

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra anorganické chemie

**Nanotkaniny produkující singletový kyslík**

Bakalářská práce

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Soňa Jesenská

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jiřího Mosingera Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity

V Praze dne.....

.....

podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za množství cenných rad a připomínek při vedení mé bakalářské práce. Můj velký dík patří rovněž Mgr. Lukáši Plíštilovi za přípravu PUR nanotkaniny s enkapsulovanými senzitzery.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	6
1.1. Singletový kyslík a fotosensitizovaná reakce.....	6
1.2. Porfyriny a ftalocyaniny.....	9
1.3. Nanotkaniny se sensitizerem.....	11
2. CÍL PRÁCE.....	14
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	14
3.1. Použité chemikálie, roztoky a bakterie.....	14
3.1.1. Chemikálie.....	14
3.1.2. Roztoky.....	15
3.1.3. Bakterie.....	15
3.2. Přístroje a metody.....	15
3.2.1. Přístroje.....	15
3.2.2. Příprava agarové půdy.....	16
3.2.3. Důkaz fotocytotoxicity ZnTPPS <sub>4</sub> .....	16
3.2.4. Detekce <sup>1</sup> O <sub>2</sub> – jodidová metoda.....	17
3.2.5. Fotodegradace sensitizerů enkapsulovaných v PUR nanotkanině.....	19
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
4.1. Důkaz fotocytotoxicity ZnTPPS <sub>4</sub> .....	20
4.2. Detekce <sup>1</sup> O <sub>2</sub> u nanotkanin s enkapsulovanými sensitizery.....	22
4.3. Fotodegradace sensitizerů enkapsulovaných v PUR nanotkanině .....	28
.	
5. ZÁVĚR.....	33
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	34

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
$A_{351\text{nm}}$	absorbance při 351nm
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ]
DMF	N, N' - dimethylformamid
$E^0$	standardní redoxní potenciál [V]
$\Gamma$	jodidový anion
$\text{I}_3^-$	trijodidový anion
ic	interní konverze („internal conversion“)
isc	mezisystémový přechod („intersystem crossing“)
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace $\text{H}_3\text{O}^+$ iontů
pHm	plošná hmotnost [ $\text{g} / \text{m}^2$ ]
PUR	polyurethan
$S_0$	sensitizer v základním singletovém stavu
$S_1$	sensitizer v nejnižším excitovaném singletovém stavu
$t$	čas [s]
$T_1$	sensitizer v nejnižším excitovaném tripletovém stavu
$t_{1/2(\text{deg})}$	poločas fotodegradace [min]
TPP	5, 10, 15, 20- <i>meso</i> -tetrafenylporfyrin
Pc	ftalocyanin
ZnTPP	zinečnatý komplex 5, 10, 15, 20- <i>meso</i> -tetrafenylporfyrinu
ZnTPPS <sub>4</sub>	zinečnatý komplex 5, 10, 15, 20- <i>meso</i> -tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrinu
ZnPc	zinečnatý komplex ftalocyaninu
UV/VIS	ultrafialové / viditelné záření
$\Phi_{\Delta}$	kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\tau$	doba života [s]

## 1. ÚVOD

### 1.1. SINGLETOVÝ KYSLÍK A FOTOSENSITIZOVANÉ REAKCE

Kyslík hraje mimořádnou roli v přírodních systémech. Stačí připomenout jeho funkci v metabolismu živých organismů. Není bez zajímavosti, že existuje jak v tripletovém tak v singletovém stavu.

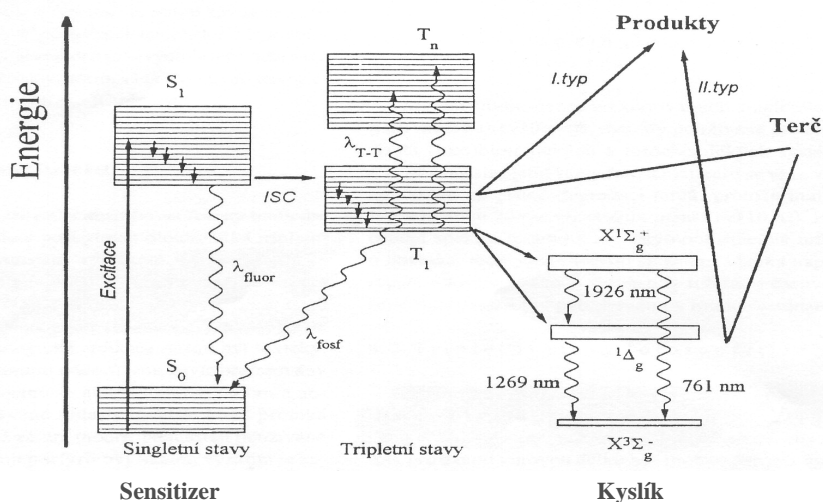
Molekula singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ) se nachází v elektronovém excitovaném stavu, kdy jsou všechny elektrony spárovány. Multiplicita spinu je 1 (singlet).<sup>1</sup>

Většina existujících látek (organické sloučeniny, anorganické anionty, plyny, sloučeniny hlavních podskupin a nepřechodné kovy) má v základním stavu všechny elektrony spárovány, je v singletovém stavu. Molekula kyslíku v základním energetickém stavu má však podle Hundova pravidla dva nepárové elektrony s paralelními spiny a je tedy ve stavu tripletovém ( $^3\text{O}_2$ ).<sup>1</sup> Pro reakce většiny látek s  $^3\text{O}_2$  platí tzv. „spinový zákaz“ reakce. Tyto reakce proto probíhají neochotně a pouze při vysoké aktivační energii.<sup>2</sup>

Spinový zákaz, který platí pro reakce většiny látek s  $^3\text{O}_2$ , neplatí pro reakce s  $^1\text{O}_2$ . Díky tomu a kvůli velikosti standardního redoxního potenciálu  $E^0(^1\text{O}_2/\text{O}_2 \cdot^-)$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (tj. 0,79 V) je  $^1\text{O}_2$  velmi silným oxidačním činidlem.<sup>1</sup> Pro jeho vysokou reaktivitu a s ní spojenou oxidativní cytotoxicitu je tato forma kyslíku od svého experimentálního důkazu existence v 60. letech stále v popředí zájmu.<sup>3,1</sup>

Singletový kyslík vzniká řadou reakcí fyzikálních (např. mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře), chemických (např. reakce chlornanu s peroxidem vodíku) či biologických (např. reakce peroxidáz).<sup>4,5</sup>

Nejčastěji používané metody vzniku  $^1\text{O}_2$  jsou však metody fotosensitizované generace. Podle Grotthusova-Draperova teorému vyvolá chemickou změnu systému pouze světelné kvantum systémem absorbované. Protože molekula kyslíku má v běžné UV-VIS oblasti záření pouze velmi nevýraznou absorpci, je excitována nepřímo prostřednictvím sensitizeru, který v dané oblasti absorbuje dostatečně.<sup>1</sup> Schéma na obr.1<sup>6</sup> vysvětluje základní zářivé i nezářivé přechody v systému sensitizer - kyslík.



**Obr.1:** Jablonskiho diagram energetických přechodů v molekule senzitizeru a kyslíku<sup>6</sup>

Při fotosenzitizované reakci se senzitizer absorpcí světelného kvanta excituje do singletového stavu  $S_1$  (doba života  $\tau \sim 10^{-8}$  s). Ten se samovolně deaktivuje buď fluorescencí a interní konverzí („internal conversion“; ic) do stavu  $S_0$  či mezisystémovým přechodem („intersystem crossing“; isc) do stavu tripletního  $T_1$ . Tripletní stav  $T_1$  má relativně dlouhou dobu života ( $\tau \sim 10^{-3}$  s) díky tomu, že jeho deaktivace fosforescencí a mezisystémovým přechodem jsou pochody tzv. spinově zakázané. Díky tomu může stav  $T_1$  vstupovat do zhášecích reakcí zprostředkovaných další molekulou (tzv. bimolekulární zhášení) a to dvěma mechanismy. Při mechanismu typu I dochází k přenosu elektronu ze senzitizeru na substrát (pokud jím je kyslík, pak dochází ke vzniku superoxidového anion-radikálu  $O_2^-$ ). Singletový kyslík vzniká při mechanismu typu II, kdy se molekula kyslíku v základním energetickém stavu excituje přenosem energie z  $T_1$  stavu senzitizeru.<sup>1,6,7</sup>

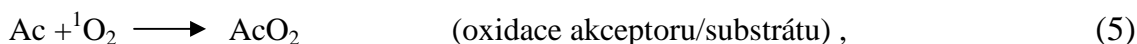
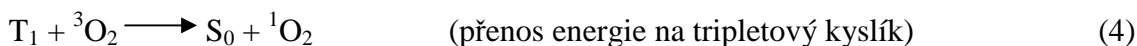
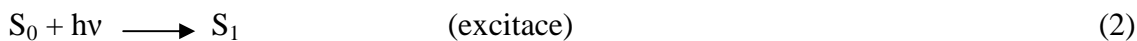
Množství vzniklého  $^1O_2$  a tím i účinnost fotochemické reakce je charakterizována kvantovým výtěžkem singletového kyslíku  $\Phi_\Delta$  :

$$\Phi_\Delta = (\text{počet molekul } ^1O_2) / (\text{počet světelných kvant absorbovaných senzitizerem})^7 \quad (1)$$

Výše uvedeným mechanismem typu II vzniknou dva stavy singletového kyslíku. Stav  $O_2(^1\Delta_g)$  s energií 94,1 kJ/mol a stav  $O_2(^1\Sigma_g)$  s energií 156,9 kJ/mol. Doba života  $O_2(^1\Sigma_g)$  v roztocích v závislosti na rozpouštědle (ps - ns) je až o 3 až 6 řádů menší než doba života  $O_2(^1\Delta_g)$  ( $\mu\text{s}$  - ms), což je dáno tím, že přechod  $O_2(^1\Sigma_g) \rightarrow O_2(^1\Delta_g)$  je tzv. spinově dovolený, ale přechod  $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g)$  není. Z důvodu krátké doby života

nebyla účast  $O_2(^1\Sigma_g)$  ve fotooxidačních reakcích zprostředkovaných  $^1O_2$  v roztocích prokázána. Jisté ale je, že  $O_2(^1\Sigma_g)$  se ve významné míře přeměňuje na  $O_2(^1\Delta_g)$ , který je hlavním oxidačním činitelem.<sup>1</sup>

Reakční mechanismus fotosensitizované reakce lze zjednodušeně vyjádřit takto:



kde  $S_0$  je sensitizér v základním singletovém stavu,  $S_1$  je sensitizér v nejnižším excitovaném singletovém stavu,  $T_1$  je sensitizér v nejnižším excitovaném tripletovém stavu.<sup>8</sup>

Singletový kyslík v roztoku zaniká buď fosforescencí, srážkami s molekulami nebo zhášením. To je buď fyzikální (přenos energie na molekulu zhášeče, který ji následně rozptyluje do okolí) nebo chemické (oxidace reaktantu). Mezi typické reakce  $^1O_2$  patří adice  $^1O_2$  na dvojně vazby olefinů, aromátů a heterocyklů za vzniku endoperoxidů, hydroperoxidů a dioxoethanů. Známé jsou též oxidace sulfidů.<sup>9</sup>

