

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Anorganická chemie



Mgr. Petr Henke

Fotoaktivní polystyrenové nanomateriály produkující singletový kyslík
Polystyrene photoactive nanomaterials producing singlet oxygen

Typ závěrečné práce

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 07.03.2017

Podpis

Poděkování

V první řadě bych velice rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady nejen při přípravě této disertační práce, ale i během celého mého doktorského studia a také za velmi přátelský přístup.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Pavlu Kubátovi, CSc., doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc., Mgr. Martinu Fraiberkovi, Mgr. Lukáši Plíštilovi a dalším spoluautorům za spolupráci při tvorbě našich publikací. Dále bych rád poděkoval celému kolektivu katedry anorganické chemie nejen za pomoc, ale také za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své rodině a přátelům za veškerou podporu v celém průběhu mého studia.

Děkuji také grantovým agenturám za finanční podporu: GAČR 16-15020S, GAČR 13-12496S, a MSM 0021620857.

ABSTRAKT

Rostoucí výskyt multirezistentních kmenů bakterií způsobuje poptávku po alternativách k antibiotické léčbě a obecněji po antimikrobiálních materiálech jako součásti prevence. V popředí zájmu je fotodynamická inaktivace bakterií a dalších patogenů způsobená fotogenerovaným singletovým kyslíkem.

Tato práce je zaměřena na oblast fotoaktivních polymerních nanovláknenných membrán a nanočástic, generujících singletový kyslík vhodných pro aplikace v medicíně.

Byly připraveny různé typy modifikovaných fotoaktivních polystyrenových nanovláknenných membrán s enkapsulovaným nebo externě vázaným porfyrinovými fotosensitizery. Tyto materiály efektivně produkují vysoce reaktivní, cytotoxický singletový kyslík, schopný omezené difúze do vnějšího prostředí. Výsledky našeho výzkumu demonstrují zásadní roli smáčivosti tohoto typu materiálů s krátkou difuzní dráhou vznikajícího singletového kyslíku, objasňují vliv teploty a poukazují na jejich možné využití jakožto multifunkčních materiálů. Díky jejich antimikrobiálním vlastnostem jsou tyto materiály vhodnou alternativou k lokálnímu využití antibiotik a antiseptik. Díky dobré prodyšnosti a krátké difuzní dráze singletového kyslíku se dají očekávat dobré výsledky v *in vivo* testech.

Z těchto nanovláknenných materiálů byly také připraveny fotoaktivní, extrémně stabilní polystyrenové nanočástice s enkapsulovanými fotosensitizery, které jsou efektivnější pro sterilizaci nebo oxidaci většího objemu vodných roztoků. Představena byla i metoda využívající připravené nanočástice k citlivé detekci kyslíku ve vodných roztocích. Nanovláknenné membrány mohou sloužit nejen jako výchozí materiál pro přípravu nanočástic, ale i jako filtr pro jejich odstranění z roztoku.

ABSTRACT

The increasing number of multidrug-resistant strains of bacteria call for alternatives to antibiotic therapy and, more generally, for the antimicrobial material as a component of prevention. Of particular interest is the photodynamic inactivation of bacteria and other pathogens caused by photogenerated singlet oxygen.

This work is focused on the field of photoactive polymer nanofiber membranes and nanoparticles, generating singlet oxygen, suitable for medical applications.

We prepared different types of photoactive modified polystyrene nanofiber membranes with encapsulated or externally bound porphyrin photosensitizers. These materials efficiently produce highly reactive and cytotoxic singlet oxygen capable of restricted diffusion into to the external environment.

Our results demonstrate the crucial role of wettability for materials of this type with a short diffusion length of generated singlet oxygen, illustrate the effect of temperature and indicate their potential use as multifunctional materials. Due to their antimicrobial properties, these materials are suitable alternative to antibiotics and local antiseptics. With good breathability and short diffusion length of singlet oxygen good results can be expect in *in vivo* tests.

From these nanofiber materials we also prepared photoactive extremely stable polystyrene nanoparticles with encapsulated photosensitizers that are effective for sterilizing/oxidation of a larger volume of aqueous solutions. We also presented method which is using nanoparticles for sensitive detection of oxygen in aqueous solution. The nanofiber material can be applied not only as source of nanoparticles but also as an effective filter for their removal from solution.

OBSAH:

1	Úvod/Motivace	8
2	Teoretická část	9
2.1	Singletový kyslík	9
2.1.1	Generace $O_2(^1\Delta_g)$	11
2.1.1.1	Fotosensitizovaná reakce	12
2.1.1.2	Fotosensitizery	15
2.1.2	Reakce $O_2(^1\Delta_g)$	16
2.1.3	Metody detekce a stanovení $O_2(^1\Delta_g)$	17
2.2	Aplikace $O_2(^1\Delta_g)$	20
2.2.1	Fotodynamická terapie (PDT)	21
2.2.2	Fotodynamická Inaktivace (PDI)	22
2.2.1	Fotosensitizery na/v pevných nosičích	23
2.2.2	Nanovláknenné membrány dopované fotosensitizery	24
3	Cíle práce	27
4	Komentáře k pracím	27
4.1	Polystyrenové nanovláknenné materiály s externě vázaným fotosensitizerem	28
4.2	Vliv smáčivosti nanovláknenných materiálů s enkapsulovaným fotosensitizerem na antibakteriální efekt	31
4.3	Vliv teploty na fotofyzikální a antibakteriální vlastnosti nanovláknenných materiálů	35
4.4	Polymerní nanočástice s enkapsulovaným fotosensitizerem připravené z nanovláknenných materiálů	37
5	Souhrnná diskuze	41
6	Závěry	45
7	Podíl předkladatele na publikacích zahrnutých v disertační práci	48
8	Seznam zkratek	50

9	Přehled publikací předkladatele.....	52
9.1	Zahrnuté Publikace	52
9.2	Ostatní publikace	52
10	Přílohy	53
10.1	Publikace I.....	53
10.2	Publikace II	71
10.3	Publikace III	88
10.4	Publikace IV	103
11	Seznam použité literatury	122

1 ÚVOD/MOTIVACE

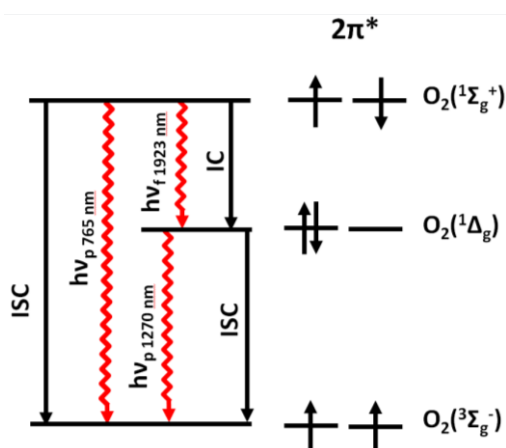
Aplikací antibiotik v posledních dekáдах došlo k významnému poklesu počtu úmrtí následkem mikrobiálních, především bakteriálních infekcí. Jejich nadužívání nejen v medicíně, ale také v zemědělství však způsobuje kontaminaci životního prostředí těmito látkami. To vede společně s nesprávně provedenou medikací ke vzniku bakteriální rezistence. Podle analýzy amerického Centra pro kontrolu a prevenci chorob (CDC)¹ zemřou na infekce rezistentními kmeny bakterií desítky tisíc pacientů ročně a další desítky tisíc na infekce (např. bakteriálními kmeny *Clostridium difficile*) spojené s vymizením přirozené mikroflóry po antibiotické léčbě. Zvýšená rezistence bakteriálních původců je také společným znakem nozokomiálních nákaz, tedy infekcí vzniklých v příčinné souvislosti s hospitalizací pacienta.² V odborné literatuře jsou popsány případy úmrtí na bakterie rezistentní proti všem dostupným antibiotikům.³ To ukazuje na důležitost a poptávku po antibakteriálních materiálech založených na jiných mechanismech než klasická antibiotika.

Zajímavou alternativou mohou být materiály inaktivující bakterie ale i další patogeny prostřednictvím fotogenerovaného singletového kyslíku, vůči kterému např. bakterie nevykazují žádnou rezistenci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 SINGLETOVÝ KYSLÍK

Singletový kyslík patří mezi reaktivní kyslíkové částice („Reactive Oxygen Species“ ROS). Ty zahrnují kyslíkové částice vzniklé neúplnou redukcí molekulárního kyslíku jako jsou superoxidový anion radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a další reaktivní formy nebo sloučeniny kyslíku jako je ozon (O_3), singletový kyslík (1O_2), hydroperoxid (OOH^{\cdot}), alkoxyly (RO^{\cdot}), peroxyly (ROO^{\cdot}), a další sloučeniny jako třeba kyselina chlornou ($HClO$).⁴ Studium ROS a její komplexní problematiky se zabývá celá řada přehledových článků.^{5,6} Singletový kyslík není na rozdíl od většiny ROS radikál ani nenesé žádný náboj.



Obr. 1. Elektronová konfigurace, přechody mezi základním a excitovanými stavy molekuly kyslíku (ISC – mezisystémový přechod, IC – vnitřní konverze, $h\nu_p$ – fosforescence, $h\nu_f$ – fluorescence)

Molekulární kyslík v základním stavu má tripletovou multiplicitu $O_2(^3\Sigma_g^-)$, v nejvyšších antivazebných orbitalech $2\pi^*$ má dva nepárové elektrony s paralelními spiny. Většina látek (organické sloučeniny, anorganické anionty, plyny, sloučeniny hlavních podskupin a nepřechodné kovy) má v základním stavu spárované elektrony, a tedy singletovou multiplicitu. Jejich reakce s kyslíkem v základním stavu jsou spinově zakázané podle pravidla o zachování spinu a probíhají neochotně, s vysokou aktivační energií. Tato kyslíková anomálie má klíčový význam pro existenci života na zemi - zabraňuje zoxidování organické hmoty.⁷

Oproti tomu reakce singletového kyslíku jsou spinově dovolené. Singletový kyslík může nabývat dvou energetických stavů $O_2(^1\Sigma_g^+)$ a $O_2(^1\Delta_g)$ (Obr. 1). Pokud má molekula kyslíku dva elektrony v jednotlivých $2\pi^*$ orbitalech nespárovány, označujeme tento singletový excitovaný stav $O_2(^1\Sigma_g^+)$, oproti tomu singletový stav $O_2(^1\Delta_g)$ má v $2\pi^*$ orbitalu dva elektrony s opačnými spiny.

Singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$ je nejnižší excitovaný stav molekulárního kyslíku s rozdílem energií 94,3 kJ/mol (odpovídající 1269 nm), excitovaný stav $O_2(^1\Sigma_g^+)$ je energeticky bohatší o dalších 62,7 kJ/mol (respektive o 157 kJ/mol více než $O_2(^1\Sigma_g^+)$ odpovídající fosforescenci při 765 nm).⁸ Doby života $O_2(^1\Sigma_g^+)$ v plynné fázi jsou cca $10\times$ nižší než u $O_2(^1\Delta_g)$ z důvodu dovoleného zářivého přechodu (odpovídající fluorescenci při 1923 nm) z $O_2(^1\Sigma_g^+)$ na $O_2(^1\Delta_g)$ ($\tau = 6,7$ min respektive 64,6 min).⁸ V roztocích se vlivem rozpouštědla (perturbace) zvýší pravděpodobnost zářivých i nezářivých přechodů do nižších energetických stavů. Důsledkem jsou krátké doby života $O_2(^1\Sigma_g^+)$ především ve vodě ($\tau = 8$ ps)⁸, u tohoto stavu se proto nepředpokládá účast na oxidačních procesech. Z těchto důvodů je v této práci uvažován jen $O_2(^1\Delta_g)$.

Kromě chemických reakcí může být $O_2(^1\Delta_g)$ deaktivován třemi nezářivými procesy. Elektronovým přenosem energie („Electronic Energy-Transfer“ EET) na jinou molekulu (např. karotenoidy mohou akceptovat energii $O_2(^1\Delta_g)$ a vnitřní konverzí přejít do svého tripletového stavu^{9,10}), zhášením pomocí přenosu náboje („Charge Transfer“, CT),¹¹ nebo přenosem energie z $O_2(^1\Delta_g)$ do vibračních modů jiné molekuly, nejčastěji rozpouštědla.¹² Častá je kombinace více procesů, například kuban zháší $O_2(^1\Delta_g)$ jednak přenosem energie do C-H vibračních modů a zároveň může formovat CT komplex.¹¹ Přenos energie do vibračních modů rozpouštědla je v roztocích nejčastějším mechanismem fyzikální deaktivace. Přenos je tím rychlejší, čím blíže jsou energie vibračních modů rozpouštědla k energii $O_2(^1\Delta_g)$.¹³

Singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$ může být deaktivován zářivým přechodem do základního stavu. Toho se využívá pro přímou spektroskopickou detekci sledováním kinetiky fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$ při $\lambda = 1270$ nm. Vliv rozpouštědla na deaktivaci $O_2(^1\Delta_g)$ zářivým přechodem je intenzivně zkoumán a představuje komplexní problém, který závisí na mnoha parametrech.¹² Například efekt rozpouštědla na deaktivaci zářivým přechodem roste s jeho polarizovatelností, což se snaží vysvětlit několik existujících modelů interakce $O_2(^1\Delta_g)$ s rozpouštědlem.^{14,15} Některé modely předpokládají interakci $O_2(^1\Delta_g)$ s jinou molekulou a vznik přechodného bimolekulárního komplexu, jiné modely předpokládají mezi molekulami

rozpouštědla vznik kavit, ve kterých je $O_2(^1\Delta_g)$ obklopen. Tyto modely lépe odpovídají experimentálním datům.^{16,17}

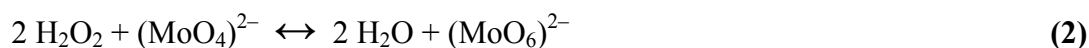
Shrnutí dob života $O_2(^1\Delta_g)$ v jednotlivých rozpouštědlech je v Tab. 1, která ukazuje doby života $O_2(^1\Delta_g)$ pohybují od několika nanosekund po několik mikrosekund.¹⁸

Tab. 1. Doby života $O_2(^1\Delta_g)$ v různých rozpouštědlech¹⁸

Rozpouštědlo	$\tau\Delta$ (μ s)	Rozpouštědlo	$\tau\Delta$ (μ s)
H ₂ O	3,3 ± 0,5	(CH ₃) ₂ CO	50,5 ± 4
CH ₃ OH	9,9 ± 0,5	D ₂ O	66 ± 2
CH ₃ CH ₂ OH	15,5 ± 3,5	CH ₃ CN	66,7 ± 13,5
cyklohexan	21 ± 4	CH ₂ Cl ₂	101 ± 39
THF	23 ± 2,6	CHCl ₃	235 ± 30
DMSO	24,6 ± 5,4	CD ₃ OD	240 ± 10
toluen	27 ± 2	CDCl ₃	650 ± 150
pentan	29 ± 6	(CD ₃) ₂ CO	750 ± 80
hexan	30 ± 1	C ₆ F ₆	12000 ± 8000
benzen	32 ± 3,3	CS ₂	37000 ± 8000
pyridin	37 ± 20	CCl ₄	73000 ± 14 000

2.1.1 GENERACE $O_2(^1\Delta_g)$

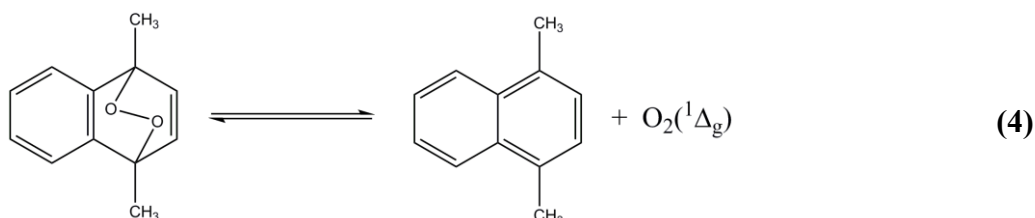
V literatuře existuje celá řada popsaných metod generace $O_2(^1\Delta_g)$ na základě chemické reakce. Mezi nejčastěji používané chemické metody přípravy $O_2(^1\Delta_g)$ patří např. reakce chlornanu¹⁹ (rov. 1) nebo molybdenanu²⁰ (rov. 2 a 3) s peroxidem vodíku:



Podobně probíhají i reakce využívající rozkladu peroxowolframanu nebo peroxochromanu.²¹

Dalšími metodami generace $O_2(^1\Delta_g)$ jsou např. reakce ozonu a ozonidů s anorganickými solemi²² nebo dismutace superoxidu na kyslík a peroxid²³.

