, S.; KNYUKSHTO, V.: Fluorescence from the S_1 (2^1A_g) state of all-trans- β -carotene. *Chemical Physics Letters*, Volume 225, Issue 4-6, 1994: s. 346–350.
- [4] BURRI, B.: β -carotene and human health: A review of current research. *Nutrition Research*, Volume 17, Issue 3, 1997: s. 547–580.
- [5] CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M.: Mechanisms in photodynamic therapy: part one — photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 1, 2004: s. 279–293.
- [6] CLENNAN, E.; PACE, A.: Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron*, Volume 61, Issue 28, 2005: str. 6665–6691.
- [7] CLÓ, E.; a kol.: Control and Selectivity of Photosensitized Singlet Oxygen Production: Challenges in Complex Biological Systems. *ChemBioChem*, Volume 8, Issue 5, 2007: str. 475–481.
- [8] CONN, P.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T.: The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 11, Issue 1, 1991: s. 41–47.
- [9] DAVYDOV, A.: *Kvantová mechanika*. SPN, Praha, 1978.
- [10] DE WEERD, F.: Subpicosecond dynamics in the excited state absorption of all-trans- β -Carotene. *Chemical Physics Letters*, Volume 354, Issue 1-2, 2002: s. 38–43.
- [11] DEROSA, M.; CRUTCHLEY, R.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 233, 2002: s. 351–371.
- [12] EDGE, R.; McGARVEY, D.; TRUSCOTT, T.: The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 41, Issue 3, 1997: s. 189–200.
- [13] GILBERT, D. L.; COLTON, C. A.: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 1999, ISBN 0-306-45756-3.

- [14] GILLBRO, T.; COGDELL, R.: Carotenoid fluorescence. *Chemical Physics Letters*, Volume 158, Issue 3-4, 1989: s. 312–316.
- [15] HA, J.; a kol.: Photophysical Efficiency Factors of Singlet Oxygen Generation from Core-modified Trithiasapphyrin Derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Volume 23, Issue 2, 2002: s. 281–285.
- [16] HANDELMAN, G.: The Evolving Role of Carotenoids in Human Biochemistry. *Nutrition*, Volume 17, 2001: s. 818–822.
- [17] HURST, J.; McDONALD, J.; SCHUSTER, G.: Lifetime of singlet oxygen in solution directly determined by laser spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, Volume 104, Issue 7, 1982: s. 44–84.
- [18] JELÍNEK, O.: *Experimentální metody biofyziky III., Luminiscence, skriptum MFF UK*. SPN, Praha, 1983.
- [19] KANOFSKY, J.; a kol.: Singlet Oxygen Production by Human Eosinophils. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 263, Issue 20, 1988: s. 9692–9696.
- [20] KOŘÍNEK, M.; a kol.: Luminescence Study of Singlet Oxygen Production by Mesotetraphenylporphine. *Journal of Fluorescence*, Volume 14, Issue 1, 2004: s. 71–74.
- [21] KOŘÍNEK, M.; a kol.: A comparison of photosensitizing properties of mesotetraphenylporphin in acetone and in dimethyl sulfoxide. *Journal of Molecular Structure*, Volume 744, Issue Sp. Iss. SI, 2005: s. 727–731.
- [22] KRASNOVSKY, A.; a kol.: The photophysics of monomeric bacteriochlorophylls-c and bacteriochlorophylls-d and their derivatives – properties of the triplet-state and singlet oxygen photogeneration and quenching. *Photochemistry and Photobiology*, Volume 57, Issue 2, 1993: s. 324–330.
- [23] KRINSKY, N.: Carotenoids as Antioxidants. *Nutrition*, Volume 17, Issue 10, 2001: s. 815–817.
- [24] KRINSKY, N.; JOHNSON, E.: Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 26, 2005: s. 459–516.
- [25] LAKOWICZ, J.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983, ISBN 0-306-41285-3.
- [26] MARSTON, G.; a kol.: Phosphorescence of beta-carotene. *Journal of the Chemical Society – Faraday Transactions*, Volume 91, Issue 22, 1995: s. 4059–4061.
- [27] MELNIKOVA, V.; a kol.: Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-sensitized photodynamic damage of cultured tumor and normal cells in the presence of high concentrations of α -tocopherol. *Cancer Letters*, Volume 139, 1999: s. 89–95.
- [28] Molekulové orbitaly singletního kyslíku [online]. Nahráno 11.5.2007, shlédnuto 1.6.2009. URL <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c7/Molek%C3%BDl orbital-Sauerstoff.png>

- [29] NEPRAŠ, M.; TITZ, M.: *Základy teorie elektronových spekter*. SNTL, Praha, 1983.
- [30] NIELSEN, B.; a kol.: Singlet versus Triplet Reactivity in Photodegradation of C₄₀ Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 44, Issue 8, 1996: str. 2106–2113.
- [31] RAO, A.; RAO, L.: Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, Volume 55, Issue 3, 2007: s. 207–216.
- [32] SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R.: Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews*, Volume 103, Issue 5, 2003: s. 1685–1757, ISSN 0146-0749.
- [33] SHARMAN, W.; ALLEN, C.; VAN LIER, J.: Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery today*, Volume 4, Issue 11, 1999: s. 818–822.
- [34] SKÁLA, L.: *Kvantová teorie molekul, skriptum MFF UK*. Karolinum, Praha, 1995.
- [35] STAHL, W.; SIES, H.: Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 24, Issue 1, 2003: str. 345–351.
- [36] VALKO, M.; a kol.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 39, 2007: s. 44–84.
- [37] WILKINSON, F.; a kol.: Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution – an expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, Volume 24, Issue 2, 1995: s. 663–1021.
- [38] YOUNG, A.; LOWE, G.: Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 385, Issue 1, 2001: s. 20–27.