Singletový kyslík je pro své oxidační schopnosti hojně používán v organické syntéze, jeho cytotoxicity se využívá při fotodynamické terapii rakoviny a pro desinfekční a čistící účely<sup>10</sup> Sensitizéry tvořící  $^1O_2$  mohou sloužit i jako perspektivní fotopesticidy.<sup>10</sup>

Oxidační vlastnosti  $^1O_2$  však mohou mít i negativní vliv na lidský organismus. Singletový kyslík např. snadno reaguje s nukleovými kyselinami a aminokyselinami v proteinech. Způsobuje tak degradaci proteinů, mutaci a stárnutí.<sup>1, 10</sup> Uvádí se, že  $^1O_2$  je součinitelem či dokonce původcem chorob jako např. porfyrie a šedý oční zákal (katarakta). Obě nemoci jsou spojené s výskytem endogenních sensitizérů v postižené tkáni.<sup>1, 10</sup>

V organismu člověka vzniká  $^1O_2$  jako meziprodukt některých enzymatických procesů a fotosensitizovanou produkcí endogenních sensitizérů a léčiv. Na obranu vůči němu organismus využívá chemických zhášečů či antioxidantů – karotenoidů, tokoferolů, kyseliny močové, melatoninu, kys. askorbové atd.<sup>10</sup>



## 1.2. PORFYRINY A FTALOCYANINY

Přenos energie nebo elektronu na kyslík v základním energetickém stavu při fotosensitizovaných reakcích jsou kompetitivní cesty a záleží na fyzikálně-chemických a fotofyzikálních vlastnostech sensitizeru, která z nich převáží. Pro generaci  $^1\text{O}_2$  je třeba použít sensitizer vykazující reakci typu II.

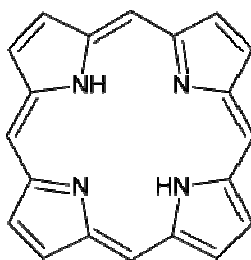
Vhodný sensitizer musí absorbovat použité excitující záření, poskytovat dlouhožijící tripletový stav o energii vyšší než je energie  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  (tj. 94,1 kJ/mol) a mít vysoký  $\Phi_\Delta$ .<sup>6</sup>

Obvykle se používají sensitizery typu ( $\pi, \pi^*$ ), kde excitovaný elektron pochází z  $\pi$  orbitalu, což jsou např. barviva jako eosin, akridin, bengálská červeň, methylenová modř, anthracen, triarylmethanová barviva, porfyriny, ftalocyaniny, expandované porfyriny a jejich metalokomplexy.<sup>1,7</sup>

Kromě vysokého  $\Phi_\Delta$  je důležitým faktorem stabilita sensitizeru vůči fotodegradaci a fotooxidaci vzniklým  $^1\text{O}_2$  (či dalšími reaktivními formami kyslíku). Při medicínském použití je důležitá i nízká temná toxicita sensitizeru.<sup>7, 11</sup>

Porfyriny a ftalocyaniny jsou sensitizery vhodné pro použití v biologických systémech, protože se v nich v různých formách přirozeně vyskytují. Ve tmě jsou většinou netoxické, což umožňuje jejich využití v medicíně (např. při fotodynamické terapii nádorů), jejich tripletové stavy jsou dlouhožijící a vykazují vysoký  $\Phi_\Delta$ .<sup>7, 10</sup> Patří do širší skupiny porfyrinoidních sensitizerů, což jsou sloučeniny s cyklickou tetra- nebo oligopyrrolovou strukturou.

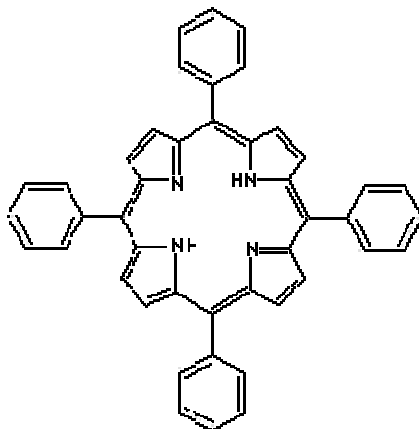
Porfyrinové sensitizery jsou deriváty porfinu (obr.2), cyklické sloučeniny vzniklé spojením čtyř pyrrolových kruhů methinovými můstky.<sup>12</sup>



**Obr.2:** Strukturní vzorec porfinu

Porfyriny mají v UV/VIS oblasti charakteristické spektrum obsahující intenzivní tzv. Soretův pás (kolem 400 nm) a sérii méně intenzivních Q-pásů (oblast kolem 500 - 700 nm).<sup>13</sup> Díky tomu dokáží absorbovat značnou část spektra VIS záření. Poloha, počet pásů a poměr jejich vzájemných intenzit poskytuje informace o okolí a derivatizaci porfinového kruhu.

Jedním z velmi účinných druhů porfyrinů je 5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrin; TPP (obr.3) a jeho deriváty. TPP je znám jako sensitizer poskytující fotosensitizovanou reakcí výhradně singletový kyslík s kvantovým výtěžkem 0,62 - 0,74.<sup>14</sup>



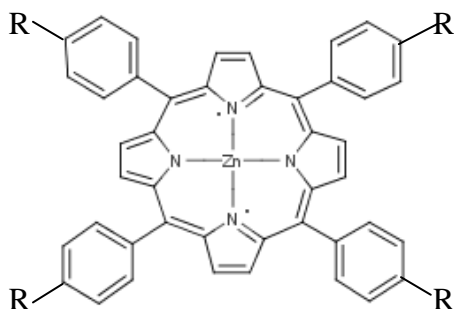
**Obr. 3:** Strukturální vzorec 5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrinu; TPP

Ftalocyaniny mají díky postranním benzenovým kruhům a tedy rozsáhlejšímu systému konjugovaných dvojných vazeb absorpční pásy v červené oblasti VIS záření ( $\lambda = 680 - 740 \text{ nm}$ ).<sup>7</sup>

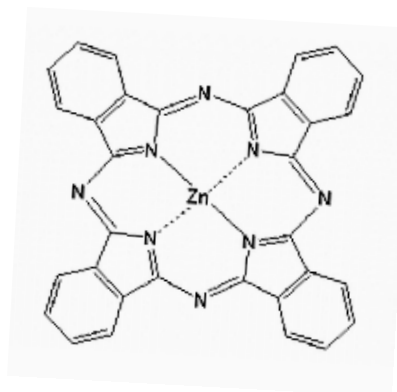
Porfyrinoidní senzitizery jsou většinou planární molekuly a díky konjugovanému systému dvojných vazeb mají tendenci vytvářet v roztoku agregáty vázané  $\pi$ - $\pi$  interakcemi. Důsledkem agregace je radikální snížení produkce singletového kyslíku, protože absorbovaná energie se uvolní hlavně neradiačními procesy a doba života tripletových stavů fotosensitizeru výrazně poklesne. Agregace je ovlivněna teplotou, polaritou, pH a iontovou silou roztoku a jí lze zabránit např. navázáním porfyrinoidních senzitizerů na anorganické i organické pevné nosiče.<sup>1,7</sup> Jimi jsou například částice silikagelu,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , zeolitu, hydrotalcitu atd.<sup>15,16</sup> Další nadějně materiály sloužící jako nosiče jsou i polymerní nanotkaniny.<sup>17</sup>

V této práci byly jako porfyrinoidní senzitizery použity zinečnatý komplex 5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrinu ZnTPP (obr.4a), zinečnatý komplex ftalocyaninu

ZnPc (obr.4b) a zinečnatý komplex 5,10,15,20-*meso*-tetra(4-sulfonatofenyl)pofyriu ZnTPPS<sub>4</sub> (obr.4a).



a



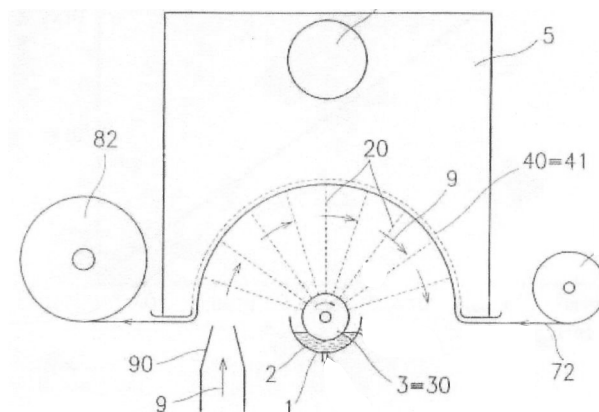
b

**Obr. 4:** a) Strukturní vzorec ZnTPP; R = H  
 ZnTPPS<sub>4</sub>; R = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
 b) Strukturní vzorec Zn-Pc

### 1.3. NANOTKANINY S ENKAPSULOVANÝM SENSITIZEREM

Jako tzv. nanotkaniny označujeme netkané tkaniny tvořené polymerními nanovláknými (polytetrafluorethylenem; PTFE, polyuretanem; PUR, polyethylenem; PET, nylonem atd.). Nanotkaniny obecně jsou prodyšné materiály o velkém specifickém povrchu, malé hmotnosti a vysoké mechanické odolnosti. Proto jsou široce využívány jako nosiče léčiv, filtrační materiály, materiály pro oblečení atd.<sup>18,19,20</sup>

V této práci byly použity PUR nanotkaniny připravené metodou „electrospinning“ (technologie Nanospider<sup>TM</sup>) z roztoku polymeru v N,N'-dimethylformamidu (DMF). (obr.5).<sup>17,21</sup>



**Obr. 5:** Technologie výroby PUR nanotkanin<sup>17</sup> ; 1 – nádržka s roztokem polymeru, 2 – roztok polymeru, 3 – rotující nabitý váleček, 40 – uzemněná elektroda, 5 – kryt, 6 – vakuové potrubí, 90 – potrubí pro vzduch, 9 – vzduch, 20 – tvořící se nanovlákna, 72 – polypropylenový podkladový materiál, 82 – sběrný mechanismus

Technologie Nanospider<sup>TM</sup> využívá stejnosměrného elektrostatického pole o vysoké intenzitě (až 50 kV), které je tvořeno napětím mezi elektrodami, z nichž jedna je v podobě rotujícího válečku částečně ponořeného v roztoku polymeru a druhá (tj. kolektor) v podobě půlkruhu, který je postavený proti válečku.