Oblíbenou metodou je využití tepelného rozkladu $\text{CaO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_2$ dispergovaného v organické fázi²⁴, nebo některého, většinou aromatického, endoperoxidu. Některé prekurzory aromatických endoperoxidů se dají využít k „uchování“ a jako tzv. sekundární zdroje $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.²⁵ Na základě reverzibilní reakce s $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ při nízké teplotě se tvoří příslušný endoperoxid, který se za vyšší teploty rozkládá zpět na původní molekulu a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Příkladem může být 1,4-dimethylnaftalen, který se termicky rozkládá již při 20°C (rov. 4).²⁶



K přípravě $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ lze využít i fyzikální procesy např. mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře²⁷ nebo fotolýzu ozonu.²⁸ V biologických systémech je $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ vytvářen tzv. „temnými“ reakcemi, které jsou katalyzovány peroxidázami nebo oxygenázami.²⁹

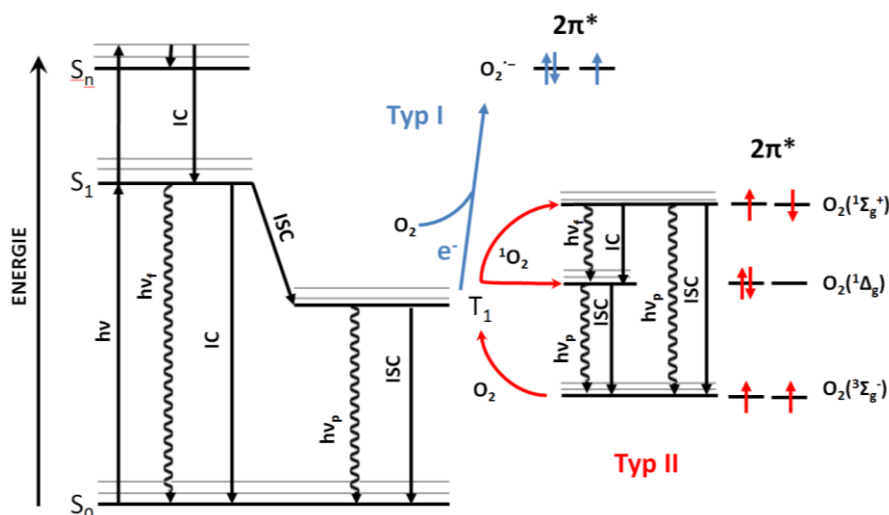
Nejčastěji používanou metodou generace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ je fotosensitizovaná reakce, která byla použita i v této práci.¹² Jak vyplývá z Grotthusova-Draperova teorému (chemickou změnu systému vyvolá pouze světelné kvantum jím absorbované), může být molekula kyslíku excitována přímo UV-VIS zářením jen velmi obtížně, protože má v této oblasti absorpci zanedbatelnou. Proto se používá excitace nepřímé, prostřednictvím tzv. fotosensitizeru.

2.1.1.1 FOTOSENSITIZOVANÁ REAKCE

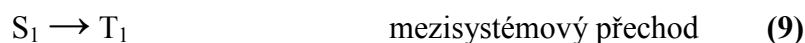
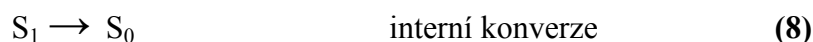
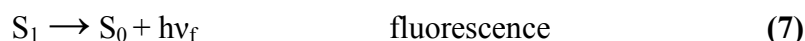
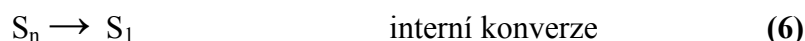
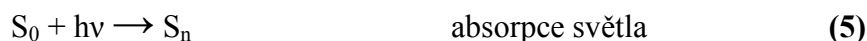
Fotosensitizované reakce jsou klasifikovány do dvou typů: typ I a typ II. Toto označení vzniklo předtím, než byl objasněn mechanismus těchto reakcí a prodělalo vývoj, který nedávno shrnul Krasnovsky.³⁰ Typ I se obecně vztahuje k přenosu elektronu z fotosensitizeru na jinou molekulu (v případě $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ vzniká $\text{O}_2^{\cdot-}$), oproti tomu typ II odkazuje na aktivaci kyslíku přenosem energie za vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Během fotosensitizované reakce je světelná energie absorbována tzv. fotosensitizerem (obvykle organické barvivo), který přejde ze základního singletového stavu S_0 do vyšších excitovaných singletových stavů S_n . Ty rychle přecházejí na nejnižší excitovaný singletový stav S_1 . Ten se může spontánně deaktivovat vyzářením energie ve formě fluorescence ($h\nu_f$) nebo vnitřní konverzí („Internal Conversion“ IC) přeměnit přebytečnou energii na teplo a vrátit se tak do S_0 stavu v řádu několika nanosekund.³¹ Dalším deaktivacním procesem je

mezisystémový přechod („InterSystem Crossing“ ISC) do tripletového stavu (T_1) s relativně dlouhou dobou života (v řádu μs)³¹ z důvodu spinově zakázaného přechodu do S_0 . Případný zářivý přechod do S_0 se projevuje jako fosforescence ($h\nu_p$), nicméně hlavní deaktivální cestou T_1 stavu je přenos energie na $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ za vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (fotosensitizovaná reakce typu II; Obr 2 a rov. 5-13).³²



Obr. 2. Modifikovaný Jablonského diagram zobrazující mechanismus fotosensitizované reakce typu I a II. S_0 je fotosensitizer v základním stavu, $h\nu$ je absorbované světelné kvantum, S_1 a S_n jsou excitované singletové stavy fotosensitizeru, T_1 je tripletový stav fotosensitizeru, ISC je mezisystémový přechod, IC je vnitřní konverze, $h\nu_p$ je fosforescence, $h\nu_f$ je fluorescence.



Nejčastějším mechanismem vzniku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ je tedy zhášení relativně déle žijících T_1 stavů fotosensitizeru. Fotosensitizer v excitovaném T_1 stavu a $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ tvoří přechodný

komplex („encounter complex“), jehož energie musí být vyšší než energie vzniklých produktů ($O_2(^1\Delta_g)$ je o 94 KJ/mol bohatší než $O_2(^3\Sigma_g^-)$). Následně se komplex během IC rozpadá za současné tvorby $O_2(^1\Delta_g)$. Přebytečná energie komplexu je rozptýlena do okolí v podobě tepla.³³ U fotosensitizeru s nízkým oxidačním potenciálem může dojít i ke stabilizaci vzniklého komplexu přenosem náboje na kyslík (CT), což redukuje přebytečnou energii a vede k rychlejšímu zhášení za vzniku $O_2^{\cdot-}$ (typ I).³⁴ Tento radikál pak může dále např. ve vodných roztocích podléhat protonizaci na OOH^{\cdot} a následně disproporcionaci za vzniku H_2O_2 (rov 14 a 15).³⁵



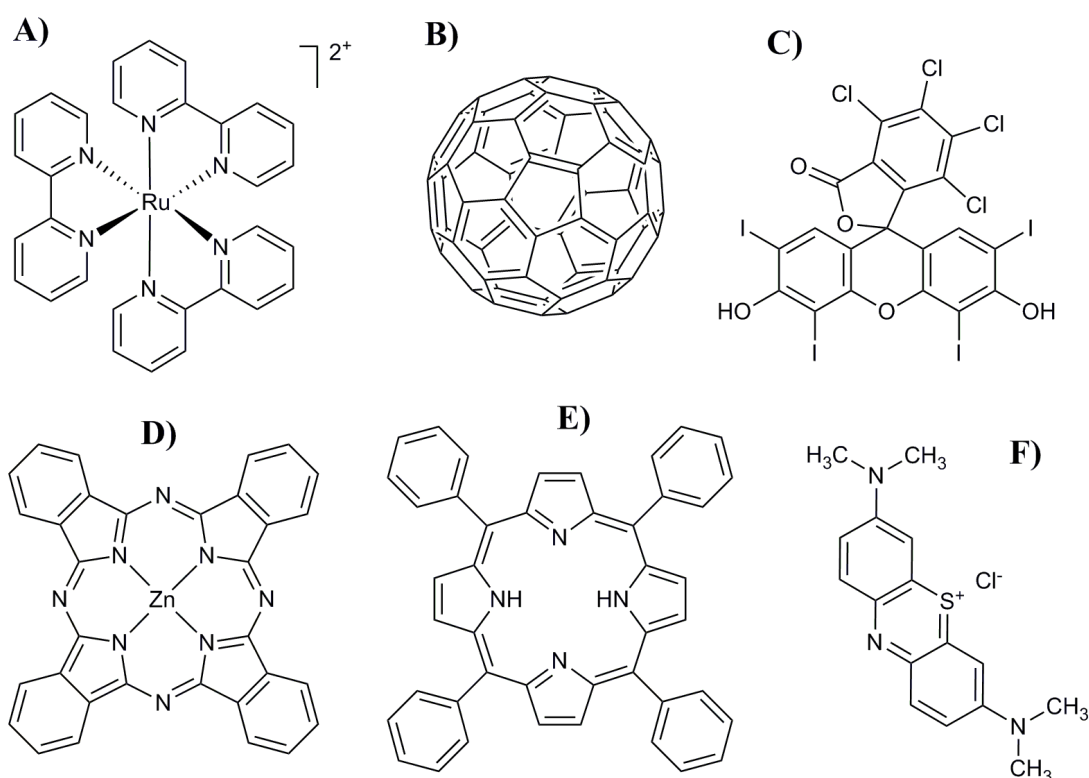
Alternativním mechanismem je zhášení krátce žijících S_1 stavů fotosensitizeru.³⁶ Kvůli rychlým kompetitivním procesům je to daleko méně častý mechanismus (rov. 5-13 a Obr. 2). Možné procesy po tvorbě „encounter“ komplexu jsou obecně složitější než u zhášení T_1 , jelikož mezi energiemi stavu S_1 a S_0 leží minimálně T_1 . Pět spinově povolených a dvě zakázané reakce, které mohou nastat, reprezentují rovnice 16-22.¹²



Může tak dojít k přechodu fotosensitizeru do T_1 stavu za tvorby $O_2(^1\Delta_g)$. Dalšími možnými mechanismy jsou tvorba T_1 bez vzniku $O_2(^1\Delta_g)$, nebo rozptýlení excitační energie ve formě tepla a přechod do S_0 .³⁶ Dostatečnou energii S_1 stavů pro tvorbu $O_2(^1\Delta_g)$ a T_1 a tím i teoretickou možností pro tvorbu dvou $O_2(^1\Delta_g)$ na jedno absorbované kvantum má např. rubren.³⁷

2.1.1.2 FOTOSENSITIZERY

Mezi fotosensitizery patří téměř všechny skupiny organických barviv s různou strukturou, které obsahují konjugované systémy s násobnými vazbami. Patří sem například porfyrinoidní látky (porfyriny, benzoporfyriny, chloriny, feoforbidy, bakteriochloriny, ftalocyaniny, azaftalocyaniny, naftalocyaniny) a některé jejich metalokomplexy, fluoresceinová barviva, thiazinová barviva, fullereny (Obr. 3) a řada dalších, zmíněných v rozsáhlých přehledových člancích.⁴¹ Ačkoliv většina fotosensitizerů jsou organické sloučeniny, existují i anorganické fotosensitizery, např. Mo-clustery.³⁸ Nedávno byla také zjištěna fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ u zlatých³⁹ a křemičitých⁴⁰ nanočástic. U těchto látek však není mechanismus fotosensitizace dostatečně objasněn.



Obr. 3. Struktury různých fotosensitizerů: (A) Chlorid tris(2,2'-bipyridin)ruthenatý (B) Fulleren C_{60} (C) Bengálská červeň (D) Zinečnatý ftalocyanin (E) 5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrin (F) Metylenová modř

Fotosensitizery je možné rozlišit podle orbitalu, ze kterého pochází excitovaný elektron. V případě, že pochází z ne vazebného orbitalu n, se fotosensitizery označují jako

(n,π^*) a upřednostňují obvykle mechanismus typu I. Fotosensitizery upřednostňující mechanismu typu II se označují jako (π,π^*), excitovaný elektron pochází z π orbitalu.

Wilkinson a spol.⁴¹ navrhli další dělení fotosensitizerů produkujících $O_2(^1\Delta_g)$ na T, ST a TC. To přesněji vystihuje mechanismus zhášení jednotlivých energetických stavů fotosensitizeru během fotosensitizované reakce. V případě T fotosensitizeru vzniká $O_2(^1\Delta_g)$ při běžné koncentraci $O_2(^3\Sigma_g^-)$ výhradně zhášením T_1 stavu fotosensitizeru díky efektivnímu mezisystémovému přechodu. U obou dalších typů dochází kromě zmiňovaného mechanismu i ke zhášení nejnižšího singletového stavu S_1 fotosensitizeru kyslíkem, přičemž ST fotosensitizer je schopen na rozdíl od TC fotosensitizeru takto produkovat $O_2(^1\Delta_g)$ díky dostatečnému rozdílu energetických hladin S a T stavů.

Efektivní produkce $O_2(^1\Delta_g)$ a daná aplikace (viz dále) vyžaduje užití vhodného fotosensitizeru. Požadované vlastnosti fotosensitizeru obvykle zahrnují absorpční pásy ve vhodné oblasti světla s vysokým absorpčním koeficientem při excitační vlnové délce, v případě roztoků rozpustnost v daném prostředí s minimem tvorby agregovaných forem (zháší excitované stavy), vysoké kvantové výtěžky tripletových stavů (Φ_T) a následně jejich dostatečné doby života (τ_T), dále dostatečnou energii tripletových stavů pro generaci $O_2(^1\Delta_g)$ s vysokým kvantovým výtěžkem (Φ_Δ). Klíčový parametr (Φ_Δ) je definován:

$$\Phi_\Delta = (\text{počet molekul } O_2(^1\Delta_g)) / (\text{počet hv absorbovaných fotosensitizerem}) \quad (23)$$

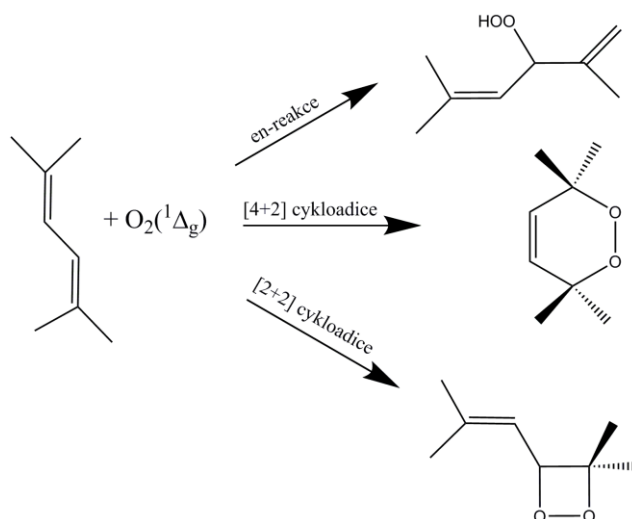
V neposlední řadě je žádoucí, aby fotosensitizer nebyl oxidován $O_2(^1\Delta_g)$ nebo sekundárními oxidačními produkty a byl dostatečně fotostabilní.

2.1.2 REAKCE $O_2(^1\Delta_G)$

Singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$ je díky své elektronové struktuře s přebytkem energie vysoce reaktivní a reaguje s velkým množstvím elektronově bohatých organických substrátů s dvojnými vazbami.⁴² Typickou reakcí $O_2(^1\Delta_g)$ jsou oxidace olefinů, 1,3-dienů, aromatických sloučenin či heterocyklů, při kterých dochází k adicím na dvojnou vazbu C=C, izolované nebo konjugované ve smyslu en-reakce za vzniku allylhydroperoxidů, [2+2] cykloadice za vzniku dioxetanů nebo [4+2] cykloadice za vzniku endoperoxidů (Obr. 4).⁴³ Poměr těchto produktů

je závislý na reakčních podmínkách a struktuře oxidované molekuly.⁴⁴ Další běžnou reakcí $O_2(^1\Delta_g)$ je oxidace organických sulfidů, disulfidů a thiolů, obvykle na sulfoxidy.⁴²

Značná pozornost byla věnována reakcím s biologickými substráty (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy) zvláště vzhledem k fotodynamické terapii, viz dále.⁴⁵



Obr. 4. Schematické znázornění možných adicí $O_2(^1\Delta_g)$ na dvojnou vazbu.

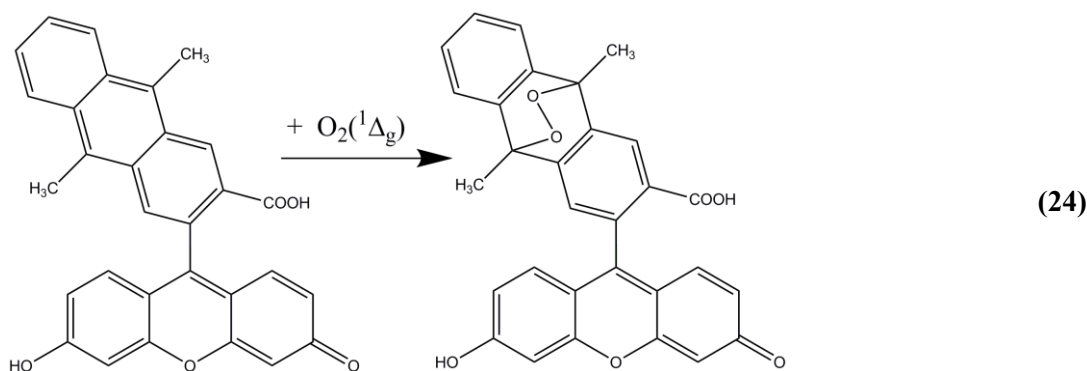
2.1.3 METODY DETEKCE A STANOVENÍ $O_2(^1\Delta_G)$

Některé reakce $O_2(^1\Delta_g)$ popsané v předešlé kapitole lze využít k jeho detekci chemickými metodami. Ty můžeme rozdělit na metody využívající zhášení $O_2(^1\Delta_g)$ interakcí s molekulou zhášeče („quencher“ molekuly) a na metody založené na přímé oxidaci většinou doprovázené odbarvováním („bleaching“) specifických barevných akceptorů $O_2(^1\Delta_g)$. Principy fyzikálního zhášení $O_2(^1\Delta_g)$ jsou uvedeny v kap.2.1. Jako příklady bývají uváděny β -karoten nebo NaN_3 . Ty mohou být využity k inhibici $O_2(^1\Delta_g)$ zprostředkované oxidace a vyloučení vlivu dalších ROS. Podobně lze využít změnu rozpouštědla za jeho deuterovanou formu, ve které má $O_2(^1\Delta_g)$ delší doby života (τ_Δ) (Tab. 1). Zvýšení τ_Δ se projeví na zrychlené kinetice oxidace substrátu.