Rotující nabitý váleček otáčením nabírá roztok a ten se díky Coulombické a odstředivé síle vytahuje směrem ke kolektoru tzv. Taylorovým kuželem. Cestou ke kolektoru dochází k dalšímu dloužení a štěpení vlákna, což je spojeno s nárůstem povrchu a odchodem rozpouštědel. Na polypropylenovou podkladovou textilii, která se pohybuje rovnoměrně jedním směrem po kolektoru, dopadají již suchá nanovlákna. Náboj, který vytahovaná hmota nese a který má stejnou polaritu jako náboj válečku, by měl být vybit na kolektoru, který zpravidla bývá uzemněn.<sup>21</sup>

Tloušťku nanotkaniny (obvykle 0,03 - 0,3 mm) lze řídit pomocí lineární rychlosti pohybu podkladové textilie. Obvykle udávaná plošná hmotnost je  $pHm = 0,1-2 \text{ g/m}^2$ .<sup>17</sup>

V naší laboratoři byly již dříve testovány PUR nanotkaniny s enkapsulovaným TPP<sup>17</sup>. Absorpční i fluorescenční spektrum TPP enkapsulovaného v nanotkanině se ukázalo být shodné se spektrem TPP v nepolárních rozpouštědlech typu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Charakter absorpčních pásů odpovídá monomerní formě. Studium časově rozlišené

spektroskopie bylo zjištěno, že tripletové stavy TPP jsou výrazně zhášeny  $^3\text{O}_2$ . Po laserové excitaci vzorku porfyrinem dopované nanotkaniny byla pozorována luminiscence při 1270 nm (odpovídající fosforescenci  $^1\text{O}_2$ ), která zmizela po umístění vzorku do Ar atmosféry a opět se objevila v přítomnosti kyslíku nebo vzduchu.<sup>17</sup>

Z výsledků studia časově rozlišenou spektroskopií dále vyplynulo, že tripletové stavy enkapsulovaného sensitizery jsou relativně inertní vůči okolí, do kterého se nanotkanina dostane (s výjimkou  $^3\text{O}_2$ ). Doby života  $^1\text{O}_2$  generovaného ozářením porfyrinem dopované nanotkaniny jsou naopak velmi citlivé na prostředí, do kterého se nanotkanina dostane. Z toho plyne důležitý závěr – většina sensitizery je zabudována dovnitř nanovláken, proto jejich tripletové stavy nejsou ovlivněny prostředím. Singletový kyslík naopak může volně difundovat ze středu nanovláknka k povrchu, kde může oxidovat substrát a podléhat neradiačnímu zhášení okolními molekulami.<sup>17</sup>

Další pokusy vykazaly silnou fotooxidační schopnost porfyrinem dopované nanotkaniny vůči různým anorganickým i organickým substrátům. Též byl zjištěn velice silný fotocytotoxický efekt na povrchu nanotkanin, který byl prokázán na bakteriích *Escherichia coli* DH5a s plasmidem pGEM11Z (Promega, WI, USA).<sup>17</sup>

Spojení nanotkaniny s fotosensitivní látkou se může využít pro desinfekční účely. Výhodou je i to, že díky malým velikostem pórů mezi vlákny jsou nanotkaniny schopny zachytávat bakterie a větší viry, které jsou tvořeny singletovým kyslíkem na světle ničeny.<sup>17</sup>

V této práci byly použity PUR nanotkaniny s enkapsulovaným ZnTPP, ZnPc a směsí ZnTPP a ZnPc. Uvedené sensitizery se do nanotkanin zabudovávají během jejich přípravy rozpuštěním v roztoku PUR v DMF (řádově 0,1%), který je poté výše uvedeným způsobem zvlákněn.

## 2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo zjistit fotooxidační schopnost nanotkanin se dvěma zabudovanými porfyrinoidními sensitizery.

Dílčí cíle zahrnovaly:

- 1) Důkaz fotocytotoxických účinků volného porfyrinoidního vodorozpustného sensitizeru ZnTPPS<sub>4</sub>.
- 2) Porovnání fotooxidační schopnosti PUR nanotkanin dopovaných sensitizery (ZnTPP, ZnPc a směsí ZnTPP a ZnPc).
- 3) Studium fotodegradace uvedených fotosensitizerů v PUR nanotkanině.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A BAKTERIE

#### 3.1.1. Chemikálie

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid; X-Gal (Invitrogen, CA, USA)

D<sub>2</sub>O 99% (Sigma-Aldrich)

Isopropyl-β-D- thiogalaktosid; IPTG (Invitrogen, CA, USA)

Karbamycin (Invitrogen, CA, USA)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> >99,5% (Fluka)

KI >99,0% (Fluka)

LB Agar (Sigma-Aldrich)

NaN<sub>3</sub> p.a. (Fluka)

Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnTPP, pH<sub>m</sub> = 2 g/m<sup>2</sup> (Elmarco s.r.o.)

Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnPc, PH<sub>m</sub>= 2 g/m<sup>2</sup> (Elmarco s.r.o.)

Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnTPP a 0,1% ZnPc, PH<sub>m</sub> = 2 g/m<sup>2</sup> (Elmarco s.r.o.)

NaOH p.a. (Penta)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 99,999% (Sigma-Aldrich)

ZnTPPS<sub>4</sub> (poskytnuto RNDr. Mosingerem, Ph.D.<sup>22</sup>)

### 3.1.2. Roztoky

Jodidové detekční činidlo v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru o pH = 6,2 pro stanovení  $^1\text{O}_2$  :

Byl připraven roztok 1 l sodno-draselného fosfátového pufru o pH = 6,2 v deionizované vodě, obsahující 0,02 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,7241 g) (pH bylo upraveno na 6,2 přidávkem 0,081 M NaOH). V pufru bylo rozpuštěno 0,12 mol KI (19,9212 g) a 10  $\mu\text{mol}$   $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  (0,002 g).

### 3.1.3. Bakterie

- kultura bakterií *Escherichia coli* - Bakteria DH5 $\alpha$  (Invitrogen, CA, USA),  
Plasmid pGEM11Z (Promega, WI, USA)

## 3.2 PŘÍSTROJE A METODY

### 3.2.1. Přístroje

Molekulová absorpční spektra (UV-VIS) byla měřena na přístroji UV-VIS Spektrofotometr UV 300 Unicam (UK) v 1cm křemenných kyvetách.

Ozařovací experimenty byly prováděny pomocí 300 W halogenové lampy Kaiser Videolight 8 (Německo) umístěné na optické hlavici a pomocí 150 W Lampy A. Krüss optotronic (Německo).

Pro měření pH byl použit pH-metr PH 526 od firmy WTWS s kombinovanou skleněnou elektrodou, která byla kalibrována na dva standardní pufrы (ftalátový pufr pH = 4,00 a fosfátový pufr = 7,00 od firmy Sevac).

Pro inkubaci bakterií byl použit inkubátor Incucell (Německo).

### 3.2.2. Příprava agarové půdy

17,5 g agaru bylo rozpuštěno v 500 ml deionizované vody v kádince, uzavřeno alobalem a 30 minut autoklávováno. Po zchladnutí agaru na 60 °C bylo k roztoku přidáno 500 µl antibiotika karbamycinu (100 mg/ml). Agar byl rozlit do Petriho misek.

### 3.2.3. Důkaz fotocytotoxicity ZnTPPS<sub>4</sub>

Na Petriho misky s čerstvou vychladlou agarovou půdou bylo napipetováno vždy po 40 µl 100 mM roztoku IPTG, 50 µl čisté bakteriální kultury *Escherichia coli* DH5α s plasmidem PGME11Z (o zákalové absorbanci při 600 nm  $A_{600} = 0,21$ ) a 40 µl roztoku X-Galu o koncentraci 20 µg/ml (automatickou pipetou se sterilní špičkou, rovnoměrně rozetřeno sterilizovanou skleněnou hokejkou). Používané kmeny *Escherichia coli* jsou resistantní vůči antibiotiku karbamycinu a dokáží štěpit X-Gal za uvolnění indolového barviva díky produkovanému enzymu  $\beta$ -galaktosidase.<sup>23</sup>

Kontrolní skupina tří agarových ploten s naočkovanými kulturami byla bez ozáření uložena do inkubátoru a ponechána 24 hodin při teplotě 37 °C.

Druhá skupina tří agarových ploten s naočkovanými kulturami byla 1 hodinu ozařována studeným 150 W světlem z lampy Krüss ze vzdálenosti 7 cm. Poté byly agarové plotny uloženy do inkubátoru a ponechány 24 hodin při teplotě 37 °C.

Na třetí skupinu tří agarových ploten s naočkovanými kulturami byly nakapány dvě kapky 10<sup>-4</sup> M roztoku ZnTPPS<sub>4</sub>, poté byly plotny 1 hodinu ozařovány za shodných podmínek a nakonec byly uloženy do inkubátoru a ponechány 24 hodin při teplotě 37 °C.

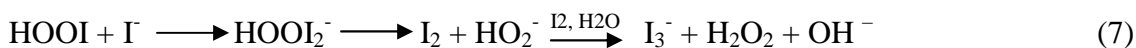
Na čtvrtou skupinu tří agarových ploten s naočkovanými kulturami byly nakapány dvě kapky 10<sup>-4</sup> M roztoku ZnTPPS<sub>4</sub> a poté byla skupina uložena do inkubátoru a ponechána 24 hodin ve tmě při teplotě 37 °C.

Po uplynutí 24 hodin byly všechny skupiny ponechány cca 4 hodiny při 4 °C a poté vizuálně zhodnoceny. Kolonie bakterií byly díky X-Galu zbarveny modře a tudíž bylo snadno viditelné, na kterých místech agarové plotny vyrostly resp. nevyrostly.



### 3.2.4. Detekce $^1\text{O}_2$ – Jodidová metoda

K detekci  $^1\text{O}_2$  byla použita jodidová metoda, která je založená na reakci fotogenerovaného  $^1\text{O}_2$  s  $\Gamma^-$  ve vodném prostředí v přítomnosti  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  jako katalyzátoru. Reakčním produktem je  $\text{I}_3^-$ , jehož množství je přímo úměrné fotogenerovanému  $^1\text{O}_2$  podle následujícího mechanismu:



Probíhá-li reakce v mírně kyselém prostředí v přítomnosti  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , uplatní se další krok reakce:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\Gamma^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  (8)



$\text{I}_3^-$  absorbuje v UV části spektra, absorpční maxima má při  $\lambda = 351$  a  $287$  nm.<sup>24</sup>

Provedení metody:

Do křemenné kyvety bylo napipetováno 2 ml jodidového činidla a do roztoku byl ponořen výstřižek nanotkaniny se sensitizérem o rozměru  $5 \times 5$  cm. Kyveta se vzorkem byla umístěna do vodou chlazeného ocelového kyvetového držáku a ozařována ze vzdálenosti 18 cm bílým 300 W světlem z halogenové žárovky Kaiser v určitých časových intervalech za míchání magnetickým míchadélkem (obr.6). Před ozařováním a 1 minutu po skončeném intervalu ozařování bylo změřeno absorpční spektrum jodidového činidla bez nanotkaniny na UV-VIS spektrofotometru Unicam (250-700 nm).

Takto byla porovnávána kinetika fotogenerace  $\text{I}_3^-$  při použití PUR nanotkanin s různými sensitizéry (s 0,1% ZnTPP, 0,1% ZnPc a směsí 0,1% ZnTPP a 0,1% ZnPc). Jako kontrolní byla použita PUR nanotkanina bez enkapsulovaného sensitizéru.

Dále byl proveden pokus ve tmě (ozařovací intervaly zde byly nahrazeny jedním 60-ti minutovým intervalem stání ve tmě) a pokus s nanotkaninami v jodidovém činidle v atmosféře  $\text{N}_2$  (jodidové činidlo bylo před prvním měřením 30 minut probubláváno  $\text{N}_2$  z tlakové lahve, doba ozáření byla  $1 \times 60$  minut a po celou dobu pokusu bylo jodidové činidlo se vzorkem nanotkaniny probubláváno  $\text{N}_2$ ).

Při zjišťování kinetiky fotogenerace  $I_3^-$  v různých detekčních čídicích (jodidové čídiclo : deionizovaná voda v poměru 1:1, jodidové čídiclo : těžká voda v poměru 1:1 a jodidové čídiclo : 0,2 M azid sodný v poměru 1:1) byla použita jiná technika. Vzorek nebyl v kyvetě volně ponořen, ale byl omotán třemi vrstvami na podložním křemenném sklíčku o rozměrech 1,3 x 4,5 cm, které bylo umístěno napříč kyvetou. Všechna měření probíhala v zatemněné místnosti.



**Obr. 6:** Optická hlavice pro ozařování vzorku v kyvetě; 1 - halogenová lampa, 2 - ocelový kyvetový držák, 3 - vodní chlazení, 4 - magnetické míchání

Kinetika fotogenerace  $I_3^-$  (resp. fotogenerace  $^1O_2$ ) byla hodnocena jako směrnice (B) závislosti absorbance při  $\lambda = 351 \text{ nm}$  ( $I_3^-$ ) na době ozáření. Vyhodnocení bylo prováděno v programu Origin Pro 7.5.

Statistické vyhodnocení výše uvedených směrnic: <sup>25</sup>

Pro odhad střední hodnoty byl užit medián  $\tilde{x}$  a aritmetický průměr.

Směrodatná odchylka SD byla vypočtena ze vzorce:

$$SD = k_n \cdot R, \quad (10)$$

kde  $k_n$  je koeficient tabelovaný pro jednotlivá množství měření  $n$  (tab.1)

a  $R$  je rozpětí, které je definováno:

$$R = x_{\max} - x_{\min}, \quad (11)$$

kde  $x_{\max}$  a  $x_{\min}$  jsou největší a nejmenší naměřené výsledky.

Relativní směrodatná odchylka  $s_{rel}$  byla vypočtena podle vzorce:

$$s_{rel} = (SD / \tilde{x}) \cdot 100\%, \quad (12)$$

Odlehlé výsledky byly vyloučeny podle Grubbsova testu:

$$T_n = |x_{max} - \tilde{x}| / SD \text{ nebo } T_n = |x_{min} - \tilde{x}| / SD, \quad (13)$$

Výsledek porovnáme s kritickou hodnotou  $T_k$  (tab.1). Je-li  $T_n > T_k$ , výsledek je odlehlý a je ho nutno vyloučit.

$n$	$k_n$	$T_k$
2	0,8862	-
3	0,5908	1,155
4	0,4857	1,481
5	0,4299	1,715
6	0,3946	1,887
7	0,3698	2,020
8	0,3512	2,126
9	0,3367	2,215
10	0,3249	2,290

**Tab. 1:** Tabelované hodnoty;  $n$  – počet měření

### 3.2.5. Fotodegradace sensitizerů enkapsulovaných v PUR nanotkanině

Fotodegradace v nanotkanině enkapsulovaných sensitizerů se projeví snížením hodnoty absorbance všech absorpčních pásů v průběhu ozařování (428 nm, 558 nm a 599 nm pro ZnTPP a 671 nm, 606 nm a 640 nm pro ZnPc).

Provedení metody:

Do křemenné kyvety bylo umístěno křemenné podložní sklíčko o rozměrech  $1,3 \times 4,5$  cm omotané třemi vrstvami vzorku sensitizerem dopované nanotkaniny. Kyveta se vzorkem byla umístěna do ocelového kyvetového držáku chlazeného vodou a ozařována ze vzdálenosti 18 cm bílým světlem z 300 W halogenové žárovky Kaiser v určitých časových intervalech (obr.6). Před ozářením a 1 minutu po jednotlivém ozáření bylo změřeno absorpční spektrum vzorku nanotkaniny v kyvetě na UV-VIS spektrofotometru Unicam v rozsahu vlnových délek od 350 do 800 nm.

K vyloučení možného tepelného rozkladu nanotkanin bylo provedeno ozařování studeným 150 W světlem z lampy Krüss ze vzdálenosti 7 cm.

Ke zjištění, zda je fotodegradace fotosensitizeru ovlivněna přítomností  $O_2$ , bylo provedeno kontrolní měření fotodegradace nanotkaniny za nepřítomnosti  $O_2$  v atmosféře

N<sub>2</sub>. Tři vrstvy vzorku nanotkaniny omotané na podložním sklíčku o rozměrech 0,9 × 2,5 cm byly ponechány 30 minut v kyvetě promývané N<sub>2</sub> z tlakové láhve a poté ozařovány za současného promývání N<sub>2</sub>.

Při zjišťování fodegradace fotosensitizerů při ponoření nanotkaniny v roztoku byla kyveta naplněna deionizovanou vodou.

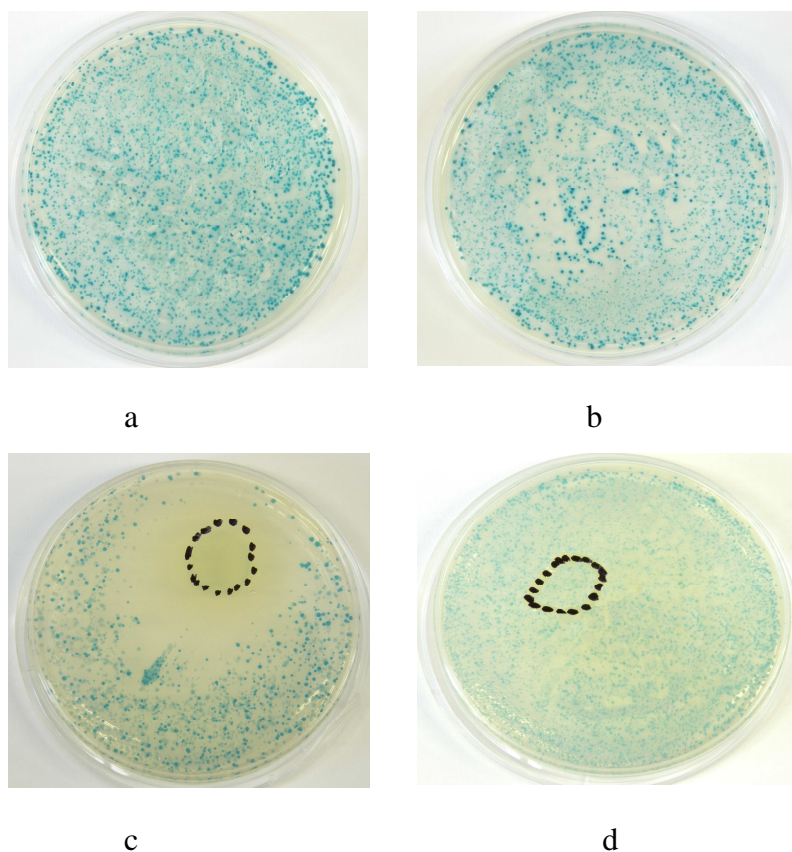
Fotodegradace v nanotkaninách enkapsulovaných sensitizerů byla hodnocena z grafů závislosti absorpance při  $\lambda = 428$  nm (ZnTPP) a 671 nm (ZnPc) na době ozáření. Vyhodnocení bylo prováděno v programu Origin Pro 7.5.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. DŮKAZ CYTOTOXICITY ZnTPPS<sub>4</sub>

Jedním z dílčích cílů této práce bylo ověřit metodiku stanovení cytotoxicity singletového kyslíku generovaného fotosensitizovanými reakcemi. Jako vhodný sensitizer byl zvolen ZnTPPS<sub>4</sub>, který má vysoký kvantový výtěžek (0,74).<sup>26</sup> K cytotoxickému testu byly použity bakterie *Escherichia coli* DH5a s plasmidem pGEM11Z v kombinaci se substrátem X-Gal, čímž byla umožněna snadná vizualizace bakteriálních kolonií. Princip metody stanovení fotocytotoxicity a její postup je uveden v kap. 3.2.3.

Agarové plotny ponechané ve tmě 24 hodin při 37°C vykazovaly masový nárůst bakteriálních kolonií po celé ploše (obr.7a). Agarové plotny bez přidaného sensitizeru po 1 hodinové expozici bílým studeným světlem a 24 hodinové inkubaci při 37°C vykazovaly rovnoměrný nárůst po celé ploše, ale s nižší hustotou než v předchozím případě (obr.7b). Plotny, ke kterým byl přidán sensitizer, v místě nanesené kapky ZnTPPS<sub>4</sub> zůstaly po 1 hodinové expozici bílým světlem a 24 hodinové inkubaci při 37°C bez nárůstu bakterií. Rovnoměrný nárůst začal až v určité vzdálenosti od nanesené kapky (v závislosti na jejím rozmytí) (obr.7c). Kontrolní agarové plotny s přidaným sensitizerem, ale inkubované pouze ve tmě 24 hodin při 37°C vykazovaly masový nárůst bakterií po celé ploše (obr.7d).



**Obr. 7:** Agarové plotny s inokulovanými bakteriemi *Escherichia coli*; neozářená bakteriální kolonie (a), bakteriální kolonie ozářená 1 hod. studeným bílým světlem (b), ozářená bakteriální kolonie se ZnTPPS<sub>4</sub> (c), ve tmě ponechaná bakteriální kolonie se ZnTPPS<sub>4</sub> (d) ; místo nanesení sensitizeru je vyznačeno černým tečkováním

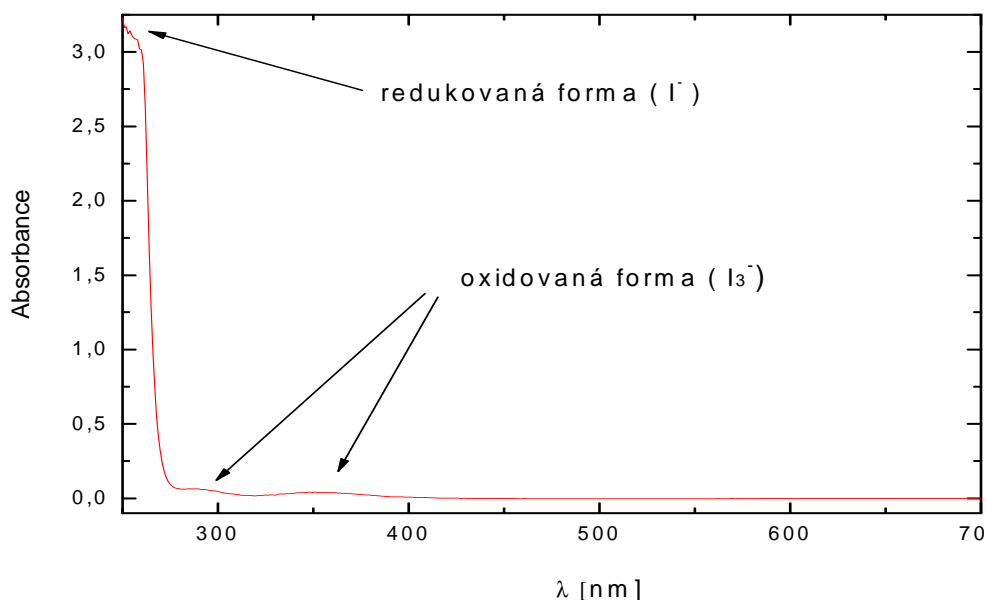
Z výsledků vyplývá, že sensitizer ZnTPPS<sub>4</sub> má výrazný fotocytotoxický účinek, velmi pravděpodobně zprostředkovaný fotogenerovaným <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (viz kap. 1.2), ale není cytotoxický ve tmě. Jak vyplývá z obr. 7b, i samotné použité světlo má mírný cytotoxický účinek. Výsledek tohoto pozorování potvrdil poznatky uváděné v literatuře.<sup>1,17</sup>

Provedené cytotoxické testy prokázaly vhodnost výše uvedené metodiky pro stanovení fotocytotoxicity vodorozpustných sensitizerů a sloužily jako metodický podklad pro budoucí studie u sensitizerů vázaných na pevné nosiče.