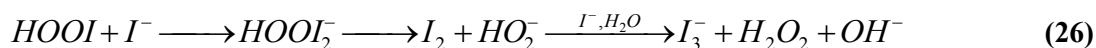
Jako specifické akceptory $O_2(^1\Delta_g)$ lze využít řadu substrátů. Příkladem pro vodné roztoky může být sodná sůl kyseliny močové, jejíž oxidace se dá elegantně spektroskopicky sledovat jako pokles pásu absorpčního maxima při $\lambda = 292 \text{ nm}$.⁴⁶ V nepolárních prostředích lze podobně pozorovat odbarvování 1,3-difenylisobenzofuranu při $\lambda = 440 \text{ nm}$.⁴⁷ Vhodnými

akceptory jsou i některé substráty tvořící endoperoxidy, které, jak již bylo uvedeno, se dají teplem rozkládat zpět na prekursor a $O_2(^1\Delta_g)$, spektrálně lze pozorovat oba reverzibilní pochody. Příkladem může být histidin nebo 2,5-dimethylfuran.⁴⁸

V posledních letech byly také připraveny fluorescenční sondy pro detekci $O_2(^1\Delta_g)$.⁴⁹ Fluorescenční sondy reagují s $O_2(^1\Delta_g)$ za tvorby charakteristického produktu který zhasí (bilirubin, DanePy)⁵⁰ nebo generuje fluorescenci (např. „Singlet Oxygen Sensor Green“ SOSG)⁵¹. Příkladem vhodných fluorescenčních sond jsou sloučeniny odvozené od fluoresceinu. Například 6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3H-xanthen-3-on (DMAX) je oxidován $O_2(^1\Delta_g)$ na odpovídající endoperoxid (Schéma 24). Zatímco DMAX je slabě fluoreskující látkou, jeho endoperoxid vykazuje intenzivní fluorescenci.⁵²



Relativně málo jsou využívány anorganické substráty, jednou z výjimek je reakce I^- , který ochotně reaguje s $O_2(^1\Delta_g)$ ve vodném, mírně kyselém či neutrálním prostředí. Vznikajícím produktem je I_3^- jehož množství je přímo úměrné množství $O_2(^1\Delta_g)$ podle reakčního mechanismu:⁵³



Trijodidový anion absorbuje v blízké UV oblasti a jeho tvorbu lze sledovat pohodlně spektrofotometricky jako nárůst absorpčního pásu při $\lambda = 287$ nebo 351 nm i za podmínek vysokého přebytku substrátu (I^-). Nevýhodou metody je její nízká specifita, naopak výhodou je její jednoduchost a vysoká citlivost.

Singletový kyslík lze detekovat také celou řadou fyzikálních metod, například pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR), a to i přesto, že molekula $O_2(^1\Delta_g)$ není radikálem. Stanovení využívá „spinový záchyt“, reakci $O_2(^1\Delta_g)$ s neradikálovou sloučeninou (např. 2,2,6,6-tetramethylpiperidin) za vzniku relativně stabilního radikálového produktu.⁵⁴ Využívány jsou i fototermální techniky např. („Time Resolving Thermal Lensing“, TRTL)⁵⁵ nebo („Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy“, LIOAS)⁵⁶ založené na sledování uvolnění absorbované energie ve formě tepla do okolí. Uvolněné teplo v rozpouštědle způsobuje změny indexu lomu (TRTL) anebo vznik tlakového rázu (LIOAS). Tyto metody však nejsou příliš specifické pro $O_2(^1\Delta_g)$ a jsou náročné na laboratorní vybavení.

Patrně nejvíce využívanou fyzikální metodou je přímé sledování charakteristické fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$ při $\lambda = 1270$ nm (Obr. 1) pomocí časově rozlišené spektroskopie. Metoda může být využita kromě potvrzení přítomnosti i ke sledování kinetiky generace a zhašení fotogenerovaného $O_2(^1\Delta_g)$. Návrat $O_2(^1\Delta_g)$ do základního stavu je spinově zakázaný přechod s velmi slabým signálem s kvantovými výtěžky fosforescence nižšími než 10^{-4} (cit⁵⁷). Slabý signál fosforescence vyžaduje citlivý NIR detektor. Vzhledem k slabému signálu a krátké době života τ_Δ především ve vodných prostředích může být signál překryt fluorescencí fotosensitizeru. V těchto případech je výhodnější zvolit D_2O , ve které má $O_2(^1\Delta_g)$ cca 20× delší dobu života než v H_2O (viz Tab. 1).

Kinetika jak porfyrinových tripletových stavů, tak $O_2(^1\Delta_g)$ může být popsána rovnicemi 29 respektive 30.⁹¹

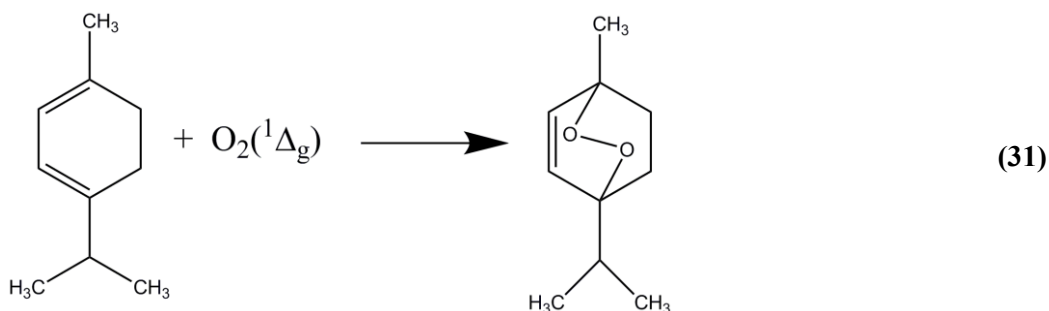
$$[{}^3P] = [{}^3P]_0 \exp(-t/\tau_T), \quad (29)$$

$$[O_2(^1\Delta_g)] = A_{SO} \frac{\tau_\Delta}{\tau_T - \tau_\Delta} (\exp(-t/\tau_T) - \exp(-t/\tau_\Delta)), \quad (30)$$

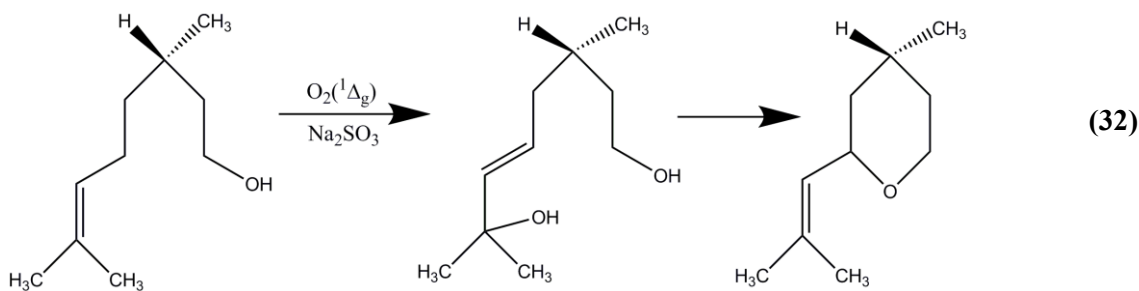
kde A_{SO} je parametr, který je závislý na kvantových výtěžcích $O_2(^1\Delta_g)$, τ_T je doba života tripletových stavů porfyrinu na vzduchu, τ_Δ je odpovídající doba života $O_2(^1\Delta_g)$, $[O_2(^1\Delta_g)]$ představuje koncentraci $O_2(^1\Delta_g)$ v čase t , $[{}^3P]_0$ a $[{}^3P]$ jsou koncentrace tripletových stavů porfyrinu v čase t_0 (okamžitě po excitaci a ISC) respektive v čase t .

2.2 APLIKACE $O_2(^1\Delta_g)$

Singletový kyslík je využíván v organické syntéze jako silné a selektivně působící oxidační činidlo. První technicky významnou syntézou využívající $O_2(^1\Delta_g)$ byla oxidace α -terpinenu na anthelmintikum askaridol (rov. 31).⁵⁸



Oxidační reakce $O_2(^1\Delta_g)$ s olefiny se průmyslově využívají například při výrobě parfémů. Během oxidace citronellolu za redukčních podmínek vzniká nejprve odpovídající allylalkohol a následně po konverzi v kyselém prostředí cyklický terpenoid rosenoxid (rov. 32).⁵⁹



Silné cytotoxické účinky $O_2(^1\Delta_g)$ v biologických systémech jsou historicky označovány jako „fotodynamický efekt“. Fotodynamický efekt je v současnosti patrně nejčastější aplikací $O_2(^1\Delta_g)$, a to v rámci tzv. „fotodynamické terapie“, především různých forem rakoviny („PhotoDynamic Therapy“, PDT) a v rámci tzv. „fotodynamické inaktivace“ bakterií, virů, kvasinek a dalších patogenů, označované v literatuře jako „PhotoDynamic Inactivation“ (PDI) či „Photodynamic Antimicrobial ChemoTherapy“ (PACT).

V biologických systémech může $O_2(^1\Delta_g)$ najít i jiné uplatnění než cytotoxicitu. Například $O_2(^1\Delta_g)$ generovaný uvnitř buňky ve velmi malém množství může aktivací signálních drah způsobit naopak vyšší proliferaci buněk.⁶⁰ Při studiu proteinů se využívá metoda CALI („Chromophore-Assisted Light Inactivation“), která využívá fotosensitizované reakce k velmi přesně zaměřené (díky ozařování v čase i v prostoru) inaktivaci proteinů. Při klasickém přístupu je lokalizace fotosensitizeru docíleno navázáním na vhodnou protilátku, ale využívá se i možnosti modifikace cíleného proteinu pro vytvoření vazebných míst.^{61,62}

2.2.1 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE (PDT)

Princip PDT spočívá v afinitě některých, viditelným světlem excitovatelných, fotosensitizerů k cílové tkáni v kombinaci s vysokou cytotoxicitou fotogenerovaného $O_2(^1\Delta_g)$, a s vysoce lokálním účinkem (díky krátké τ_Δ a tedy i difúzní dráze $O_2(^1\Delta_g)$ v biologickém prostředí).

Postup, např. v terapii rakoviny, spočívá obvykle v intravenózní aplikaci fotosensitizeru s vysokou afinitou k rakovinným tkáním. Po uplynutí doby nutné k selektivní akumulaci fotosensitizeru v tumoru je oblast jeho lokalizace ozářena nízkenergetickým světlem (600–800 nm, oblast tzv. terapeutického okna), které dobře prochází tkání a umožňuje excitaci fotosensitizeru. Pro PDT je důležité, aby excitační záření mělo co nejvyšší penetraci tkání, a mohlo efektivně excitovat fotosensitizer. Záření s $\lambda < 600$ nm není vhodné kvůli absorpenci záření přítomnými endogenními chromofory (melanin, hemoglobin).⁶³ Na druhou stranu záření s $\lambda > 800$ nm nemá dostatečnou energii, aby bylo schopné účinně fotogenerovat $O_2(^1\Delta_g)$.⁶³ V případě vnitřních nádorů je nutno vést světlo k tumorové tkáni prostřednictvím světlovodů s optickými vlákny. Světlem excitovaný fotosensitizer přenáší svou excitační energii na kyslík volně rozpuštěný v tkáních za vzniku $O_2(^1\Delta_g)$. Fotogenerovaný cytotoxický $O_2(^1\Delta_g)$ vzhledem k své krátké difúzní dráze oxidativně destrukuje „*in situ*“ jen své nejbližší okolí, tedy obvykle buněčné membrány a orgány rakovinných buněk, což vede k jejich apoptóze či nekróze.

PDT lze považovat za vysoce selektivní metodu nádorové léčby, protože zasahuje pouze ozářenou oblast nádoru obsahující fotosensitizer. Princip PDT je sice jednoduchý, ale volba vhodného fotosensitizeru představuje velmi komplexní problém. Vhodný fotosensitizer musí splňovat řadu kritérií, jako např. vysokou vazebnou selektivitu k tumorovým tkáním,

nízkou „temnou“ toxicitu, vhodné absorpční spektrum k excitaci, vysokou fotostabilitu, dostatečnou fluorescenci pro jeho sledování v tumorech, dostatečný Φ_{Δ} , vhodnou polaritu pro intravenózní aplikaci a nízkou agregaci v biologickém prostředí. Celou komplexní problematiku PDT shrnuje řada přehledových článků.^{45,64,65}

2.2.2 FOTODYNAMICKÁ INAKTIVACE (PDI)

Antimikrobiální efekt po ozáření fotosensitizeru a i vlastní pojem „fotodynamický“ byl poprvé publikován v pracích profesora von Tappeinera z počátku dvacátého století.⁶⁶

Toxické působení $O_2(^1\Delta_g)$ se v současnosti využívá pro PDI bakterií, virů, kvasinek, prvků i sinic. V rámci PDI je aplikována řada fotosensitizerů, různé chemické povahy např. fenothiazinová barviva, aminoakridinová barviva a xanthenová barviva či porfyrinoidy.^{67,68} Celkový fototoxický efekt je zpravidla způsoben $O_2(^1\Delta_g)$, ale mohou k němu přispívat i další ROS.⁶⁸ Účinnou metodou převzatou z PDT je i vytváření endogenního fotosensitizeru přímo v buňce nebo mikroorganismu, spočívající v podávání kyseliny δ -5-aminolevulové (ALA), která je prekurzorem biosyntézy protoporfyrinu IX, který je účinným fotosensitizerem.⁶⁹

Z důvodu známé rostoucí rezistence bakterií vůči antibiotikům je v současné době pozornost upřena na fotodynamickou inaktivaci bakterií, neboť bakteriální rezistence vůči $O_2(^1\Delta_g)$ není známa. Ačkoliv bylo pozorováno několik mechanismů možné rezistence na PDT terapii, mezi které patří například cílený transport fotosensitizeru z buněk ven nebo tvorba hypoxického prostředí v tumoru, zdá se, že bakterie nevytváří rezistentní kmeny na PDI.⁷⁰

Je zajímavé, že gram-negativní bakterie jsou odolnější vůči ataku $O_2(^1\Delta_g)$ více než gram-pozitivní, pravděpodobně kvůli komplexnější buněčné stěně s vnitřní a vnější membránou separovanou vrstvou peptidoglykanů. V případě nevhodně zvoleného aniontového fotosensitizeru, který je odpuzován záporně nabitým povrchem bakterií, může za stejných podmínek fotosensitizer efektivně deaktivovat gram-pozitivní bakterie a být neúčinný na bakterie gram-negativní.⁷¹ V některých případech už byly provedeny i klinické studie na pacientech využívající PDI.^{72,73}

Za perspektivní lze považovat využití PDI v oblasti desinfekce krve a krevních derivátů či úprava a čištění odpadních vod na úroveň pitné vody.⁷⁴

Zajímavou formu využití $O_2(^1\Delta_g)$ představuje též oblast ekologických, fotodynamických insekticidů, vermicidů, fungicidů a herbicidů, které minimálně zatěžují životní prostředí. Vlivem slunečního záření se rozkládají během několika hodin, navíc jsou obvykle používány ve velmi nízkých koncentracích.⁷⁵

2.2.1 FOTOSENSITIZERY NA/V PEVNÝCH NOSIČÍCH

Přestože existují fotosensitizované reakce v plynném prostředí, naprostá většina fotosensitizací je prováděna v kapalných prostředích. Aplikace fotosensitizerů v daném prostředí ale může mít řadu omezení, jako je temná toxicita, nežádoucí agregace, špatná rozpustnost, zhášení excitovaných stavů okolím atd. Imobilizace fotosensitizeru na pevných nosičích pak představuje cestu jak se některým z těchto problémů vyhnout.⁷⁶ Tyto materiály mohou být připraveny imobilizací fotosensitizeru na/ve vhodné organické nebo anorganické matici např. adsorpcí na povrch (např. silikagelu⁷⁷, Al_2O_3 ⁷⁸), interkalací (např. do hydroxalcitů⁷⁹ či zeolitů⁸⁰) nebo enkapsulací do materiálů (např. polymerů⁸¹) s dostatečnou permeabilitou pro kyslík.^{82,83} Zřejmou výhodou je snadná aplikace ale i následné odstranění imobilizovaného fotosensitizeru po skončení fotosensitizované reakce z daného media. Hlavní výhodou těchto systémů ale je, že fotosensitizer je obklopen homogenním prostředím ve kterém je ideálně v neagregovaném, fotoaktivním stavu, ze kterého může $O_2(^1\Delta_g)$ difundovat směrem k zamýšlenému chemickému substrátu či biologickému terči.