## 4.2. DETEKCE $^1\text{O}_2$ U NANOTKANIN S ENKAPSULOVANÝMI SENSITIZERY

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda senzitizery enkapsulované v průsvitných polymerních nanotkaninách jsou schopny oxidovat určitý substrát. K detekci  $^1\text{O}_2$  byla využita jodidová metoda (viz. kap. 3.2.4).

Složení a příprava jodidového činidla je popsána v kap. 3.1.2. Absorpční spektrum zásobního roztoku použitého jodidového činidla (obr.8) obsahuje tři absorpční pásy. Absorpční pás při  $\lambda < 275$  nm odpovídá jodidovému aniontu ( $\text{I}^-$ ) a absorpční pásy  $\lambda = 287$  nm a  $\lambda = 351$  nm aniontu trijodidovému ( $\text{I}_3^-$ ). Anion  $\text{I}_3^-$  je tedy přítomen již v zásobním roztoku ve velmi malém množství v důsledku pomalé oxidace  $\text{I}^-$  vzdušným kyslíkem.

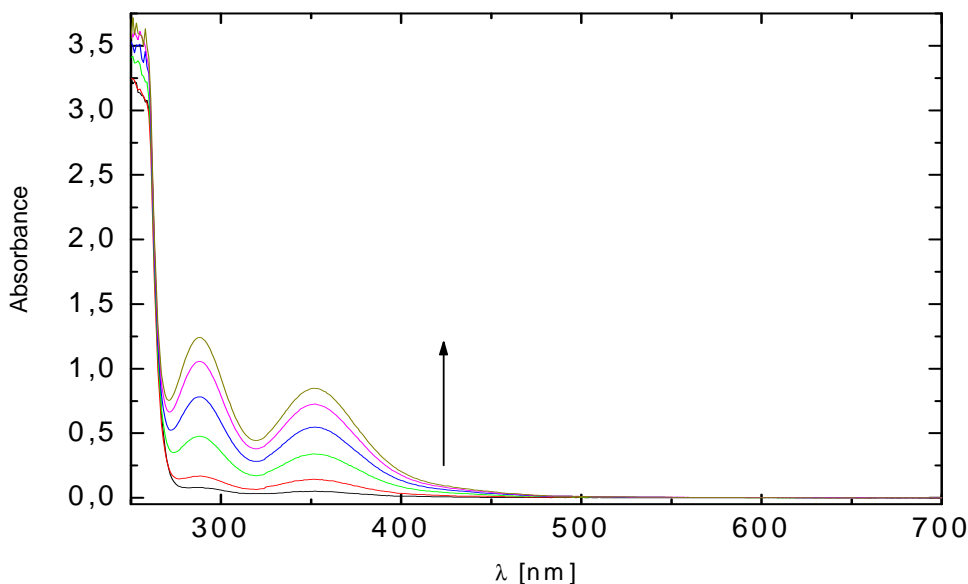


**Obr. 8:** Absorpční spektrum jodidového činidla v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru o pH = 6,2

K detekci a porovnání fotoprodukce  $^1\text{O}_2$  generovaného nanotkaninami dopovanými senzitizerem byl vždy použit výstřížek nanotkaniny shodných rozměrů ve shodném objemu jodidového činidla a použit shodný světelný zdroj se shodnou geometrií (viz kap. 3.2.4).

Trijodidový anion byl fotogenerován všemi třemi použitými typy nanotkanin (s enkapsulovaným ZnTPP, ZnPc i se směsí ZnTPP a ZnPc) ponořených do jodidového detekčního činidla. Absorpční spektrum detekčního činidla v průběhu ozařování

vykazovalo nárůst absorbance při 287 nm a 351 nm, což odpovídá  $I_3^-$  (měření bylo prováděno s vyjmutou nanotkaninou). Po celou dobu prováděného měření se v absorpčním spektru jodidového činidla neobjevily žádné absorpční další pásy. Z toho vyplývá důležitý závěr, že enkapsulované senzitizery se z nanotkanin nevymývají do roztoku (obr.9). Tento výsledek byl očekáván, protože všechny použité senzitizery jsou nepolární.



**Obr. 9:** PUR Larithane s 0,1%ZnTPP a s 0,1%ZnPc v jodidovém činidle; Generace  $I_3^-$  s dobou ozáření; před ozářením (černá), po 2 min. ozáření (červená), po 4 min. ozáření (zelená), po 6 min. ozáření (modrá), po 8 min. ozáření (fialová), po 10 min. ozáření (žlutá) ; šipka značí časový průběh nárůstu  $I_3^-$  při ozařování

U vzorků nanotkanin dopovaných senzitizerem, které byly dodány firmou Elmarco s.r.o., nelze očekávat stoprocentní homogenitu nanovláčkové vrstvy. Aby bylo možné porovnat fotoprodukcí  $^1O_2$  nanotkaninami, bylo nutné změřit a statisticky vyhodnotit 6-9 vzorků.

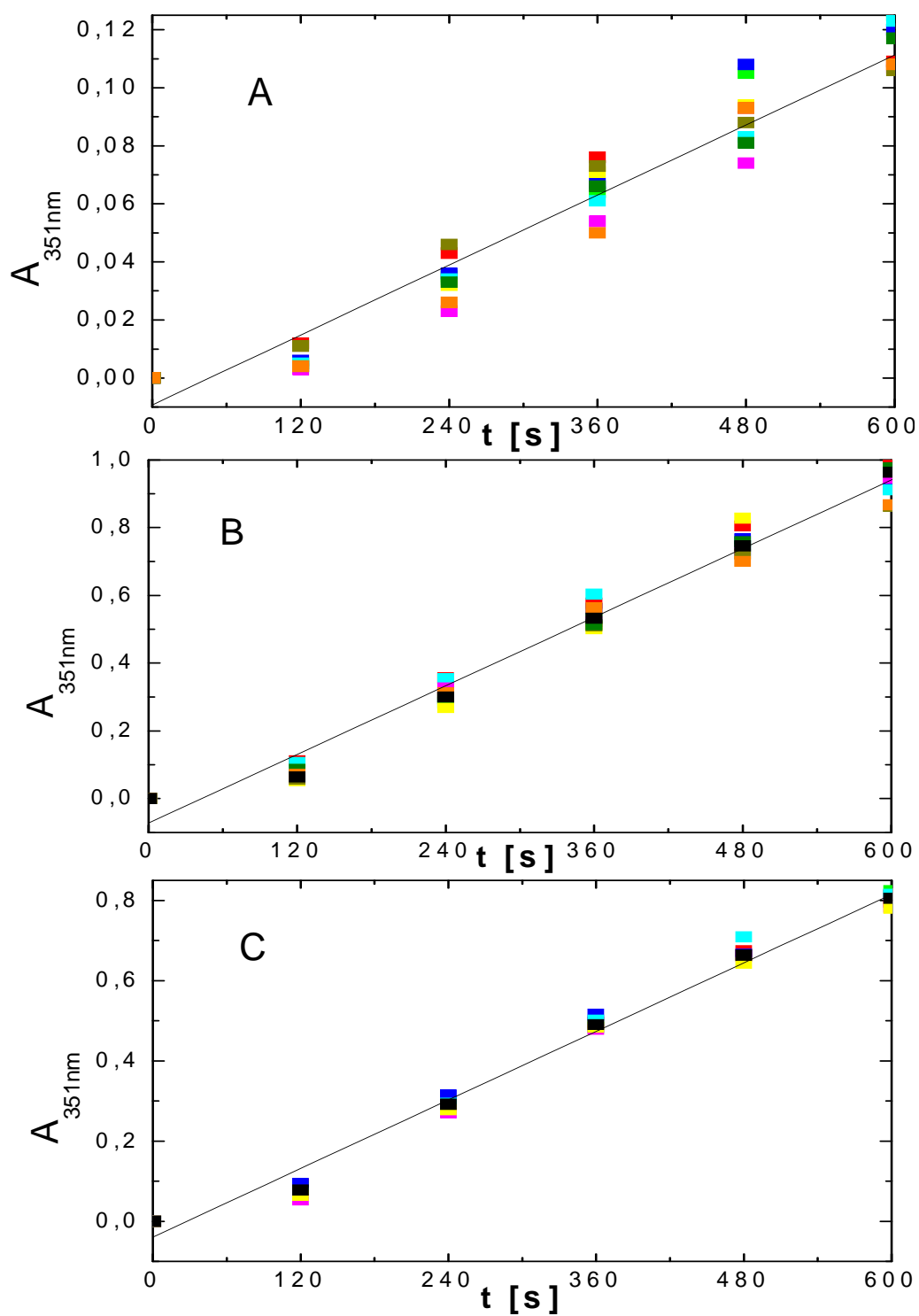
U všech použitých nanotkanin s enkapsulovanými senzitizerem (s ZnTPP, ZnPc a směsí ZnTPP a ZnPc) byl pozorován lineární nárůst absorbance  $I_3^-$  při  $\lambda = 351$  nm s dobou ozáření bílým světlem (obr. 10). Jak vyplývá z metody (viz kap. 3.2.4), směrnice této lineární závislosti (B) jsou přímo úměrné fotoprodukcí  $^1O_2$ .

V tab.2 jsou porovnány směrnice lineární závislosti absorbance  $I_3^-$  na době ozáření pro jednotlivé nanotkaniny s vyznačením mediánu, aritmetického průměru, SD a  $S_{rel}$ .

Sensitizer v PUR nanotkanině	ZnTPP	ZnPc	směs ZnTPP a ZnPc
<b>B</b> [s <sup>-1</sup> ]	$1,86 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-3}$
	$1,88 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-3}$
	$1,96 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$
	$1,98 \times 10^{-4}$	$1,64 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$
	$2,02 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-3}$	$1,44 \times 10^{-3}$
	$2,02 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-3}$
	$2,09 \times 10^{-4}$	$1,69 \times 10^{-3}$	-
	$2,23 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-3}$	-
	$2,27 \times 10^{-4}$	$1,76 \times 10^{-3}$	-
<b>Medián [s<sup>-1</sup>]</b>	<b><math>2,02 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>1,65 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,42 \times 10^{-3}</math></b>
<b>Aritmetický průměr</b>	$2,03 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-3}$
<b>SD [s<sup>-1</sup>]</b>	$1 \cdot 10^{-5}$	$7,4 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$
<b>S<sub>rel</sub> [%]</b>	5	4,5	2,5

**Tab. 2:** Statistické vyhodnocení hodnot směrnic (B) kinetiky fotogenerace I<sub>3</sub><sup>-</sup> pro nanotkaniny dopované různými sensitizery.





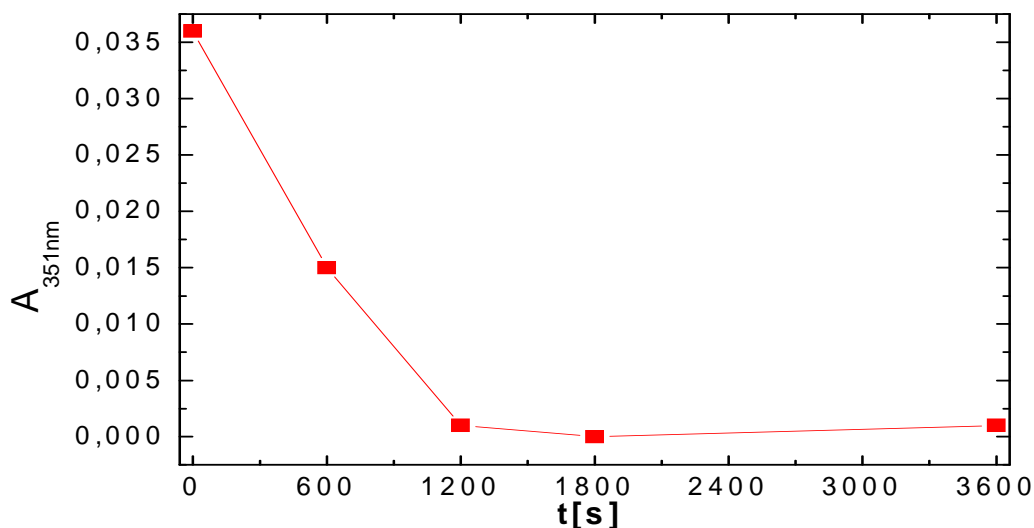
**Obr. 10:** Závislost fotogenerace  $\text{I}_3^-$  na době ozáření bílým světlem; nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnTPP (A), nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnPc (B), nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnPc a 0,1% ZnTPP (C) v jodidovém detekčním činidle; Lineární regrese byla proložena průměrnými hodnotami absorbancí u 6-9 vzorků.

Cílem měření nebylo zjišťovat kvantové výtěžky  $^1\text{O}_2$ , u heterogenních systémů je to z principiálních důvodů velmi obtížné. Experimentálně nesnadné je hlavně zjistit množství absorbovaného světla sensitizérem v nanotkanině. Navíc distribuce sensitizérů v nanovláčkové vrstvě není zcela homogenní a nanotkaniny nemají zcela shodné optické vlastnosti (rozptyl).

Z výsledků vyplývá, že ZnTPP má nižší fotoprodukcí  $\text{I}_3^-$  ( $2,02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) než ZnPc ( $1,65 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) a to při zhruba stejných  $\Phi_{\Delta}$  obou sensitizérů ( $\Phi_{\Delta}(\text{ZnTPP}) = \text{cca } 0,75$  a  $\Phi_{\Delta}(\text{ZnPc}) = \text{cca } 0,7$ ).<sup>26</sup> Tento fakt lze vysvětlit tím, že použitá nanotkanina je transparentnější (tj. méně rozptyluje záření) v červené oblasti světla (viz. absorpční pozadí u obr. 13-16), kde má absorpční pásy ZnPc. Pro přesnější vyhodnocení by bylo potřeba doplnit optické vlastnosti nanotkaniny údaji o emisním spektru použitého bílého světla.

Překvapivou skutečností je fakt, že fotoprodukce  $\text{I}_3^-$  u nanotkaniny se směsí obou sensitizérů (ZnPc a ZnTPP) je takřka stejná jako fotoprodukce  $\text{I}_3^-$  u nanotkaniny se ZnPc. Tento výsledek může být vysvětlen tím, že ozařovaný systém je z hlediska fotoprodukce  $^1\text{O}_2$  v saturaci, jinými slovy, je zde nadbytek excitovaných tripletových stavů sensitizéru k množství přístupujícího kyslíku.

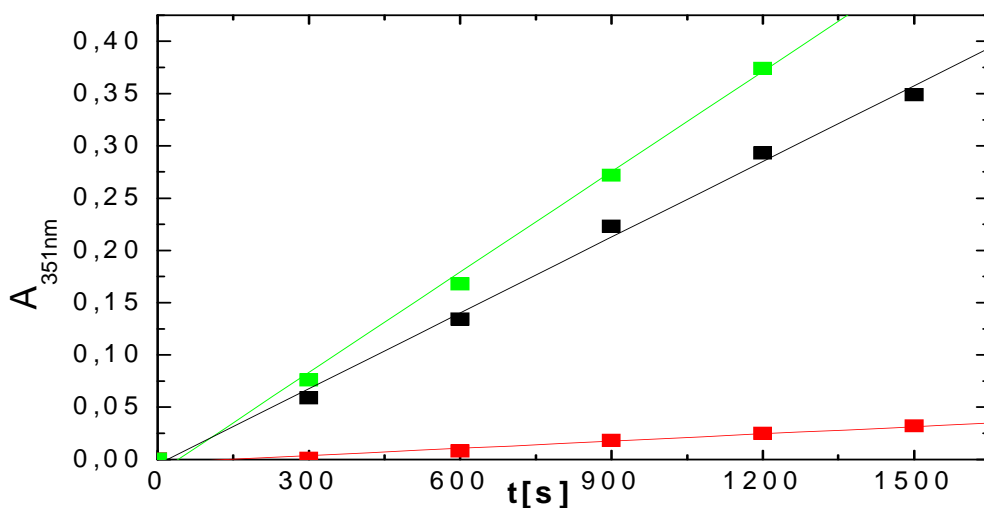
Nanotkaniny ponechané v jodidovém činidle ve tmě po dobu 60 minut nevykazují žádnou produkci  $\text{I}_3^-$  (všechny použité vzorky). Naopak došlo k mírnému poklesu absorbance při 351 nm o cca 0,02 u všech vzorků. Potvrdil se tím předpoklad, že  $\text{I}_3^-$  vzniká na základě fotogenerovaného  $^1\text{O}_2$ . Mírný pokles absorbance je nejspíše způsoben přítomností zbytkového kladného náboje na povrchu nanotkaniny, který vzniká při přípravě nanotkanin. Tento zbytkový náboj má za následek částečnou adsorpci  $\text{I}_3^-$  z roztoku na povrch nanotkaniny. Kinetiku poklesu absorbance  $\text{I}_3^-$  ilustruje obr.11, kde byla použita nanotkanina bez enkapsulovaného sensitizéru. Podobný průběh byl nalezen u nanotkanin dopovaných sensitizérem ponechaných ve tmě.



**Obr. 11:** Kinetika absorpce I<sub>3</sub><sup>-</sup> na PUR nanotkaninu

K dalšímu důkazu, že fotoprodukce I<sub>3</sub><sup>-</sup> je způsobena fotogenerací <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, byla použita diagnostická činidla NaN<sub>3</sub> a D<sub>2</sub>O v jodidovém činidle. Je známo, že NaN<sub>3</sub> působí jako fyzikální zhášec <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, naopak v D<sub>2</sub>O má <sup>1</sup>O<sub>2</sub> cca 16x delší dobu života.<sup>1</sup>

Jak vyplývá z obr.12, směrnice závislosti absorbance I<sub>3</sub><sup>-</sup> na době ozáření je výrazně větší při použití jodidového činidla s 50% obsahem D<sub>2</sub>O (B = 3,2 × 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>) oproti činidlu pouze s H<sub>2</sub>O (2,3 × 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>). Naopak směrnice u činidla s obsahem 0,1M NaN<sub>3</sub> ukazuje nízkou hodnotu a tedy takřka nulovou produkci <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (B = 1,7 × 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>) (obr.12). Tímto bylo potvrzeno, že I<sub>3</sub><sup>-</sup> vzniká fotooxidační reakcí Γ s <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.



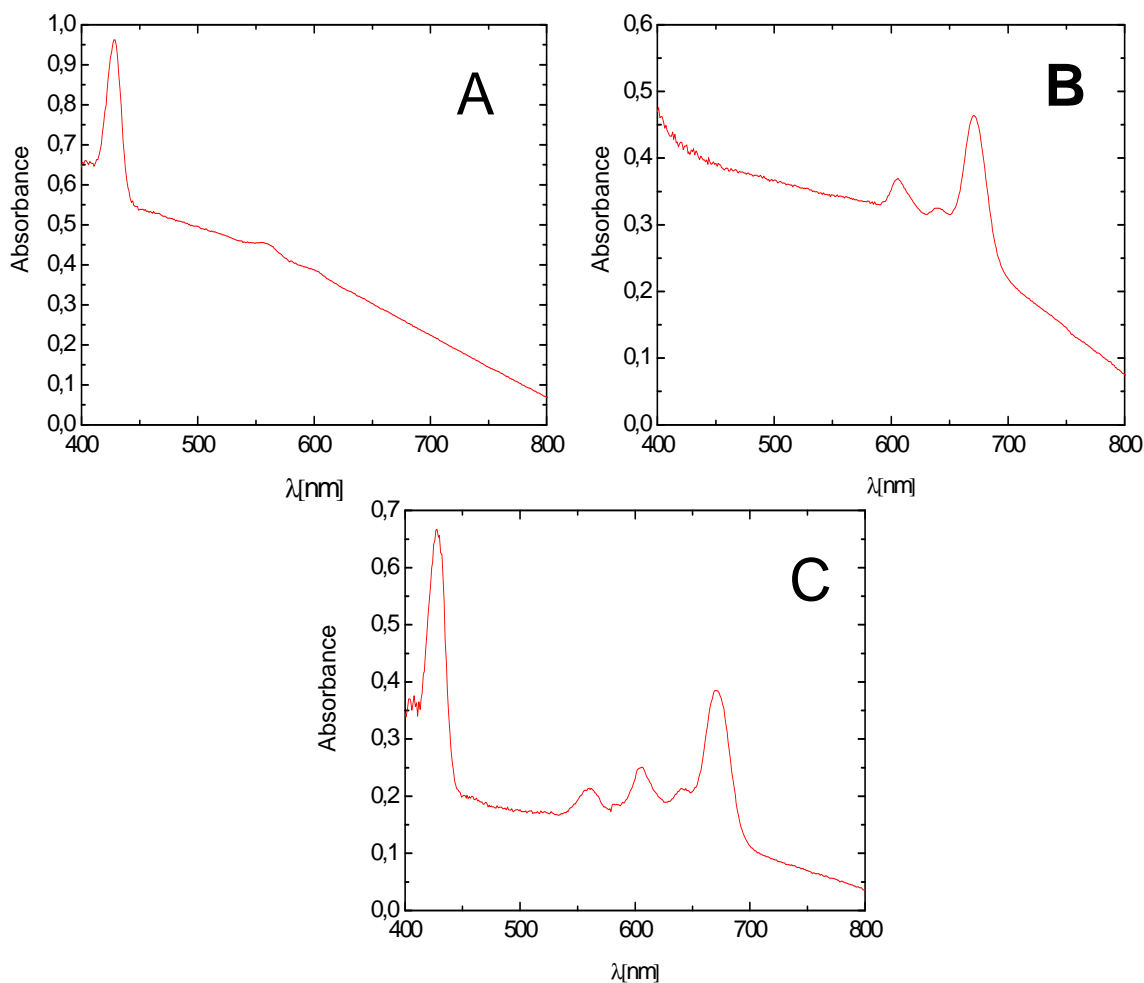
**Obr. 12.** Závislost fotogenerace I<sub>3</sub><sup>-</sup> na době ozáření nanotkaniny s enkapsulovaným 0,1 % ZnPc a 0,1 % ZnTPP; v jodidovém činidle (černá), s 50% D<sub>2</sub>O (zelená) a s 0,1 M NaN<sub>3</sub> (červená)