Malá velikost $O_2(^1\Delta_g)$ mu umožňuje difundovat i v hustých prostředích jako jsou např. polymerní matrice, ale nevýhodou je, že díky krátkým dobám života je jeho difúzní dráha omezená. Střední kvadratická vzdálenost d , kterou může $O_2(^1\Delta_g)$ urazit během své doby života τ_Δ může být vyjádřena rovnicí:

$$d = (6 \tau_\Delta D)^{1/2} \quad (33)$$

kde D je relevantní difúzní koeficient pro kyslík (zahrnuje difúzní koeficient matrice nosiče a okolí).⁸⁴ Z rov. 33 je zřejmé, že efektivní dosažitelná vzdálenost pro $O_2(^1\Delta_g)$ je dána materiálem nosiče, ale i jeho rozměrem a prostředím do kterého difunduje. Typická difúzní dráha $O_2(^1\Delta_g)$ je v řadu desítek až stovek nanometrů.^{85,93}

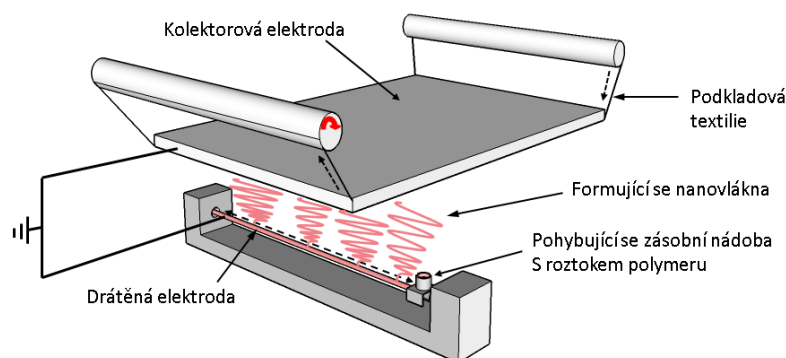
Z výše uvedeného vyplývá, že ideální nosič fotosenzitizeru by měl mít co nejmenší velikost. Z tohoto pohledu lze za vhodné nosiče považovat nanomateriály. Ty představují široké spektrum různých materiálů. Jako nanomateriály jsou většinou označovány materiály s alespoň jedním rozměrem v rozsahu 1 - 100 nm, které mohou mít jiné vlastnosti než makroskopické materiály shodného složení. Podstatná je v této definici spíše změna vlastností než rozmezí velikostí (které se ostatně někdy rozšiřuje až na 500 nm). Zajímavou možností je využití polymerních nanovláknenných materiálů jako nosičů fotosenzitizerů.

2.2.2 NANOVLÁKENNÉ MEMBRÁNY DOPOVANÉ FOTOSENSITIZERY

Jako nanovláknenné materiály jsou označovány netkané textilie/membrány tvořené polymerními nanovláknami. Tyto materiály se vyznačují vysokou porozitou, prodyšností, velkým specifickým povrchem, vyšší mechanickou flexibilitou a nízkou hmotností. Nacházejí uplatnění v širokém spektru oborů, například jako nosiče léčiv⁸⁶, v tkáňovém inženýrství⁸⁷, jako filtrační materiály⁸⁸ nebo jako tzv. chytré textilie⁸⁹. Vlastnosti nanovláknenných materiálů jsou samozřejmě významně ovlivněny volbou polymeru a lze tak docílit například biodegradability⁹⁰.

Nanovláknena lze připravit řadou metod, samotné nanovláknenné membrány se nejčastěji připravují metodou elektrovlákňování („electrospinning“). Metoda je založena na tvorbě tzv. Taylorových kuželů z tenké vrstvy či kapky roztoku polymeru díky intenzivnímu (několik desítek kV/m) stejnosměrnému elektrostatickému poli tvořenému mezi dvěma elektrodami, kde na jedné z nich je kontinuálně vytvářena zmíněná tenká vrstva či kapka polymeru. Např. nanovláknenné membrány připravené technologií NanospiderTM využívají zvlákňování z tenké vrstvy roztoku polymeru nanášené na drátěnou elektrodu pohyblivým zásobním tankem s polymerním roztokem (Obr. 5). Z mnoha formujících se Taylorových kuželů se tvoří polymerní vlákna, ze kterých se rychle odpařuje rozpouštědlo a dochází ke ztenčování vláken, která vystřelují směrem k opačně nabitě kolektorové elektrodě, až dojde k jejich zachycení na pohybující se podkladový materiál před kolektorovou elektrodou.

Electrospinning tak představuje jednoduchou metodu pro přípravu nanovláknenných materiálů, která nevyžaduje žádné další čisticí nebo separační kroky a díky tomu umožňuje jejich poměrně snadnou přípravu.



Obr. 5. Schéma zařízení pro přípravu nanovláknenných membrán.

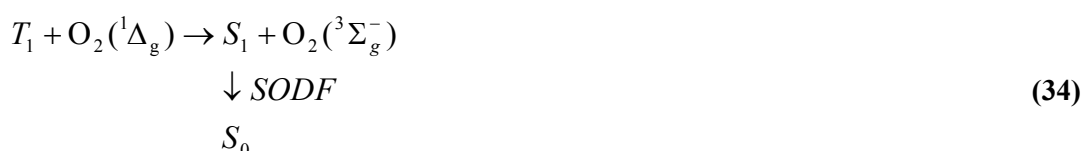
Na druhou stranu ne každý polymer může být použit k přípravě nanovláken. Vznik nanovláken je závislý na řadě parametrů technických a fyzikálních, jako je použité napětí a vzdálenost elektrod, typ polymeru, jeho molekulová váha a koncentrace ve vhodném, nehořlavém rozpouštědle, vodivost a viskozita roztoku, dielektrická konstanta, povrchové napětí, koncentrace aditiv upravujících vodivost atd.

V naší laboratoři byly intenzivně studovány fotoaktivní nanovláknenné materiály (membrány) s enkapsulovanými porfyrinoidními fotosensitizeri, připravené metodou „electrospinning“ technologií NanospiderTM, prostým přidáním fotosensitizeru (0,1-5% v/v) k roztoku polymeru (polystyren, polyuretan, polykaprolakton, polyamid 6). Tenké (obvykle cca 0,03 mm) transparentní membrány lze pohodlně studovat aplikací „steady state“ a časově rozlišených spektrálních technik. Ty ukázaly, že porfyrinoidní fotosensitizeri jsou homogenně distribuovány v polymerních nanovláknnech ve své monomerní fotoaktivní formě. Tripletové stavy enkapsulovaných fotosensitizerů jsou inertní (chráněny) vzhledem k přítomnosti externích zhášeců, ale jsou účinně zhášeny kyslíkem $O_2(^1\Delta_g)$.^{91,92} Klíčová je v tomto ohledu kyslíková permeabilita použitého polymeru.⁹³

Schopnost dopovaných nanovláken fotogenerovat $O_2(^1\Delta_g)$ byla potvrzena pomocí časově rozlišené spektroskopie, detekcí charakteristické fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$ při $\lambda = 1270$ nm, a fotooxidací řady chemických substrátů.

U nanovláknenných membrán s enkapsulovaným fotosensitizerem byl díky masivní generaci $O_2(^1\Delta_g)$ navíc nalezen fenomén tzv. zpožděné fluorescence fotosensitizeru („Singlet

Oxygen Delayed Fluorescence“ SODF). Základní mechanismus SODF popisuje rov. 32. Singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$ vzniklý přenosem energie z T_1 stavu jedné molekuly fotosensitizeru (viz. kap.2.1.1.1) reaguje s T_1 stavem jiné blízko ležící molekuly fotosensitizeru a repopuluje její S_1 , který může následně relaxovat do základního stavu zářivým přechodem SODF v řádu mikrosekund.⁹⁴



SODF je možné využít k zobrazování $O_2(^1\Delta_g)$ v nanovláčkách, k měření jeho dob života a k detekci kyslíku.^{95,96} Pro výpočet dob života tripletových stavů (τ_T) a $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_Δ) je možné využít zjednodušenou funkci⁹⁶ z rov 35:

$$I_{\text{SODF}} = A \frac{\tau_\Delta}{\tau_T - \tau_\Delta} \exp(-t/\tau_T) \times (\exp(-t/\tau_T) - \exp(-t/\tau_\Delta)), \tag{35}$$

kde A je parametr a I_{SODF} představuje intenzitu SODF.

Nanovláčkové membrány produkující $O_2(^1\Delta_g)$ mohou mít řadu dalších praktických aplikací. Lze je využít k syntéze produktů reakcí $O_2(^1\Delta_g)$ s příslušným substrátem, s možností jejich snadné separace od vázaného fotosensitizeru. Antibakteriální a antivirový efekt na povrchu nanovláčkových membrán ozařovaných viditelným umělým či denním světlem byl prokázán na bakteriálních kmenech *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* a na baculovirech a polyomavirech.^{73,97} Membrány jsou vzhledem k malé velikosti pórů mezi nanovláčky schopny zachytávat bakterie a větší viry. Představují tedy nové autodezinfikující, sterilní, krycí materiály např. pro medicínské aplikace (roušky, lehké obvazy), neboť kombinují vlastnosti cytotoxického $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkým dosahem působení a průsvitných nanovláčkových membrán s velkým měrným povrchem, dobrou permeabilitou pro kyslík a mikrobiálním záchytem. Membrány s enkapsulovanými fotosensitizerem byly úspěšně klinicky testovány jako kryty ran u bérkových vředů.⁷³ Enkapsulovaný fotosensitizer v nízké koncentraci uvnitř nanovláček nepředstavuje zdravotní riziko oproti jiným desinfekčním činidlům, naopak pozitivně ovlivňuje např. hojení ran, neboť brání sekundární infekci. Velkou výhodou je již zmíněný fakt, že bakterie či jiné mikroorganismy nevykazují resistenci vůči $O_2(^1\Delta_g)$ (oproti např. antibiotikům) a jsou touto formou kyslíku účinně inaktivovány.

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo vyvinout nové fotoaktivní polystyrenové nanomateriály (nanovláknenné membrány či nanočástice) fotogenerující $O_2(^1\Delta_g)$.

Dílčím cílem bylo modifikovat polystyrenové nanovláknenné membrány s enkapsulovaným fotosensitizerem za účelem zvýšení jejich fotooxidačních schopností, případně přidáním nové funkcionality, vytvořit multifunkční nanovláknenné membrány. Dále, vzhledem k předpokládaným aplikacím nanovláknenných membrán jako krycích antibakteriálních materiálů, testovat přímo tyto materiály pro fotoinaktivaci bakterií.

Dalším cílem bylo vyvinout nové fotoaktivní nanočástice pro detekci rozpuštěného kyslíku ve vodných prostředích a fotooxidaci/fotodesinfekci větších objemů vodných roztoků s možností jednoduchého odstranění nanočástic z ozařovaného roztoku.

Důležitým cílem pro oba typy nanomateriálů, bylo přirozeně charakterizovat jejich vlastnosti a popsat vhodné podmínky pro jejich efektivní využití, především pomocí spektrálních metod, včetně časově rozlišených, zaměřených na monitorování excitovaných stavů fotosensitizerů a generovaného $O_2(^1\Delta_g)$.

4 KOMENTÁŘE K PRACÍM

Tato disertační práce je předkládána jako komentovaný soubor čtyř prací. Články jsou publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech. Všechny publikace jsou původní experimentální práce, zaměřené na vývoj a aplikace fotoaktivních polymerních nanomateriálů generujících singletový kyslík.

4.1 POLYSTYRENOVÉ NANOVLÁKENNÉ MATERIÁLY S EXTERNĚ VÁZANÝM FOTOSENSITIZEREM

Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783. (IF₂₀₁₅ = 7,145)⁹⁸

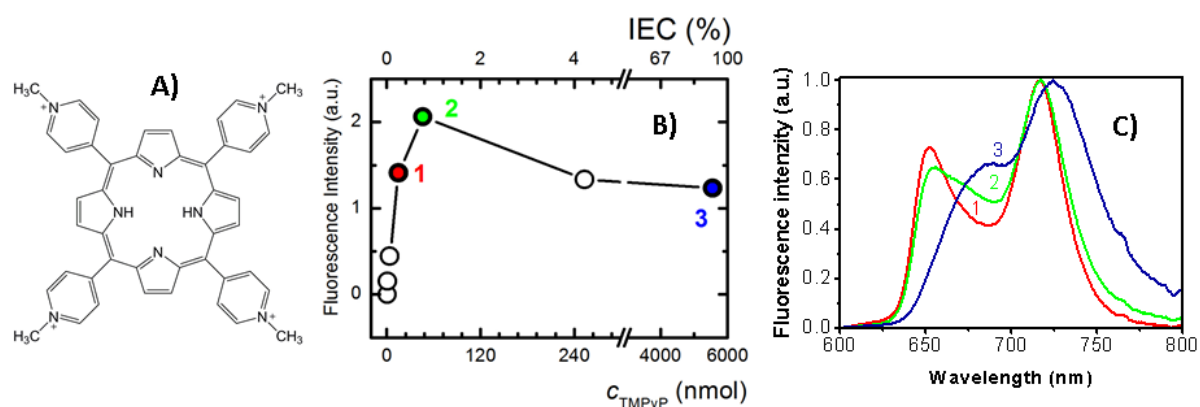
Jednou z možných cest jak zvýšit fotooxidační/antibakteriální efektivitu fotoaktivních nanovláknenných materiálů je navázání fotosensitizeru na povrch nanovláken místo jeho enkapsulace do nanovláken. To může zvětšit objem media, který je efektivně dosažitelný fotogenerovaným $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkou difúzní dráhou.

V této práci jsme proto představili nové nanovláknenné materiály s vlastnostmi katexu s externě vázaným kationtovým fotosensitizerem 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyrinem (TMPyP) (Obr. 6A). Ten byl zvolen z důvodů jeho vysokého kvantového výtěžku $O_2(^1\Delta_g)$ ($\Phi_\Delta = 0.74$)⁴¹ a čtyř kladných nábojů na periferii porfyrinového kruhu zajišťujících pevnou iontovou vazbu na povrch záporně nabitého katexu.

Materiály byly připraveny sulfonací polystyrenové nanovláknenné membrány za chladu pomocí HSO_3Cl jako chlorsulfonačního činidla s následnou hydrolyzou, důkladným vymytím H_2SO_4 a iontovým navázáním kationtového TMPyP.

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie („Scanning Electron Microscopy“, SEM) bylo zjištěno, že i přes intenzivní sulfonaci byla zachována nanovláknenná struktura původního materiálu. Nejvyšší dosažená iontově výměnná kapacita („Ion Exchange Capacity“, IEC) byla 4 mmol/g, což je více než dostačující pro navázání potřebného množství fotosensitizeru (při maximálním vysycení tvořily kationty TMPyP cca 70% hmotnosti materiálu).

Fotofyzikální vlastnosti vázaného TMPyP jsou závislé především na jeho množství (Obr. 6B,C). Analýza fluorescenčních spekter ukázala, že adsorbovaný tetrakation TMPyP se při nižším poměru vůči IEC váže na více $-SO_3^-$ skupin, porfyrinový kruh je zřejmě paralelní s povrchem polystyrenových nanovláken a méně vystaven polárnímu prostředí vodného roztoku, neboť jeho fluorescenční pásy jsou lépe rozlišené (Obr. 6C). Při vyšším poměru fotosensitizeru k IEC jsou molekuly TMPyP vázány pouze přes jeden kladný náboj *N*-methylpyridiniové skupiny, porfyrinový kruh je více vystaven/orientován k polárnímu prostředí, což je indikováno jeho nerozlišenými emisními pásy.⁹⁹



Obr. 6. (A) 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyrinem (TMPyP), (B) závislost intenzity fluorescence na adsorbovaném množství TMPyP, (C) normalizovaná emisní spektra vzorků nanovláčenného materiálu s externě vázaným TMPyP ponořeného ve vodě s poměrem TMPyP/-SO₃⁻ (1) $2,5 \times 10^{-3}$, (2) $7,5 \times 10^{-3}$ a (3) 0,93.

Tvorba $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ byla potvrzena přímým měřením jeho časově rozlišené fosforescence při $\lambda = 1270$ nm. Měření ale komplikoval velký rozptyl excitačního záření na vzorku. Proto byly doby života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ vypočítány z naměřených signálů zpožděné fluorescence (SODF), která byla u těchto materiálů nalezena, stejně jako u nanovláčenných membrán s enkapsulovanými fotosensitizerem.⁹⁵ Zjištěná doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ fitováním signálu SODF 2-parametrovou funkcí z rov. 35 ($0,7 \mu\text{s}$) je významně nižší než v případě $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ generovaného uvnitř polystyrenových vláken ($13,5 \mu\text{s}$), a dokonce nižší než v samotné H₂O ($3,5 \mu\text{s}$), kam $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ difunduje z vláken. To je patrně způsobeno interakcí $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se sousedními molekulami TMPyP na povrchu nanovláken za vzniku zmíněné SODF. Nižší τ_Δ bohužel kompenzuje výhodu externě vázaného fotosensitizeru lokalizovaného ve větší blízkosti cílového substrátu/biologického terče. Nicméně provedené testy ukázaly velmi efektivní fotooxidaci externích substrátů (jodidové detekční činidlo⁴⁶, kyselina močová⁵³) fotogenerovaným $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Bylo též zjištěno, že vázaný TMPyP nepodléhá světlem indukované agregaci, na rozdíl od volného TMPyP.