Dalším testem, který měl potvrdit, že fotogenerovaný  $I_3^-$  závisí na kyslíku, bylo ozařování nanotkaniny v jodidovém činidle bez přístupu kyslíku. Po 30 minutách probublávání jodidového činidla  $N_2$  (k odstranění  $O_2$ ) a po následném 60-ti minutovém ozáření jod. činidla s ponořenou nanotkaninou nebyl pozorován žádný nárůst absorpce  $I_3^-$ . Naopak absorpce se nepatrně snížila vlivem již zmíněného náboje na povrchu nanotkaniny. Je zřejmé, že v nepřítomnosti  $O_2$  nedochází ke vzniku  $^1O_2$  a proto ani  $I_3^-$ .

### 4.3. FOTODEGRADACE SENSITIZERŮ V PUR NANOTKANINĚ

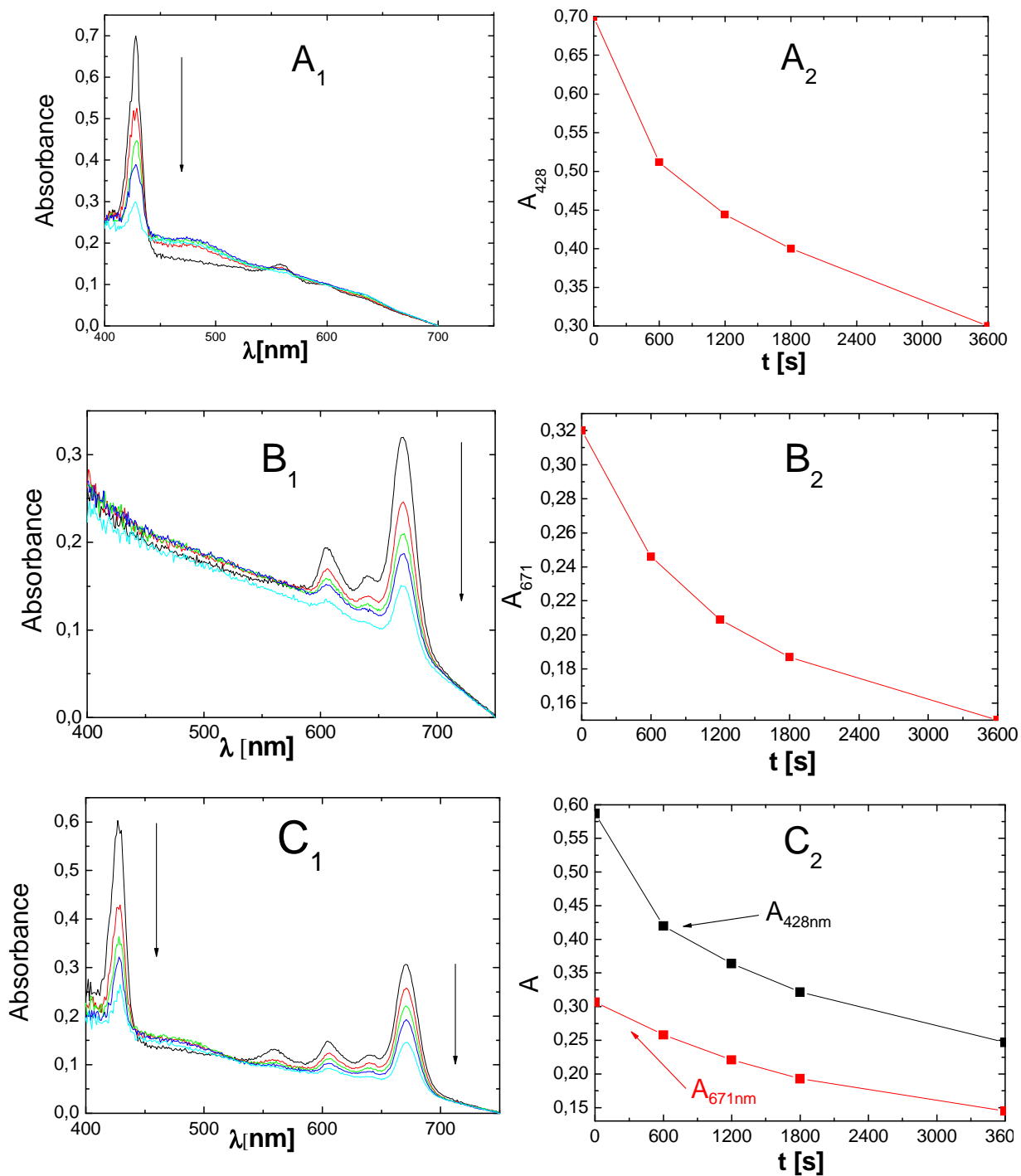
Dalším cílem této práce bylo zjištění, zda u sensitizerů enkapsulovaných v nanotkanině dochází k výraznější fotodegradaci během ozařovacích experimentů. Z literatury je známo, že sensitizery se snadno fotodegradují, ale rychlost této fotodegradace lze jen těžko odhadnout. Porfyrinoidy se snadno fotooxidují po inzerci  $Zn^{2+}$ , kdy dochází ke zvýšení standardního elektronového potenciálu.<sup>27</sup>

Testovány byly všechny použité nanotkaniny s enkapsulovaným sensitizerem (se ZnTPP, ZnPc a se směsí ZnTPP a ZnPc). Průsvitnost nanotkanin umožnila měření absorpčních spekter enkapsulovaných sensitizerů v nanotkaninách metodou „na průchod“ (viz. kap. 3.2.5). Obr. 13 ukazuje absorpční spektra použitých PUR nanotkanin s enkapsulovanými sensitizery. Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnPc obsahuje výrazný absorpční pás při  $\lambda = 671$  nm a méně intenzivní absorpční pásy při  $\lambda = 606$  nm a 640 nm. Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnTPP obsahuje Soretův pás při  $\lambda = 428$  nm a dva Q-pásy při  $\lambda = 558$  nm a 599 nm. Nanotkanina PUR Larithane s 0,1% ZnPc a 0,1% ZnTPP obsahuje kombinaci výše uvedených pásů, tj. při  $\lambda = 428$  nm (ZnTPP) a  $\lambda = 671$  nm (ZnPc) a při  $\lambda = 558$  nm a 599 nm (ZnTPP) a  $\lambda = 606$  nm a 640 nm (ZnPc) (obr.13).



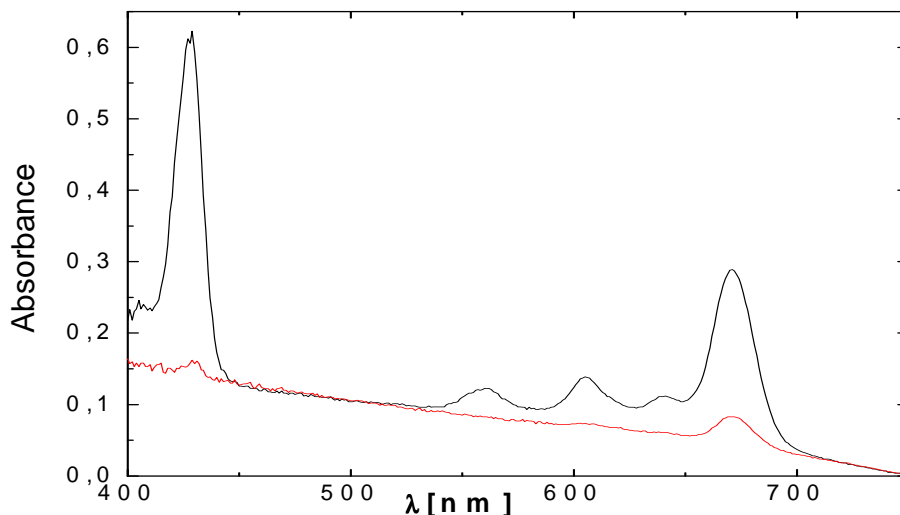
**Obr. 13:** Absorpční spektra PUR nanotkanin s enkapsulovanými senzitizery; s 0,1 % ZnTPP (A), s 0,1 % ZnPc (B), s 0,1 % ZnTPP a 0,1 % ZnPc (C)

Na základě fotodegradčních studií, kdy byly nanotkaniny ozařovány bílým světlem (viz. kap. 3.2.5.), bylo zjištěno, že oba enkapsulované senzitizer poměrně rychle fotodegradují (obr.14). Z odečtených poločasů fotodegradace (tj. doba, za kterou absorbance klesne na polovinu výchozí hodnoty) vyplývá, že fotodegradace nezávisí na tom, zda se v nanotkanině nachází sensitizer sám nebo ve směsi. ZnPc fotodegraduje pomaleji (poločas degradace  $t_{1/2deg}(\text{ZnPc}) = 53$  min), ZnTPP rychleji (poločas degradace  $t_{1/2deg}(\text{ZnTPP}) = 45$  min).