Na povrchu membrán byl zjištěn silný antibakteriální účinek vůči bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* DH5a (tento kmen umožňuje vizualizaci bakteriálních kolonií). Vzorky membrán s fotosensitizerem a bez fotosensitizeru byly ozařovány solárním simulátorem, anebo ponechány ve tmě. Pouze ozařované vzorky membrán s fotosensitizerem nebyly (po následné inkubaci) porostlé bakteriálními koloniemi. Provedeným testem bylo možné vyloučit vliv samotného světla i temnou toxicitu použitých sulfonovaných materiálů.

Vzhledem k velké iontové kapacitě (4 mmol/g) a nízkému molárnímu poměru TMPyP/ SO_3^- , který se ukázal být nejvhodnější na základě fotofyzikálních měření, je možné nanovláknennou membránu (i s pevně vázaným fotosensitizerem) využít pro iontovou výměnu a rozšířit tak funkcionalitu nanomateriálu. Např. naměřené adsorpční izothermy olovnatých kationtů byly pro membránu s fotosensitizerem prakticky identické jako u membrány bez fotosensitizeru. To může být využito například pro odstraňování produktů fotooxidace anebo těžkých kovů během čištění a sterilizace vod.

V souhrnu lze konstatovat, že v porovnání s enkapsulovaným fotosensitizerem uvnitř nanovláken je externě vázaný TMPyP na povrchu nanovláken méně chráněn před vlivem okolí. Nepodléhá fotoindukované agregaci, ale je ovlivněn polaritou a zhášecími efekty okolního prostředí. Na druhou stranu díky zesíťování („cross-link effect“) polystyrenových nanovláken v důsledku chlorsulfonace získal tento materiál odolnost vůči organickým rozpouštědlům. Připravený materiál vykazuje srovnatelnou účinnosti fotooxidace a je navíc schopen vychytávat kationty z roztoku/media.

4.2 VLIV SMÁČIVOSTI NANOVLÁKENNÝCH MATERIÁLŮ S ENKAPSULOVANÝM FOTOSENSITIZEREM NA ANTIBAKTERIÁLNÍ EFEKT

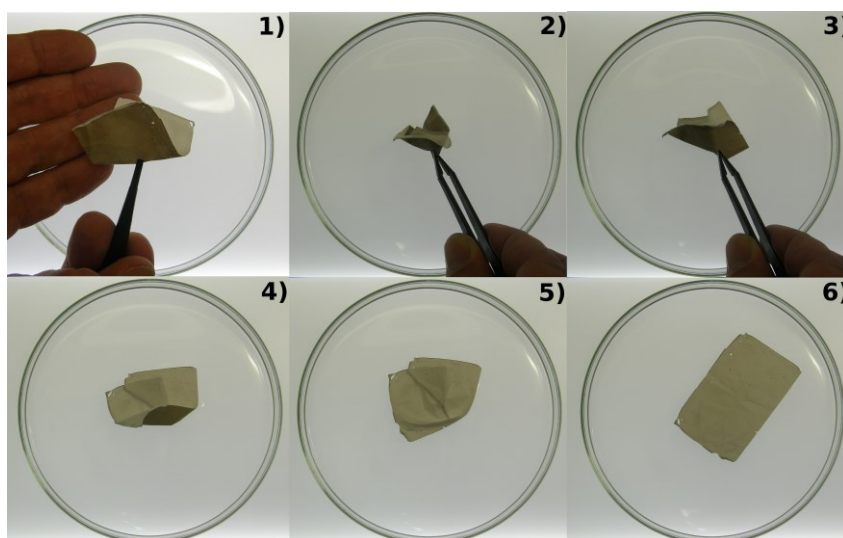
Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $O_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014. (IF₂₀₁₅ = 7,145)¹⁰⁰

Jak již bylo uvedeno (kap.2.2.2), v případě nanovlákných membrán s enkapsulovaným fotosensitizerem je jedním z klíčových parametrů kyslíková permeabilita/difúze použitého polymeru, umožňující účinné zhášení tripletových stavů kyslíkem, ale i transport $O_2(^1\Delta_g)$ k povrchu membrány. Z tohoto pohledu je polystyren jedním z ideálních nosičů. Důvodem je především jeho vysoká kyslíková permeabilita ($P(O_2) = 1,9 \times 10^{13} \text{ cm}^3 \text{ cm/cm}^2 \text{ s Pa}$)⁹⁵, ale i komerční dostupnost a schopnost tvořit dobře definovaná nanovlákná s úzkou distribucí průměru nanovláken ($250 \pm 30 \text{ nm}$) metodou „electrospinning“. Polystyren je vysoce hydrofobním polymerem. To umožňuje enkapsulaci a homogenní distribuci hydrofobních fotosensitizerů, např. 5,10,15,20-*meso*-tetrafenylporfyrinu (TPP, Obr. 3E), navíc v monomerním, fotoaktivním stavu, do celého objemu nanovláken.⁹⁵ Důležitá je i okolnost, že hydrofobní fotosensitizer se nemohou uvolňovat z polystyrenové matrice do vodného prostředí.

Problémem je ale právě již zmíněná hydrofobicita polystyrenu, která činí povrch nanovlákných membrán nesmáčivým pro vodná prostředí. U nanovlákných membrán s enkapsulovaným fotosensitizerem lze očekávat jen nízkou účinnost fotooxidace substrátu či fotodesinfekce ve vodných prostředích. Důvodem je krátká difúzní dráha $O_2(^1\Delta_g)$, která omezuje jeho působení pouze na povrch membrán. Je-li povrch nesmáčivý, chemické substráty/biologické terče se dostávají mimo difúzní dosah $O_2(^1\Delta_g)$.

Hlavním cílem této práce bylo proto modifikovat povrch polystyrenových nanovlákných membrán s enkapsulovaným TPP pro zvýšení smáčivosti.

Povrch polystyrenových membrán s enkapsulovaným 1% TPP byl modifikován celkem 3 postupy i) pomocí sulfonace, ii) aplikací radiofrekvenční studené plazmy a iii) nanesením tenké vrstvy polydopaminu (PDA) s cílem zvýšit hydrofilicitu/smáčivost povrchu. Elektronovou skenovací mikroskopií bylo zjištěno, že žádná z použitých modifikací nenarušila nanovláknennou strukturu materiálu, a dokonce ani u modifikace pomocí PDA nedošlo k významnému nárůstu průměru vláken. Modifikace povrchu byla potvrzena pomocí infračervené spektroskopie (nové funkční skupiny) a změnou smáčivosti. Ta byla pozorována metodou měření kontaktních úhlů („Apparent Contact Angle“, ACA) mezi vodní kapkou a povrchem membrán (Obr. 8C). Modifikované materiály po hydrofilní úpravě vykazovaly méně než měřitelných 5° (výchozí polystyrenový materiál okolo 130°), je ale důležité si uvědomit, že smáčivost je významně ovlivněna i nanostrukturovaným povrchem. To může vysvětlit nižší pozorované hodnoty ACA i při malém množství nanoseného PDA než v literatuře udávaných 50° (cit¹⁰¹). V případě použití studené plazmy nebylo pozorováno v literatuře popisované postupné vymizení nově vytvořených kyslíkových funkčních skupin a následný návrat k původním hodnotám ACA v čase.^{102,103}



Obr. 7. Vložení poskládané Janusovy membrány do vody a její samovolné rozložení na vodní hladině v postupné sérii snímků. Tmavší část membrány je pokrytá vrstvou PDA. (převzato z článku¹⁰⁰)

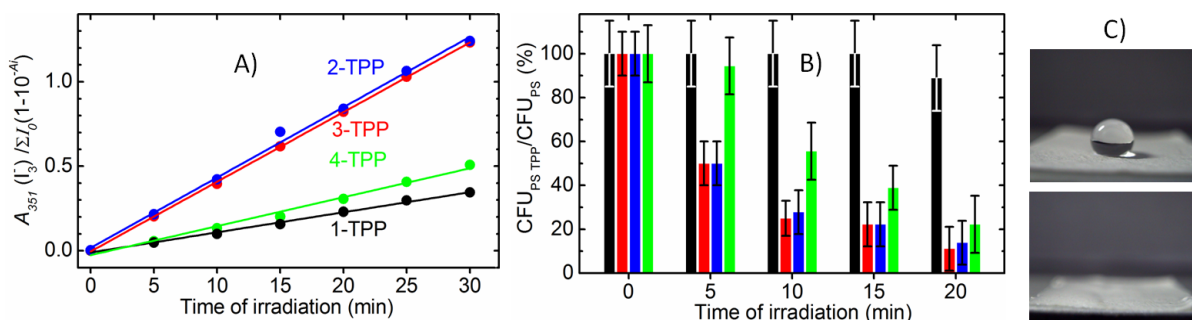
Jak již bylo uvedeno, vedle sulfonace a studené plazmy byl v práci pro hydrofilní úpravu povrchu nanovláknenných membrán použit i dopamin, který samovolně polymerizuje a částečně agreguje z vodného roztoku při pH = 8,5 a nespécificky ulpívá v podobě PDA na většině povrchů.¹⁰⁴ Byl učiněn i úspěšný pokus nanést vrstvu PDA jen z jedné strany polystyrenové membrány. Vznikla tak tzv. „Janusova membrána“¹⁰⁵, která je hydrofobní na

jedné straně a hydrofilní na druhé. Takto vzniklý materiál měl při umístění na hladinu vody tendenci se dokonale rozprostřít a orientovat se nemodifikovanou stranou směrem od hladiny (Obr. 7). To může být výhodné pro praktické aplikace takto modifikovaných membrán. Např. pro fotooxidace vodorozpustných substrátů, kdy nemodifikovaná strana s vysokou transparentností je orientována směrem ke zdroji záření, zatímco hydrofilní, s omezenou transparentností PDA vrstvy, je orientována do vodného prostředí, kde zajišťuje kontakt se substráty.

U nemodifikované membrány s enkapsulovaným fotosensitizerem i membrán s modifikovaným povrchem byla sledována řada parametrů, které by mohly mít vliv na efektivitu fotooxidace externích substrátů. Například pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie bylo potvrzeno, že povrchové modifikace nezpůsobují agregaci fotosensitizeru ani jeho vystavení polárnímu prostředí. Naměřené doby života tripletových stavů fotosensitizeru (τ_T) a $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_Δ) nevykazovaly žádné změny po modifikaci. Z těchto hodnot lze vypočítat permeabilitu materiálu pro kyslík ($P(O_2)$) a difuzní dráhu $O_2(^1\Delta_g)$ (d , rov. 31).⁹³ Ani tyto parametry se nezměnily.

Vypočtená hodnota difuzní dráhy $O_2(^1\Delta_g)$ ($d \sim 45$ nm) v polystyrenové matici je zajímavá hlavně v porovnání s průměrnou tloušťkou PS nanovláken (cca 200 nm), z čehož vyplývá, že molekuly TPP umístěné ve středu nanovláken jsou pro fotooxidaci externího substrátu nevyužitelné.

Pro porovnání účinnosti fotooxidace externího substrátu u modifikovaných a nemodifikovaných membrán bylo zvoleno jodidové detekční činidlo⁵³ (rov.25-28). Množství vznikajícího produktu (I_3^-) bylo vztaženo k množství absorbovaného světla (Obr. 8A). Vzhledem k výše uvedeným testům potvrzujícím zachování $P(O_2)$ a τ_Δ , bylo možné významný nárůst efektivitu fotooxidace/směrnice kinetiky tvorby I_3^- (cca 3,5× u sulfonovaného a plazmovaného vzorku) přiřadit změně smáčivosti membrány. U vzorků s PDA filmem byl pozorován pouze malý nárůst efektivitu (1,4×), vysvětlitelný nižší transparentností (transmitancí) PDA filmu. Po matematické korekci na nižší hodnotu transmitance vzorku byla vypočtená efektivita fotooxidace téměř shodná s hodnotami pro sulfonované a plazmované vzorky.



Obr. 8. (A) Závislost absorbance I_3^- při 351 nm v jodidovém detekčním činidle na době ozařování (kinetika tvorby I_3^-) korigovaná na absorbované excitační záření pro jednotlivé vzorky. (B) Počty životaschopných bakterií (CFU) v procentech ozařované slepé kontroly (bez TPP). Odečtených po inkubaci bakteriálního inokula ozařovaného na povrchu jednotlivých vzorků solárním simulátorem. (C) Fotografie kapky H_2O na nemodifikovaném (horní fotografie) a modifikovaném (spodní fotografie) vzorku nanovláčkové membrány. (1, černá) nemodifikovaný vzorek nanovláčkové membrány s enkapsulovaným TPP, (2, modrá) sulfonovaný vzorek, (3, červená) vzorek ošetřený studenou plazmou a (4, zelená) vzorek pokrytý vrstvou PDA

Vzhledem k množství parametrů, které mohou ovlivnit růst bakterií je nutné všechny materiály zamýšlené pro antibakteriální aplikace testovat přímo na bakteriích. Antibakteriální testy byly nastaveny tak, aby mohl být vyhodnocen relativní pokles životaschopných bakterií, jako počet pozorovatelných bakteriálních kolonií („Colony Forming Units“, CFU) po různých ozařovacích časech. Jak je vidět na (Obr. 8B), rozdíl v antibakteriálním účinku modifikovaných a nemodifikovaných membrán je ještě markantnější než v případě fotooxidace externího substrátu. Nemodifikované membrány vykazovaly za daných podmínek antibakteriální účinek pouze na úrovni chyby stanovení (tj $\pm 10\%$). Oproti tomu u modifikovaných membrán sulfonací nebo studenou plazmou se po 20 minutách ozařování solárním simulátorem zvýšil počet usmrcených bakterií z 10 % na 90 %, v případě aplikace PDA na 80 %. V literatuře je sice zmiňována možná cytotoxicita PDA, ale ta je patrně dána pokrytím bakterií filmem PDA při samotné polymerizaci a následným omezením přísunu živin.¹⁰⁶ V této studii nebyla pozorována žádná temná toxicita nanovláčkových membrán (modifikovaných i nemodifikovaných).

Výsledky této studie ukazují zásadní roli smáčivosti materiálů generujících $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkou difúzní dráhou na výsledný antibakteriální efekt.

4.3 VLIV TEPLoty NA FOTOFYZIKÁLNÍ A

ANTIBAKTERIÁLNÍ VLASTNOSTI NANOVLÁKENNÝCH MATERIÁLŮ

Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174. (IF₂₀₁₅ = 3,187)¹⁰⁷

V předchozích publikacích byly připraveny dva různé typy antibakteriálních polymerních nanovlákných materiálů s enkapsulovaným či externě vázaným fotosensitizerem produkujících $O_2(^1\Delta_g)$. Tato publikace byla zaměřena na vliv teploty, důležitého fyzikálního parametru, který může ovlivnit efektivitu fotooxidace, a tedy antibakteriální vlastnosti nanovlákného materiálu, protože ovlivňuje jak zhášení $O_2(^1\Delta_g)$ okolím, tak i kyslíkovou permeabilitu $P(O_2)$ polymerů.^{17,108}

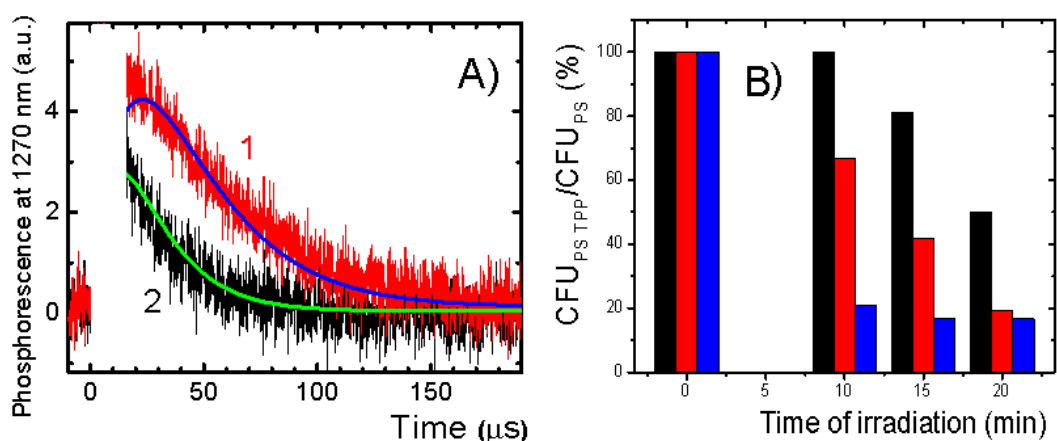
Z časově rozlišených měření bylo zjištěno, že jak kinetika tripletových stavů porfyrinového fotosensitizeru (TPP) enkapsulovaného v polystyrenových či polyuretanových nanovláknách (Larithan, Tecophilic), tak kinetika $O_2(^1\Delta_g)$, jsou závislé na teplotě (Obr. 9A). U testovaných membrán s enkapsulovaným TPP vede zvýšení teploty ke zvýšení difúze kyslíku v polymerních vláknách. To se projeví v kratších dobách života tripletových stavů fotosensitizeru (τ_T), kratších dobách života $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_Δ) a zesíleném signálu SODF. Kratší τ_T při vyšší teplotě jsou dány tím, že tripletové stavy fotosensitizeru jsou efektivněji zhášeny, především kyslíkem $O_2(^3\Sigma_g)$ za vzniku $O_2(^1\Delta_g)$. Snadnější dostupnost $O_2(^1\Delta_g)$ k tripletovým stavům sousedních molekul fotosensitizeru je pak příčinou zesíleného signálu SODF. Důvod kratší τ_Δ při vyšší teplotě má komplexnější vysvětlení a závisí na okolí nanovláken. Je způsobena zvýšeným, teplotně závislým neradiačním zhášením $O_2(^1\Delta_g)$ molekulami polymeru, ale i tím, že $O_2(^1\Delta_g)$ snadněji difunduje z polymerních nanovláken do vnějšího prostředí (např. H_2O), kde má kratší dobu života.

Změny v τ_Δ jsou zvláště patrné v případě polyuretanových membrán, kde je však situace komplikovaná tepelným ireversibilním smrštěním nanovlákné membrány („shrinkage effect“).

Naměřené změny τ_T a τ_Δ v případě vzorků polystyrenových membrán s enkapsulovaným TPP jsou plně reverzibilní. To bylo potvrzeno 4 cykly postupného zahřívání na 60°C a následného ochlazení na 5°C.

Heterogenita materiálu a rozptýl excitačního záření na vzorcích bohužel neumožňuje přesný výpočet kvantových výtěžků singletového kyslíku (Φ_Δ) ani tripletových stavů porfyrinového fotosensitizeru (Φ_T). Ale vzhledem k tomu, že nebyla pozorována změna amplitudy signálu tripletových stavů TPP ani $O_2(^1\Delta_g)$ na teplotě (v rozmezí 5° až 55°C), lze předpokládat, že nenastávají žádné signifikantní změny v Φ_Δ , ani Φ_T .

V práci byly testovány i sulfonované polystyrenové nanovlákněné membrány s externě vázaným fotosensitizerem (TMPyP). Ty však vykazovaly menší tepelnou závislost τ_Δ než v případě membrán s enkapsulovaným fotosensitizerem. To je dáno tím, že $O_2(^1\Delta_g)$ nevzniká v nanovlákněch, nýbrž na jejich povrchu, a neprojevuje se tak významně rozdílná rychlost difúze kyslíku skrz polymer.



Obr. 9. (A) Kinetika tvorby a deaktivace $O_2(^1\Delta_g)$ generovaného v PS nanovlákněných membránách s enkapsulovaným TPP při 5 (1) a 55 (2) °C v D_2O . Na obrázku (B) je procentuální vyjádření počtu životaschopných kolonií *Escherichia coli* v porovnání se vzorkem bez TPP v závislosti na ozařovacím čase pro 5°C (černá), 25°C (červená) a 32°C (modrá). (převzato a upraveno z článku¹⁰⁷)

V této práci bylo rovněž testováno, jak se projeví teplotně závislé změny v kyslíkové difúzi polymeru a τ_Δ na výsledném antibakteriálním efektu vůči bakteriím *Escherichia coli*. V případě testování antibakteriálních efektů je třeba poznamenat, že teplota může mít vliv na další relevantní faktory, jako např. přísun živin nebo samotnou rychlost množení bakterií. Pro testování byly vybrány tři teploty, 5 °C, 25 °C a 32 °C. Při teplotě 5 °C se obvykle provádí mikrobiologické testování, kdy nedochází ke změnám v populaci bakterií v důsledku rychlého

množení (*Escherichia coli* se dělí při teplotě vyšší než 7,5 °C¹⁰⁹). Dále byly testy prováděny při laboratorní teplotě a při teplotě odpovídající lidské pokožce (32 °C) pro možné medicínské aplikace (viz kap. 2.2.2). Pro antibakteriální testy byl použit polystyrenový nanovlákný materiál s enkapsulovaným TPP po modifikování studenou plazmou (modifikace neměla vliv na měřené teplotní závislosti) pro zvýšení smáčivosti (viz. kap.4.2). Výsledky antibakteriálních testů (počty CFU) pro různé teploty pak byly hodnoceny proti kontrolnímu materiálu bez TPP za stejných experimentálních podmínek. Pozorován byl významně silnější antibakteriální účinek s rostoucí teplotou (Obr. 9B) v souladu s rostoucí kyslíkovou difúzí polystyrenových nanovlákných membrán.

4.4 POLYMERNÍ NANOČÁSTICE S ENKAPSULOVANÝM FOTOSENSITIZEREM PŘIPRAVENÉ Z NANOVLÁKNÝCH MATERIÁLŮ.

Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127-25136. (IF₂₀₁₅ = 7,145)¹¹⁰

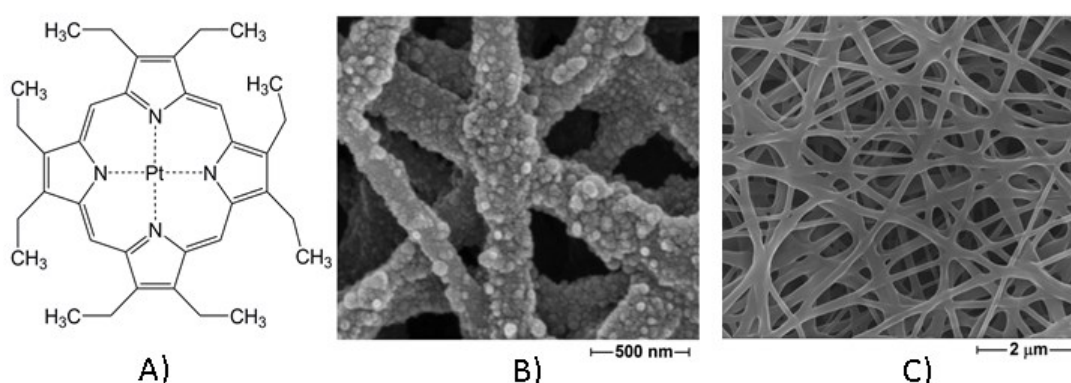
Fotoaktivní nanovlákné materiály generující O₂(¹Δ_g) jsou pro jeho krátkou difúzní dráhu vhodné pro relativně úzkou skupinu aplikací. Pro aplikace, kde je potřeba sterilizovat nebo oxidovat větší objemy vodných medií při zachování ochrany fotosensitizeru polymerním obalem, jsou však jako nosiče fotosensitizerů vhodnější polymerní nanočástice.

V tomto článku jsme představili jednoduchou precipitační metodu pro přípravu sulfonovaných polystyrenových nanočástic (NPs) s enkapsulovaným TPP nebo platnatým oktaethylporfyrinem (Pt-OEP) (Obr. 10A). Nanočástice byly připravené vysrážením přidávkem vody z roztoku THF, v němž byla rozpuštěna dlouhodobě sulfonovaná polystyrenová nanovlákná membrána s enkapsulovaným porfyrinem. Takto připravené NPs mají průměrný průměr 30 ± 10 nm a jsou vysoce dlouhodobě stabilní díky vysoké hustotě záporného povrchového náboje způsobeným sulfo-skupinami, nepodléhají ve vodné suspenzi agregaci a navíc ani významně nesedimentují díky podobné hustotě polystyrenu a vody.

NPs s enkapsulovaným TPP lze využít pro již zmíněnou oxidaci/sterilizaci vodných roztoků, NPs s Pt-OEP lze využít jako kyslíkové fluorescenční sensory pro vodná prostředí. U obou typů bylo využito ochrany průsvitného polystyrenového pláště s dobrou permeabilitou pro kyslík.

Velkou výhodou těchto NPs je také možnost jejich odstranění z vodné suspenze jednoduchou filtrací přes nanovláčennou polyuretanovou membránu (Tecophilic). Ze SEM snímků je zřejmé, že vzdálenosti mezi jednotlivými vlákny ve stejné vrstvě jsou větší než průměr NPs a že dochází k vychytávání NPs na povrchu nanovláček (Obr. 10B, C). Skrz membránu z nanovláček tak může projít jen malá frakce NPs (< 1%), překvapivě se stejnou distribucí velikostí jako originální suspenze. To může být vysvětleno existencí malého množství větších mezer mezi nanovláčky v náhodně uspořádaných vrstvách. Pro úplné odstranění lze využít opakovanou filtraci.

Absorpční, emisní a excitační spektra NPs ve vodných suspenzích ukazují, že oba porfyriny jsou enkapsulované převážně v monomerní formě uvnitř NPs a chráněné tak před okolní vodou, ve které jsou jinak tyto látky v agregovaném, neaktivním stavu.



Obr. 10. (A) Struktura platnatého oktaethylporfyrinu (Pt-OEP). (B) SEM snímek polyuretanových (Tecophilic) nanovláček se zachycenými NPs. (C) SEM snímek samotné polyuretanové nanovláčenné membrány. SEM snímky jsou převzaty z článku¹¹⁰.

V případě NPs s TPP byla fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$ potvrzena přímým měřením jeho fosforecence při $\lambda = 1270$ nm.

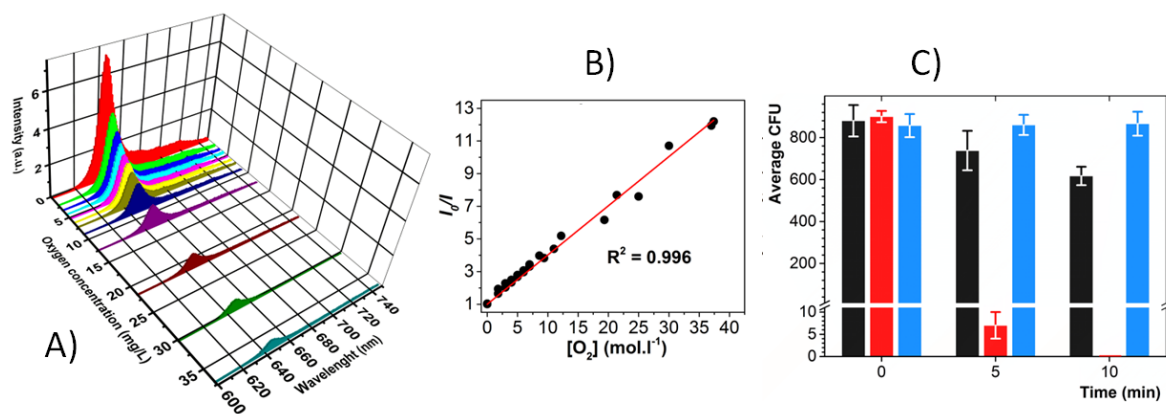
Pomocí časově rozlišené spektroskopie u obou typů NPs byly zjištěny kinetiky tripletových stavů enkapsulovaných porfyrinů ve vodných suspenzích po nasycení vzduchem, kyslíkem a argonem. Z nich vyplývá, že tripletové stavy jsou účinně zhašeny kyslíkem, ale mají oproti vodným roztokům testovaného vodorozpustného porfyrinového fotosensitizeru (5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatofenyl)porfyrin, TPPS) delší dobu života způsobenou horším

difuzním koeficientem kyslíku v polystyrenových nanovláčkách než v H₂O. Na druhou stranu při porovnání NPs s TPP oproti ve vodě rozpuštěným TPPS byla zjištěná frakce tripletových stavů zhasených O₂(³Σ_g⁻)¹¹⁰ ve vzduchem nasycené suspenzi shodná (0,997).

Enkapsulovaný Pt-OEP má v porovnání s TPP o něco kratší doby života tripletů (τ_T) a nižší frakci tripletů zhasenou kyslíkem, to je způsobené přítomností luminiscence, kompetitivního deaktivčního mechanismu.

U NPs s TPP byla pozorována velmi vysoká schopnost fotooxidovat externí substráty. Konkrétně byla sledována reakce s jodidovým detekčním činidlem a s kyselinou močovou, která je více specifická pro O₂(¹Δ_g). Porovnat výsledky s fotoaktivními nanovláčkovými membrány je ale obtížné, především z důvodu problematického stanovení množství absorbovaného světla, zvláště u relativně heterogenních nanovláčkových membrán s vysokým rozptylem světla. Na vysoké efektivitě fotooxidace NPs se ale jistě podílí zejména difuzní dráha O₂(¹Δ_g) v polystyrenových NPs srovnatelná s průměrem nanočástic. Na rozdíl od nanovláčkových membrán mohou NPs zaplnit celý reakční objem a i přes krátkou difuzní dráhu O₂(¹Δ_g) účinně fotooxidovat substráty.

Zmíněné výhody NPs s TPP se pak projeví významně u antibakteriálních a antivirových testů. Konkrétně proti bakteriím *Escherichia coli*, neobalenému polyomaviru a obalenému rekombinantnímu pVL-VP1 baculoviru. Signifikantní snížení (pod 1 %) počtu životaschopných bakterií (vyjádřeno v CFU) bylo dosaženo již po 5 minutách ozařování studeným viditelným světlem (500W Xe-lampa s UV filtrem a vodním filtrem), po 10 minutách ozařování dochází k 100% fotoinaktivaci bakterií (Obr. 11C). Podobného výsledku bylo dosaženo i u virů. Při o řád nižší koncentraci použitých NPs (6×10¹² NPs/mL) a slabším ozařovacím zdroji (300W halogenová lampa) bylo k účinné inaktivaci potřeba jen 30 minut ozařování studeným bílým světlem.



Obr. 11. (A) 3D reprezentace závislosti luminiscence NPs s Pt-OEP na koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě. (B) Odpovídající Stern–Volmer závislost pro různé koncentrace rozpuštěného kyslíku. (C) Průměrný počet CFU odečtený pro bakteriální suspenze ozařované s NPs bez TPP (černá) a s TPP (červená) a suspenze NPs TPP ponechané ve tmě (modrá). Převzato a upraveno z článku¹¹⁰.

Další možností, jak využít vysokou kyslíkovou permeabilitu a transparentnost polystyrenového obalu NPs, je konstrukce kyslíkového sensoru založeného na charakteristické luminiscenci Pt-OEP zhasené kyslíkem. Odezva fosforescence NPs pro různé koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodných suspenzích byla změřena a vynesena ve formě Stern-Volmerova grafu (Obr. 11A, B). Poměr intenzity signálu luminiscence u suspenze nasycené kyslíkem oproti nasycení dusíkem (12,2) a dobré proložení lineární funkcí ($R^2 = 0,997$) ukazuje na dobrou citlivost v celém rozsahu možných koncentrací O_2 ve vodě. NPs s Pt-OEP tak představují dobrou alternativu pro měření koncentrace kyslíku tam, kde nemohou být kvůli rozměrům použity standardní elektrody/čidla, anebo kde jsou chemické sondy příliš toxické či citlivé na okolní prostředí.

Lze shrnout, že v tomto článku jsme popsali jednoduchou přípravu stabilních fotoaktivních polystyrenových nanočástic metodou „top-down“. Na základě volby fotoaktivní enkapsulované látky lze použít připravené NPs k sterilizaci vodných roztoků (TPP) nebo k detekci koncentrace rozpuštěného kyslíku v H_2O (Pt-OEP). Demonstrována byla také jednoduchá metoda pro odstranění NPs z vodných roztoků filtrací přes polyuretanovou membránu.

5 SOUHRNNÁ DISKUZE

Současný výzkum účinných antimikrobiálních materiálů se mimo jiné soustředí na studium fotosensitizerů vázaných na pevných nosičích, fotogenerujících, s dostatečnou účinností, silně cytotoxický $O_2(^1\Delta_g)$. Při vývoji těchto materiálů je potřeba si uvědomit několik skutečností. Biologická media jsou vodné roztoky, kde je doba života $O_2(^1\Delta_g)$ ($\tau_\Delta \sim 3,5 \mu s$) velmi krátká (Tab. 1), čemuž odpovídá i krátká difúzní dráha ($d \sim 200 \text{ nm}$). Z toho plyne nutnost lokalizace vázaného fotosensitizeru do těsné blízkosti cílové molekuly/biologického terče. Z podstaty fotosensitizedované reakce vyplývá také nutnost snadného přístupu kyslíku a světla k fotosensitizeru.

Nanovláknenné polymerní materiály připravené metodou „electrospinning“ nabízí vzhledem k průměru nanovláken (cca 100 – 400 nm) velký měrný povrch, v případě vhodně zvoleného polymeru i dobrou kyslíkovou permeabilitu/difúzi a transparentnost a v případě smáčivého povrchu i blízký kontakt s biologickými terči.

Cílem tohoto projektu bylo připravit nové nebo modifikovat stávající polymerní nanomateriály s enkapsulovanými či externě vázanými fotosensitizery a navázat tak na předchozí studie naší výzkumné skupiny, popisující především enkapsulované porfyrinoidní fotosensitizery v nanovlákněch různých polymerů.^{91,92,93,95,96,97}

Pro další vývoj polymerních nanomateriálů jako nosičů fotosensitizerů byl vybrán kvůli své vysoké kyslíkové permeabilitě a možnostem derivatizace povrchu polystyren ve formě nanovláknenných materiálů.

Jednou z cest, jak modifikovat nanovláknenné polystyrenové materiály, byla jejich povrchová derivatizace na ionexové materiály. V rámci tohoto projektu byla pozornost zaměřena na přípravu a studium katexového materiálu⁹⁸ (analogicky byla v naší výzkumné skupině testována i příprava anexového materiálu¹¹¹), s možností navázání externího fotosensitizeru na povrch nanovláken a získání multifunkčního materiálu.