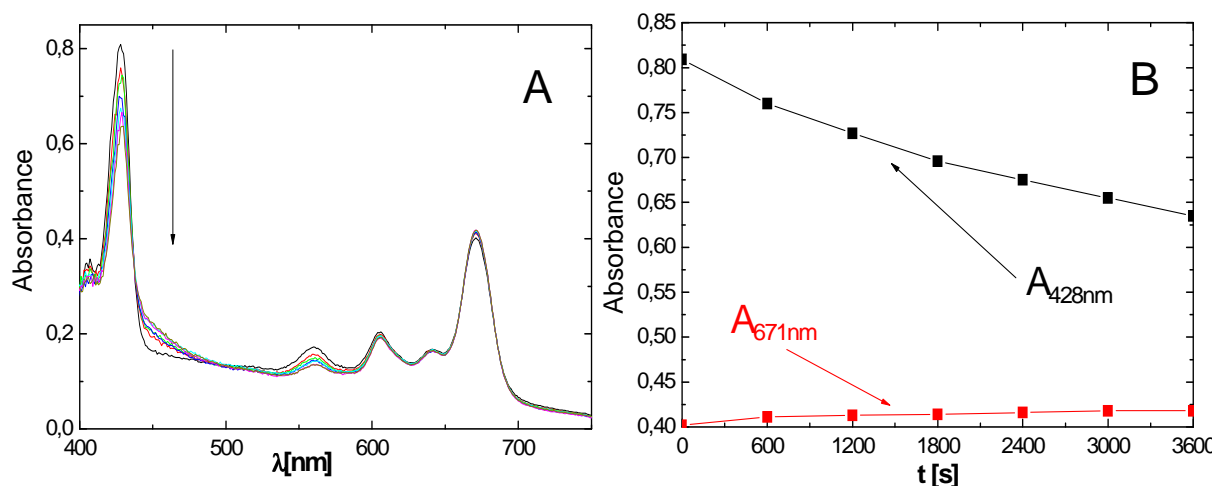
**Obr. 14:** Absorpční spektra  $A_1 - C_1$  a kinetika fotodegradace  $A_2 - C_2$  u nanotkanin s enkapsulovaným sensitizerem; PUR Larithane se ZnTPP ( $A_1$  resp.  $A_2$ ), PUR Larithane se ZnPc ( $B_1$  resp.  $B_2$ ), PUR Larithane se Zn-Pc a ZnTPP ( $C_1$  resp.  $C_2$ ); svislé šipky značí časový průběh degradace

Stejný fotodegradační účinek byl zjištěn i při použití jiného světelného zdroje, studeného světla 150 W lampy Krüss (obr. 15). Z toho plyne, že se jedná o světlem indukovanou degradaci fotosensitizerů a ne o možnou termickou degradaci vyvolanou nechlazeným světlem.



**Obr. 15:** Fotodegradace sensitizerů ZnPc a ZnTPP v PUR nanotkanině ozařované studeným světlem 150 W lampy Krüss; absorpční spektrum nanotkaniny před (červená) a po 30 min. ozáření (černá)

Ve snaze zjistit mechanismus fotodegradace byly nanotkaniny ozařovány též v nepřítomnosti kyslíku, v atmosféře  $N_2$ . Při ozařování nanotkanin v atmosféře  $N_2$  nedocházelo k fotodegradaci ZnPc, ale ZnTPP fotodegradoval (obr.16). Degradace ZnTPP je pomalejší než na vzduchu, ale existuje. ZnTPP se tedy na rozdíl od ZnPc degraduje jak vzniklým  $^1O_2$  (rychleji), tak bez přítomnosti  $^1O_2$  (pomaleji, s poločasem  $t_{1/2deg}(ZnTPP) \gg 60$  min).



**obr. 16:** Fotodegradace sensitizérů ZnPc a ZnTPP v PUR nanotkanině;  $\text{N}_2$  atmosféra; absorpční spektrum nanotkaniny s enkapsulovanými sensitizery v průběhu ozařování (A), kinetika poklesu absorpčních pásů ZnTPP (při 428 nm) a ZnPc (671 nm) (B); svislá šipka značí směr degradace

Fotodegradační experimenty byly prováděny i v prostředí deionizované vody s podobným výsledkem jako v případě ozařování na vzduchu.

Jak vyplývá z fotodegradačních studií, oba sensitizery jsou za daných experimentálních podmínek relativně rychle fotodegradovány. U ZnPc je zjevné, že fotodegradace je způsobena atakem  $^1\text{O}_2$ , jak vyplývá z ozařovacích pokusů na vzduchu a pod atmosférou  $\text{N}_2$ . U ZnTPP je pravděpodobné, že dochází ke kombinaci efektů - v přítomnosti  $\text{O}_2$  dochází k peroxidaci sensitizery singletovým kyslíkem, nalezená fotodegradace v nepřítomnosti  $\text{O}_2$  je patrně způsobená elektronovým přenosem mezi ZnTPP a polymerem nanotkaniny.



## 5. ZÁVĚR

Na základě této práce bylo zjištěno následující:

- 1) Byl nalezen silný fotocytotoxický účinek porfyrinoidního sensitizery ZnTPPS<sub>4</sub> působící na bakterie *Escherichia coli*.
- 2) Dva odlišné porfyrinoidní sensitizery (ZnTPP a ZnPc) se povedlo úspěšně enkapsulovat do PUR nanotkaniny; tyto sensitizery se nevytluhují do vodného prostředí a zůstávají v nanotkanině.
- 3) Ozařovaná PUR nanotkanina s enkapsulovanými sensitizery (ZnPc, ZnTPP a směsí ZnPc a ZnTPP) vykazuje fotooxidaci anorganického I<sup>-</sup> substrátu. Nanotkanina obsahující směs ZnPc a ZnTPP má při ozáření bílým světlem za daných experimentálních podmínek zhruba stejnou fotoprodukcí <sup>1</sup>O<sub>2</sub> jako nanotkanina obsahující ZnPc, fotoprodukce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> u nanotkaniny se ZnTPP je výrazně nižší.

Experimenty ve tmě, v atmosféře N<sub>2</sub> a v detekčních činidlech z D<sub>2</sub>O a NaN<sub>3</sub> potvrdily předpoklad, že I<sup>-</sup> je oxidován pomocí <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, který je produkován sensitizery v nanotkaninách.

- 4) Sensitizery enkapsulované v PUR nanotkanině jsou nečekaně rychle fotodegradovány světlem. U ZnPc je příčinou peroxidace <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, u ZnTPP se vedle tohoto mechanismu patrně uplatňuje ještě fotodegradace nezávislá na O<sub>2</sub>, která je patrně způsobená interakcí ZnTPP s materiálem nanotkaniny mechanismem přenosu elektronu.
- 5) Nejzajímavějším výsledkem práce je fakt, že nanotkaniny se dvěma enkapsulovanými sensitizery (ZnPc a ZnTPP) mají zhruba stejnou fotoprodukcí <sup>1</sup>O<sub>2</sub> jako nanotkaniny pouze se ZnPc a rychlá fotodegradace během ozařování neovlivní lineární nárůst produkce I<sub>3</sub><sup>-</sup> v prvních 10 minutách ozařování. Tyto výsledky lze interpretovat tak, že excitované tripletové stavy sensitizerů jsou řádově ve vyšších koncentracích oproti přístupujícímu O<sub>2</sub>.

## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

- (1) Lang K.; Mosinger J.; Wagnerová D.M.: Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické Listy* **99**, 211-221 (2005).
- (2) Wagnerová D.M.: Classification of dioxygen reactions: A unifying view. *Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics* **215**, 133-138 (2001)
- (3) Khan A. U.; Kasha M.: Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *Journal of Chemical Physics* **39**, 2105 (1963)
- (4) Foote C. S.; Wexler S.; Ando W.; Higgins R.: Chemistry of singlet oxygen .4. oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 975-& (1968)
- (5) Tarr M.;Valenzeno D.P.: Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2**, 355-361 (2003)
- (6) Kubát P.: Využití časově rozlišené spektroskopie ke studiu fotosensitizovaných reakcí. *Chemické listy* **90**, 515-522 (1996)
- (7) De Rosa M. C.; Crutchley R. J.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **233-234**, 351-371 (2002)
- (8) Mosinger J.; Habilitační práce. Praha 2007
- (9) Foote C. S.; Clennan E. L.: *Aktive Oxygen in Chemistry*, Vol. 2, Blackie Academic & Professional, London 1995
- (10) Lang K.; Mosinger J.; Wagnerová D.M.: Singletový kyslík v praxi; současnost a perspektiva. *Chemické Listy* **100**, 169-177 (2006)
- (11) MacDonald I. J.; Dougherty T. J.: Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **5**, 105-129 (2001)
- (12) Maiti N. C.; Mazumdar S.; Periasamz N.: J- and H-aggregates of porphyrin-surfactant complexes: Time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B.* **102**, 1528-1538 (1998)
- (13) Mosinger J.; Demié M.; Lang K.; Kubát P.; Wagnerová D. M.: Supramolecular sensitizer: complexation of *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin with 2-hydroxypropyl-cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* **130**, 13-20 (2000)

- 
- (14) Ghiggino K. P.; Bennett L. E.; Henderson R. W.: Photochemical properties of porphyrin - C - an agent for use in tumor phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **47**, 65-72 (1990)
- (15) Halma M.; Bail A.; Wypych F.; Nakagaki S.: Catalytic activity of anionic iron (III) porphyrins immobilized on grafted disordered silica obtained from acid leached chrysotile. *Journal of Molecular Catalysis A-chemical* **243**, 44-51 (2006)
- (16) Majumder S.; Prairie M.; Ondrias M.; Shelnett J.: Photocatalytic degradation of salicylic-acid by porphyrins adsorbed onto Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> using visible-light. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **203**, 45-Phyp (1992)
- (17) Mosinger J.; Jirsák O.; Kubát P.; Lang K.; Mosinger B. Jr.: Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen. *Journal of Materials Chemistry* **17**, 164- 166 (2007)
- (18) Ma Z. V.; Kotaki M.; Ramakrishna S.: Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane. *Journal of Membrane Science* **272**, 179-187 (2006)
- (19) Bergshoef M. M.; Vansco G. J.: Transparent Nanocomposites with Ultrathin, Electrospun Nylon-4,6 Fiber Reinforcement. *Advanced Materials* **11**, 1362-1365 (1999)
- (20) Schreuder-Gibson H.; Gibbon P.; Senecal K.; Sennet M.; Walker J.; Yeomans W.; Ziegler D.; Tsai P. P.: Protective textile materials based on electrospun nanofibers. *J. Advanced Materials* **34**, 44-55 (2002)
- (21) Firma Elmarco-Technologie electrospinningu.  
Dostupné z URL: <http://www.elmarco.com/obsah.php?id=27&s=25>  
[cit. 16.4.2008]
- (22) Kubát P.; Mosinger J.: Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **96**, 93-97 (1996)
- (23) Sambrook J.; Russell D. W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. The Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- (24) Mosinger J.; Mosinger B.: Photodynamic sensitizers assay – rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* **51**, 106-109 (1995)

- 
- (25) Pokročilé praktikum z analytické chemie. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, 2004. Dostupné na URL: <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/praktika.html> [cit. 14.4.2008]
- (26) Wilkinson F.; Helman W.; Ross A.: Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecularoxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **22**, 113-262 (1993)
- (27) Ferreira, J.; Menezes, P. F. C.; Kurachi, C.; Sibata, C.; Allison, R. R.; Bagnato, V. S.: Photostability of different photosensitisers. *Laser Physics Letters* **5**, 156-161 (2008)