K přípravě nanovláknenného katexu byla využita sulfonace polystyrenových nanovláken pomocí HSO_3Cl , která je potřeba k dosažení vysokých hodnot iontové výměnné kapacity. I přes intenzivní sulfonaci je nanovláknenná struktura zachována, navíc dochází k částečnému zesíťování („cross-link“) polymeru, což výrazně zvyšuje odolnost materiálu vůči organickým rozpouštědlům. Na druhou stranu tento efekt snižuje kyslíkovou permeabilitu polystyrenu – fotofyzikální měření ukázala významnou frakci tripletových stavů enkapsulovaného fotosensitizeru TPP, které nejsou zhaseny kyslíkem.¹¹¹ Ionexové materiály

s enapsulovaným fotosensitizerem nejsou tedy účinné ve smyslu efektivní fotogenerace $O_2(^1\Delta_g)$. Naopak externě, pevně iontově vázaný tetrakationový TMPyP (podobně aniontový fotosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin, na anexových nanovláčkách¹¹¹) efektivně fotogeneruje $O_2(^1\Delta_g)$. To bylo potvrzeno nejen přímou detekcí fosforescence $O_2(^1\Delta_g)$ a fotooxidací externích chemických substrátů, ale i silným světlem indukovaným antibakteriálním efektem vůči bakteriích *Escherichia coli*.

Externě vázaný TMPyP produkuje $O_2(^1\Delta_g)$ s významně kratší dobou života (0,7 μs) v porovnání s TPP enkapsulovaným v polystyrenových nanovláčkách (13,5 μs). Oba typy materiálu však vykazují zhruba srovnatelnou efektivitu fotooxidace. Kratší doby života $O_2(^1\Delta_g)$ jsou kompenzovány kratší potřebnou difúzní dráhou $O_2(^1\Delta_g)$ k cílové molekule/biologickému terči, a lepší smáčivostí povrchu a tím i kontaktem s vodným prostředím. Projevit se může i o dva řády lepší difúze kyslíku ve vodě ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ při 25 °C)¹¹² oproti polystyrenovým nanovláčkám ($2,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)⁹³.

Povrchově vázaný fotosensitizer je oproti enkapsulovanému daleko méně chráněn před vlivem okolí na jeho fotofyzikální vlastnosti (např. zhášení excitovaných stavů), ale v kombinaci s katexovou nanovláčkovou maticí představuje zajímavý fotoaktivní multifunkční materiál, kde vedle generace $O_2(^1\Delta_g)$, je možné využít i jeho katexové funkcionality pro řadu aplikací. Např. vázaní biologicky aktivních látek s pozvolným uvolňováním nebo vychytávání těžkých kovů kontaminujících životní prostředí atd.

Další možnou cestou pro zvýšení účinnosti fotooxidace a antibakteriálních vlastností polystyrenových nanovláčkových materiálů je zvýšení smáčivosti jejich povrchů. To umožní lepší kontakt povrchů těchto materiálů, generujících $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkou difúzní dráhou, s vodným prostředím.

Popsány byly celkem tři modifikace (sulfonace, aplikace studené plazmy a tenká vrstva PDA), které významně zvyšují smáčivost hydrofobního polystyrenového povrchu. Žádná z těchto modifikací nepoškozuje nanovláčkovou strukturu, nezpůsobuje vymývání enkapsulovaného fotosensitizeru (TPP), ani změnu v jeho spektrálních charakteristikách. Sulfonace i studená plazma způsobily významné zvýšení efektivnosti fotooxidace i fotoinaktivace bakterií.

O něco menší zvýšení efektivnosti fotooxidace u modifikace PDA je dáno nižší transparentností této vrstvy. Výsledky potvrzují zásadní roly smáčivosti materiálů generujících singletový kyslík nebo jiné částice s krátkou difúzní dráhou na výsledný antibakteriální efekt.

Byl pozorován významný vliv teploty na účinnost fotooxidace a antibakteriálních vlastností připravených nanovlákných materiálů s enkapsulovaným či externě vázaným porfyrinovým fotosensitizerem. Teplota má zásadní vliv na fotofyzikální parametry fotosensitizeru (doby života jeho tripletových stavů), a na vlastnosti jeho okolí (např. je ovlivněna difúze/permeabilita pro kyslík v polymerech a nezářivá deaktivace $O_2(^1\Delta_g)$ polymerem a rozpouštědlem. Fotofyzikální data, především rostoucí kyslíkový difúzní koeficient s rostoucí teplotou, odpovídají rostoucí antibakteriální účinnosti PS nanovlákných membrán s enkapsulovaným TPP. Na tyto materiály lze též pohlížet tak, že jejich aktivita/funkcionalita je spouštěná nejen světlem, ale i teplem (např. pro medicínské aplikace přiložením na kůži pacienta).

Materiály s externě vázaným fotosensitizerem nebo fotosensitizerem chráněným uvnitř smáčivých transparentních polymerních vláken s dobrou permeabilitou pro kyslík podpořenou zvýšenou teplotou, se dále pro maximální fotooxidační / antibakteriální efekt dají zlepšit zvyšováním absorbovaného kvanta světla vyšší koncentrací fotosensitizeru či kombinací různých fotosensitizerů využívajících širší absorpční spektrum. Koncentrace je ale shora omezená tvorbou agregovaných částic. Agregace při vyšších koncentracích způsobuje zhášení excitovaných stavů fotosensitizeru, a tedy zásadně omezuje fotosensitizovanou reakci. Vyšší koncentrace také způsobuje stínící efekt (jedna molekula fotosensitizeru stíní druhou) snižující absorbovaná kvanta. Různé fotosensitizerů navíc mohou vytvářet konjugované systémy, kde např. přenos náboje může snížit efektivitu fotosensitizované reakce.

Žádná modifikace nanovlákného materiálu ale neovlivní krátkou difúzní dráhu $O_2(^1\Delta_g)$ ve vodném prostředí danou krátkou dobou jeho života. Proto, jak již bylo uvedeno, je fotooxidační/antimikrobiální efekt vázán jen na bezprostřední okolí povrchu nanovlákného materiálu. Tyto materiály ale mohou být doplněny o další látky rozšiřující jejich funkcionalitu. Například nanovlákný materiál s externě vázaným TMPyP může být doplněn kovaletně vázaným NO-fotodonorem uvolňující NO radikál, který má antibakteriální a vazodilatační efekt s delší dobou života a aktivní zónou působení.¹¹³

Další cestou je zcela opustit koncept nanovlákné struktury jako nosiče fotosensitizeru. Pro zachování výhod transparentního PS obalu byly proto připraveny NPs s enkapsulovaným TPP. Tyto NPs mají průměr 30 ± 10 nm, tedy menší než je difúzní dráha $O_2(^1\Delta_g)$ v polystyrenu (cca 45 nm)¹⁰⁰. To umožňuje $O_2(^1\Delta_g)$ difundovat z celého objemu NPs do vnějšího roztoku. Při ozáření viditelným světlem NPs velmi efektivně inaktivují bakterie i viry fotogenerovaným $O_2(^1\Delta_g)$ v celém ozařovaném objemu. PS nanočástice mají dobrou

biokompatibilitu a nízkou toxicitu oproti běžně používaným stříbrným nanočásticím.^{114,115,116} V porovnání s nimi mají navíc i další výhodu. Díky hustotě PS (podobné hustotě vody) a vysoké hustotě povrchového náboje jsou PS nanočástice s enkapsulovaným fotosensitizerem extrémně stabilní. Neagregují ani nesedimentují (v řádu měsíců) a jsou tedy velmi perspektivními antimikrobiálními nanomateriály, které jsou aktivovány viditelným světlem.

6 ZÁVĚRY

Při řešení této práce bylo zjištěno následující:

- Nanovláknenné polystyrenové materiály (např. ve formě membrány) sulfonované chlorsulfonovou kyselinou jsou vhodnými substráty pro adsorpci kationtových fotosensitizerů. V důsledku chlorsulfonace, zesíťováním polystyrenových nanovláken, získají tyto materiály odolnost vůči organickým rozpouštědlům.
- Iontová vazba kationtového fotosensitizeru jako je např. TMPyP na záporně nabitě povrchy nanovláknenných materiálů zabraňuje jeho světlem indukované agregaci. Povrchy nanovláknenných materiálů i s navázaným TMPyP poskytují dostatečnou iontově výměnou kapacitu pro vycytávání další kationtů z vodných roztoků.
- Množství navázaného TMPyP ovlivňuje jeho spektrální charakteristiky v důsledku rozdílného vystavení molekul fotosensitizeru vnějšímu prostředí. Navázání optimálního množství TMPyP lze monitorovat pomocí fluorescence.
- Externě vázaný TMPyP na povrch nanovláknenných materiálů efektivně fotogeneruje $O_2(^1\Delta_g)$. Připravené materiály jsou tak při vystavení viditelnému světlu samosterilizující. Ačkoliv má generovaný $O_2(^1\Delta_g)$ nižší doby života ($\tau_\Delta = 0,7 \mu s$) než u nanovláknenných polystyrenových materiálů s enkapsulovaným fotosensitizerem ($\tau_\Delta = 13,5 \mu s$), je srovnatelně efektivní pro fotooxidaci chemických substrátů. To je dáno lepším kontaktem s roztokem substrátu a kratší potřebnou difuzní dráhou $O_2(^1\Delta_g)$ k substrátu.
- Byl demonstrován zásadní vliv smáčivosti materiálů produkujících $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkou difuzní dráhou a byly optimalizovány tři metody pro dosažení hydrofilního/smáčivého povrchu.
- Sulfonace, aplikace studené plazmy nebo pokrytí PDA filmem vytváří smáčivý povrch na hydrofobních polystyrenovým nanovláknenných membránách s enkapsulovaným

hydrofobním fotosensitizerem, jako je např. TPP. Tím se výrazně zvýší fotooxidační a antibakteriální účinek materiálů. Zároveň je zachován nanovlákněný charakter materiálů, umožňující účinný bakteriální záchyt.

- Povrch nanovlákněného materiálu modifikovaný studenou plazmou vykazuje menší hodnoty zdánlivého kontaktního úhlu a neztrácí (v řádu měsíců) získanou hydrofilicitu/smáčivost v porovnání s jinými publikovanými materiály, které byly povrchově modifikované touto metodou.
- Sulfonovaný a studenou plazmou modifikovaný polystyrenový nanovlákněný materiál je, pro své silné antibakteriální vlastnosti a schopnost zachytávat bakterie na svém povrchu, perspektivním materiálem pro medicínské aplikace.
- Zvýšení teploty vede ke zvýšení difúze kyslíku v polymerních nanovlákněch. To se projeví v kratších dobách života tripletových stavů fotosensitizeru (τ_T), kratších dobách života $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_Δ) a zesílenému signálu SODF především u fotosensitizerů enkapsulovaných v nanovlákněch (TPP). Teplota nemá vliv na kvantový výtěžek tripletových stavů (Φ_T) nebo $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ). Vliv teploty je mnohem nižší u nanovlákněných materiálů s externě vázaným fotosensitizerem (TMPyP).
- U polystyrenového nanovlákněného materiálu s TPP, jehož povrch byl modifikován studenou plazmou, bylo demonstrováno, že světlem iniciovaný antibakteriální účinek materiálu roste s teplotou.
- Měření SODF je vhodnou metodou pro měření $^1\Delta_g$ u $O_2(^1\Delta_g)$ generovaného v polymerních nanovlákněch. Zvýšený signál SODF při vyšší teplotě je způsoben zvýšením kyslíkové difúze polymeru.
- Byly připraveny stabilní polystyrenové nanočástice novou, jednoduchou, „top-down“ metodou, z intenzivně sulfonovaných polystyrenových nanovlákněných membrán s TPP.
- Připravené nanočástice (30 ± 10 nm) s TPP jsou díky svému rozměru velmi efektivními producenty $O_2(^1\Delta_g)$ a hodí se ke sterilizaci vodných roztoků. Při ozařování

viditelným světlem vykazují silné antibakteriální a antivirové vlastnosti. Temná toxicita u nich nebyla nalezena.

- Nanočástice s Pt-OEP lze použít jako citlivé luminiscenční sensory pro detekci rozpuštěného kyslíku ve vodných roztocích v celém rozsahu kyslíkových koncentrací.
- Polyuretanové nanovláknenné membrány mohou být aplikovány jako účinné filtry k odstraňování bakterií a nanočástic z vodných roztoků.

7 PODÍL PŘEDKLADATELE NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

1. Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

- Optimalizace sulfonace nanovláknových vrstev
- Vyhodnocení SEM snímků (průměry vláken)
- Stanovení IEC sulfonovaných materiálů
- Sledování kinetiky adsorpce a vliv množství nasorbovaného TMPyPu na jeho spektrální charakteristiky, také sledování změn v čase (absorpční, emisní a excitační spektra)
- Stanovení adsorpčních izotherm: Pb²⁺ pomocí atomové absorpční spektroskopie, I₃⁻ a Γ pomocí Uv/vis spektroskopie
- Měření infračervených spekter
- Malý podíl na měření některých fotofyzikálních dat (SODF, ¹O₂ fosforescence)
- Fotooxidační studie (jodidové činidlo, kyselina močová)
- Antibakteriální testy
- Podíl na sepisování publikace

2. Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating O₂(¹Δ_g): Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

- Optimalizace modifikací sulfonace a polydopamin coatingu
- Podíl na měření zdánlivých úhlů smáčivosti
- Měření absorpčních, emisních a excitačních spekter
- Měření a vyhodnocování fotofyzikálních dat (SODF, ¹O₂ fosforescence, kinetika tripletů)

- Fotooxidační studie (jodidové činidlo, kyselina močová)
 - Srovnávací antibakteriální testy a jejich optimalizace
 - Podíl na sepisování publikace
3. Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174. (IF₂₀₁₅ = 3,187)
- Srovnávací antibakteriální testy a jejich optimalizace
 - Měření absorpčních spekter
 - Podíl na sepisování publikace
4. Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127-25136. (IF₂₀₁₅ = 7,145)
- Příprava nanočástic a její optimalizace
 - Gravimetrické stanovení množství nanočástic
 - Měření absorpčních, emisních a excitačních spekter
 - Stanovení IEC
 - Fotooxidační studie (jodidové činidlo, kyselina močová)
 - Antibakteriální testy a jejich optimalizace
 - Stanovení koncentrace kyslíku v roztoku a přidružené experimenty s NPs Pt-OEP (odezva a reprodukovatelnost)
 - Podíl na sepisování publikace

8 SEZNAM ZKRATEK

ROS	„ R eactive O xxygen S pecies“ reaktivní kyslíkové částice
$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$\text{O}_2(^1\Delta_g)$	nejnižší excitovaný stav molekulárního kyslíku
$\text{O}_2(^1\Sigma_g^+)$	energeticky bohatší forma singletového kyslíku
$\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$	kyslík v základním tripletovém stavu
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoxidový anion radikál
EET	„ E lectronic E nergy- T ransfer“ elektronovým přenos energie
IC	„ I nternal C onversion“, vnitřní konverze
ISC	„ I nter S ystem C rossing“, mezisystémový přechod
CT	„ C harge T ransfer“ přenos náboje
τ_Δ	doby života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$
S_0	fotosensitizer v základním singletovém stavu
S_1	fotosensitizer v nejnižším excitovaném singletovém stavu
S_n	vyšší excitované singletové stavy fotosensitizeru
T_1	fotosensitizer v nejnižším excitovaném tripletovém stavu
$h\nu_p$	fosforescence
$h\nu_f$	fluorescence
Φ_T	kvantové výtěžky tripletových stavů fotosensitizeru
τ_T	doby života T_1 stavu fotosensitizeru
Φ_Δ	kvantovým výtěžek $\text{O}_2(^1\Delta_g)$
$h\nu$	světelné kvantum
PDT	„ P hoto D ynamic T herapy“ fotodynamická terapie
PDI	„ P hoto D ynamic I nactivation“ fotodynamická inaktivace
PS	polystyren
PUR	polyuretan
TMPyP	(5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin
TPP	5,10,15,20- <i>meso</i> -tetrafenylporfyrin
IEC	„ I ont E xchange C apacity“ iontová výměnná kapacita
SEM	S canning E lectron M icroscopy“ skenovací elektronová mikroskopie
SODF	„ S inglet O xxygen D elayed F luorescence“ zpožděná fluorescence

NPs	nanočástice
Pt-OEP	platnatým oktaethylporfyrinem
CFU	„Colony Forming Units“ počet bakteriálních kolonií
TPPS	5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatofenyl)porfyrin
SOSG	„Singlet Oxygen Sensor Green“
DMAX	6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3H-xanthen-3-on
EPR	elektronové paramagnetické rezonance ()
TRTL	„Time Resolving Thermal Lensing“
LIOAS	„Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy“ (,)
A_{SO}	parametr, který je závislý na kvantových výtěžcích $O_2(^1\Delta_g)$
$[^3P]_0$	koncentrace tripletových stavů porfyrinu v čase t_0 po excitaci a ISC
$[^3P]$	koncentrace tripletových stavů porfyrinu v čase t
PACT	Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy“
CALI	„Chromophore-Assisted Light Inactivation“
ACA	„Apparent Contact Angle“ zdánlivý kontaktní úhel

9 PŘEHLED PUBLIKACÍ PŘEDKLADATELE

9.1 ZAHRNUTÉ PUBLIKACE

- I. **Henke P.**, Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783. (IF₂₀₁₅ = 7,145)
- II. **Henke P.**, Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating O₂(¹Δ_g): Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014. (IF₂₀₁₅ = 7,145)
- III. Suchanek J., **Henke P.**, Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174. (IF₂₀₁₅ = 3,187)
- IV. **Henke P.**, Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127–25136. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

9.2 OSTATNÍ PUBLIKACE

- V. Plíštil L., **Henke P.**, Kubát P., Mosinger J.: Anion Exchange Nanofiber Materials Activated by Daylight with a Dual Antibacterial Effect; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 1321–1329. (IF₂₀₁₅ = 2,235)
- VI. Dolanský J., **Henke P.**, Kubát P., Fraix A., Sortino S., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O₂(¹Δ_g); *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 22980–22989. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

10 PŘÍLOHY

10.1 PUBLIKACE I

Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

10.2 PUBLIKACE II

Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $O_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

10.3 PUBLIKACE III

Suchanek J., **Henke P.**, Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174. (IF₂₀₁₅ = 3,187)

10.4 PUBLIKACE IV

Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127-25136. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Dostupné z <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (31.1.2017)
- ² Magill S.S., Edwards JR., Bamberg W., Beldavs ZG., Dumyati G., Kainer Ma., Lynfield R., Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J., Ray SM., Thompson DL., Wilson LE., Fridkin SK.: Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections; *N Engl J Med* **2014**, 370, 1198–1208.
- ³ Chen L., Todd R., Kiehlbauch J., Walters M., Kallen A.: Notes from the field: pan-resistant New Delhi metallo-beta-lactamase-producing klebsiella pneumoniae — Washoe County, Nevada 2016; *Morb Mortal Wkly Rep* **2017**, 66, 33–33.
- ⁴ Halliwell B.: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?; *J. Neurochem.* **2006**, 97, 1634–1658.
- ⁵ Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44–84
- ⁶ Krumova K, Cosa G.: Overview of reactive oxygen species; In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 1, s. 1–21.
- ⁷ Wagnerová, DM.: Classification of dioxygen reactions: A unifying view; *Z. Phys. Chemie-Int. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 215, 133–138.
- ⁸ Weldon D., Poulsen TD., Mikkelsen KV., Ogilby PR.: Singlet sigma: The "other" singlet oxygen in solution; *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 369–379.
- ⁹ Conn PF., Schalch W., Truscott TG.: The singlet oxygen and carotenoid interaction; *J. Photochem. Photobiol. B* **1991**, 11, 41–47.
- ¹⁰ Schmidt R.: Deactivation of O₂(¹Δg) Singlet Oxygen by Carotenoids: Internal Conversion of Excited Encounter Complexes; *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 5509–5513.
- ¹¹ Lancaster JR., Martí AA., López-Gejo J., Jockusch S., O'Connor N., Turro NJ.: Nonradiative Deactivation of Singlet Oxygen (¹O₂) by Cubane and Its Derivatives; *Org. Lett.* **2008**, 10, 5509–5512.

-
- ¹² Schweitzer C., Schmidt R.: Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen; *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1685–1758.
- ¹³ Hurst JR., Schuster GB.: Nonradiative relaxation of singlet oxygen in solution *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5756–5760.
- ¹⁴ Scurlock RD., Nonell S., Braslavsky SE., Ogilby PR.: Effect of Solvent on the Radiative Decay of Singlet Molecular Oxygen ($a^1\Delta_g$); *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 3521–3526.
- ¹⁵ Schmidt R., Bodesheim M.: Collision-induced radiative transitions $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow a^1\Delta_g$, $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow X^3\Sigma_g^-$, and $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ of O_2 ; *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 15919–15924.
- ¹⁶ Bregnhøj M., Ogilby PR.: Effect of Solvent on the $O_2(a^1\Delta_g) \rightarrow O_2(b^1\Sigma_g^+)$ Absorption Coefficient; *J. Phys. Chem. A*, **2015**, 119, 9236–9243.
- ¹⁷ Jensen RL., Holmegaard L., Ogilby PR.: Temperature effect on radiative lifetimes: the case of singlet oxygen in liquid solvents *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 16227–16235.
- ¹⁸ Boix-Garriga E., Rodríguez-Amigo B., Planas O., Nonell S.: Properties of oxygen species; In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 1, s. 23–46.
- ¹⁹ Foote CS., Wexler S., Ando W., Higgins R.: Chemistry of singlet oxygen. IV. oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 975–981.
- ²⁰ Aubry J.M., Cazin B., Duprat F.: Chemical sources of singlet oxygen. 3. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with the hydrogen peroxide-molybdate system; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 726–728.
- ²¹ Aubry JM., Cazin B.: Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions; *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 2013–2014.
- ²² Emsenhuber M., Pöchlauser P., Aubry JM., Nardello V., Falk H.: Evidence for the Generation of Singlet Oxygen (1O_2 , $^1\Delta_g$) from Ozone Promoted by Inorganic Salts; *Monatsh. Chem.* **2003**, 134, 387–391.
- ²³ Tarr M., Valenzeno DP.: Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 355–361.
- ²⁴ Pierlot C., Nardello V., Schrive J., Mabilille C., Barbillat J., Sombret B., Aubry JM.: Calcium peroxide diperoxohydrate as a storable chemical generator of singlet oxygen for organic synthesis; *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2418–2423.

-
- ²⁵ Aubry JM., Pierlot C., Rigaudy J., Schmidt.: Reversible binding of oxygen to aromatic compounds; *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 668–675.
- ²⁶ Günther GS., Lemp EM., Zanooco AL.: Determination of chemical rate constants in singlet molecular oxygen reactions by using 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide; *J. Photochem. Photobiol. A* **2002**, 151, 1–5.
- ²⁷ Rabek JF., Rånby B.: Studies on the photooxidation mechanism of polymers. V. Oxidation of polybutadienes by singlet oxygen from microwave discharge and in dye-photosensitized reactions; *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1976**, 14, 1463–1473.
- ²⁸ Slinger TG., Copeland RA.: Energetic oxygen in the upper atmosphere and the laboratory; *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4731–4765.
- ²⁹ Tarr M., Valenzeno DP.: Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 355–361.
- ³⁰ Krasnovsky AA.: Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research; *Biokhim., Biochem. (Mosc.)* **2007**, 72, 1311–1329.
- ³¹ Lang K., Mosinger J., Wagnerová DM.: Photophysical Properties of Porphyrinoid Sensitizers Noncovalently Bound to Host Molecules; Models for Photodynamic Therapy; *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 321–350.
- ³² Kanofsky.: Photosensitization; In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 1, s. 93–103.
- ³³ Gijzeman OLJ., Kaufman F., Porter G.: Oxygen quenching of aromatic triplet states in solution; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1973**, 69, 708–720.
- ³⁴ Garner A., Wilkinson F.: Quenching of triplet states by molecular oxygen and the role of charge-transfer interactions; *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 45, 432–435.
- ³⁵ Gerischer H., Heller A.: The role of oxygen in photooxidation of organic-molecules on semiconductor particles; *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 5261–5267.
- ³⁶ Schmidt R.: Photosensitized Generation of Singlet Oxygen; *Photochem Photobiol.* **2006** 82, 1161–1177.

-
- ³⁷ Wu KC., Trozzolo AM.: Production of singlet molecular oxygen from the oxygen quenching of the lowest excited singlet state of rubrene; *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 2823–2826.
- ³⁸ Kirakci K., Kubát P., Fejfarová K., Martinčík J., Nikl M., Lang K.: X-ray inducible luminescence and singlet oxygen sensitization by an octahedral molybdenum cluster compound: A new class of nanoscintillators *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 803–809.
- ³⁹ Chadwick SJ., Salah D., Livesey PM., Brust M., Volk M.: Singlet Oxygen generation by laser irradiation of gold nanoparticles; *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 10647–10657.
- ⁴⁰ Kovalev D., Fujii M.: Silicon Nanocrystals: Photosensitizers for Oxygen Molecules; *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2531–2544.
- ⁴¹ Wilkinson F., Helman P., Ross AB.: Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution; *Chem. Ref. Data* **1993**, 22, 113–262.
- ⁴² Clennan EL., Pace A.: Advances in singlet oxygen chemistry; *Tetrahedron* **2005**, 61, 6665–6691.
- ⁴³ Clennan EL.: New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry; *Tetrahedron* **2000**, 56, 9151–9179.
- ⁴⁴ Sevin F., McKee ML.: Reactions of 1,3-Cyclohexadiene with Singlet Oxygen. A Theoretical Study; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4591–4600.
- ⁴⁵ Agostinis P., Berg K., Cengel KA., Foster TH., Girotti AW., Gollnick SO., Hahn SM., Hamblin MR., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson BC., Golab J.: Photodynamic therapy of cancer: An update; *Ca-Cancer J. Clin.* **2011**, 61, 250–281.
- ⁴⁶ Fischer F., Grasczew G., Sinn HJ., Maier-Borst W., Lorenz WJ., Schlag PM.: A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers; *Clin Chim Acta.* **1998**, 274, 89–104.
- ⁴⁷ Reddi E., Valduga G., Rodgers MA., Jori G.: Studies on the mechanism of the hematoporphyrin-sensitized photooxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran in ethanol and unilamellar liposomes; *Photochem Photobiol.* **1991**, 54, 633–637.
- ⁴⁸ Kreitner M., Ebermann R., Alth G.: Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, 36, 109–111.

-
- ⁴⁹ González RR., Zanocco AL.: Singlet oxygen fluorescent probes; In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 2, s. 103–120.
- ⁵⁰ Kálai T., Hideg É., Vass I. Hideg K.: Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane; *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 24, 649–652.
- ⁵¹ Kim S., Fujitsuka M., Majima TJ.: Photochemistry of singlet oxygen sensor green; *Phys Chem B.* **2013**, 117, 13985–13992.
- ⁵² Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T.: Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen; *J Am Chem Soc.* **2001**, 123, 2530–2536.
- ⁵³ Mosinger J., Mosinger B.: Photodynamic sensitizers assay – rapid and sensitive iodometric measurement; *Experientia* **1995**, 51, 106–109.
- ⁵⁴ Hideg E., Máta A., Bognár B., Kálai T.: EPR detection (spin probes); In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 2, s. 121–134.
- ⁵⁵ Redmond RW., Braslavsky SE.: Time-resolved thermal lensing and phosphorescence studies on photosensitized singlet molecular oxygen formation. Influence of the electronic configuration of the sensitizer on sensitization efficiency; *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 148, 523–529.
- ⁵⁶ Pineiro M., Carvalho AL., Pereira MM., Gonsalves AMd'AR., Arnaut LG., Formosinho SJ.: Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies; *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2299–2307.
- ⁵⁷ Hasebe N., Suzuki K., Horiuchi H., Suzuki H., Yoshihara T., Okutsu T., Tobita S.: Absolute phosphorescence quantum yields of singlet molecular oxygen in solution determined using an integrating sphere instrument; *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2360–2366.
- ⁵⁸ Ghogare AA., Greer A.: Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs; *Chem. Rev.* **2016**, 116, 9994–10034.
- ⁵⁹ Alsters PL., Jary W., Nardello-Rataj V., Aubry JM.: “Dark” Singlet Oxygenation of β -Citronellol: A Key Step in the Manufacture of Rose Oxide; *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14, 259–262.

-
- ⁶⁰ Blázquez-Castro A., Breitenbach T., Ogilby P. R.; Singlet Oxygen and ROS in a New Light: Low-dose Subcellular Photodynamic Treatment Enhances Proliferation at the Single Cell Level; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 1235–1240.
- ⁶¹ Jacobson K., Rajfur Z., Vitriol E., Hahn K.: Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology; *Trends Cell Biol.* **2008**, 18, 443–450.
- ⁶² Tour O., Meijer RM., Zacharias DA., Adams SR., Tsien RY.: Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation; *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1505–1508.
- ⁶³ Castano AP., Demidova TN., Hamblin MR.: Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization; *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* **2004**, 1, 279–293.
- ⁶⁴ Chatterjee DK., Fong LS., Zhang Y.: Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1627–1637.
- ⁶⁵ Dougherty TJ., Gomer CJ., Henderson BW., Jori G., Kessel D., Korbely M., Moan J., Peng Q.: Photodynamic therapy *JNCI-J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90, 889–905.
- ⁶⁶ Maish T., Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria; *J Photochem Photobiol B.* **2015**, 150, 2–10.
- ⁶⁷ Spagnul C., Turner LC., Boyle RW.: Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications; *J Photochem Photobiol B.* **2015**, 150, 11–30.
- ⁶⁸ Jiang L., Gan CR., Gao J., Loh XJ.: A Perspective on the Trends and Challenges Facing Porphyrin-Based Anti-Microbial Materials; *Small.* **2016**, 12, 3609–3644.
- ⁶⁹ MacDonald IJ., Dougherty TJ.: Basic principles of photodynamic therapy; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, 05, 105–129.
- ⁷⁰ Jori G., Rapozzi V.: Photodynamic therapy; In: *Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences* Nonell S., Flors C. (ed) The Royal Society of Chemistry, London **2016**, vol. 2, s. 279–304.
- ⁷¹ Jori G., Brown SB.: Photosensitized inactivation of microorganisms; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 403–405.
- ⁷² Séguier S., Souza SL., Sverzut AC., Simioni AR., Primo FL., Bodineau A., Corrêa VM., Coulomb B., Tedesco AC.: Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis; *J Photochem Photobiol B.* **2010**, 101, 348–354.

-
- ⁷³ Arenbergerova M., Arenberger P., Bednar M., Kubat P., Mosinger J.: Light-activated nanofibre textiles exert antibacterial effects in the setting of chronic wound healing; *Exp. Dermatol.* **2012**, 21, 619–624.
- ⁷⁴ Alvesa E., Faustino MAF., Neves MGPMS., Cunha A., Nadaisc H., Almeida A.: Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope; *J. Photochem. Photobiol. C* **2015**, 22, 34–57.
- ⁷⁵ Amor BT., Jori G.: Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity; *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 30, 915–925.
- ⁷⁶ Wahlen, J., De Vos DE., Jacobs, PA., Alsters, PL.: Solid Materials as Sources for Synthetically Useful Singlet Oxygen; *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 152–164.
- ⁷⁷ Qiao XF., Zhou JC., Xiao JW., Wang YF., Sun LD., Yan CH.: Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro; *Nanoscale* **2012**, 4, 4611–4623.
- ⁷⁸ Vinodgopal K., Hua X., Dahlgren RL., Lappin AG., Patterson LK., Kamat PV.: Photochemistry of $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})^{2+}$ on Al_2O_3 and TiO_2 Surfaces. An Insight into the Mechanism of Photosensitization; *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 10883–10889.
- ⁷⁹ Lang K., Bezdička P., Bourdelande JL., Hernando J., Jirka I., Kafuňková I., Kovanda F., Kubát P., Mosinger J., Wagnerová DM.: Layered Double Hydroxides with Intercalated Porphyrins as Photofunctional Materials: Subtle Structural Changes Modify Singlet Oxygen Production; *Chem. Mater.* **2007**, 19, 3822–3829.
- ⁸⁰ Avelino C., Hermenegildo G.: Zeolite-based photocatalysts *Chem. Commun.* **2004**, 1443–1459.
- ⁸¹ Felgenträger A., Maisch T., Späth A., Schröder JA., Bäuml W.: Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 20598–20607.
- ⁸² Clennan EL., Pace A.: Advances in singlet oxygen chemistry; *Tetrahedron* **2005**, 61, 6665–6691.
- ⁸³ Griesbeck AG., Bartoschek A., Neudörfl J., Miara C.: Stereoselectivity in Ene Reactions with $^1\text{O}_2$: Matrix Effects in Polymer Supports, Photo-oxygenation of Organic Salts and Asymmetric Synthesis; *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 1233–1240.

-
- ⁸⁴ Pimenta FM., Jensen RL., Holmegaard L., Esipova TV., Westberg M., Breitenbach T., Ogilby PR.: Singlet-oxygen-mediated cell death using spatially-localized two-photon excitation of an extracellular sensitizer; *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 10234–10246.
- ⁸⁵ Gonçalves ES., Ogilby PR.: “Inside” vs “Outside” photooxygenation reactions: singlet-oxygen-mediated surface passivation of polymer films; *Langmuir* **2008**, 24, 9056–9065.
- ⁸⁶ Kenawy ER., Bowlin GL., Mansfield K., Layman J., Simpson DG., Sanders EH., Wnek GE.: Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend; *J. Control. Release*. **2002**, 81, 57–64.
- ⁸⁷ Martins A., Chung S., Pedro AJ., Sousa RA., Marques AP., Reis RL., Neves, NM.: Hierarchical starch-based fibrous scaffold for bone tissue engineering applications; *J Tissue Eng Regen Med* **2009**, 3, 37–42.
- ⁸⁸ Ma ZW., Kotaki M., Ramakrishna S.: Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane; *J. Membr. Sci.* 2006, 272, 179–187.
- ⁸⁹ Lim HS., Park SH., Koo SH., Kwark Y., Thomas EL., Jeong Y., Cho JH.; Superamphiphilic Janus Fabric; *Langmuir* **2010**, 26, 19159–19162.
- ⁹⁰ Yoshimoto H., Shina YM., Teraia H., Vacantia JP.: A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering; *Biomaterials*, **2003**, 24, 2077–2082.
- ⁹¹ Mosinger J., Jirsak O. Kubat P., Lang K., Mosinger B.; Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen; *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 164–166.
- ⁹² Mosinger J., Lang K., Kubat P., Sýkora J., Hof M., Plíštil L., Mosinger B.: Photofunctional Polyurethane Nanofabrics Doped by Zinc Tetraphenylporphyrin and Zinc Phthalocyanine Photosensitizers; *J. Fluoresc.* **2009**, 19, 705–713.
- ⁹³ Jesenská S., Plíštil L., Kubat P., Lang K., Brožová L., Popelka S., Szatmáry L., Mosinger J.: Antibacterial nanofiber materials activated by light; *J Biomed Mater Res A*. **2011**, 99, 676–683.
- ⁹⁴ Murphy ST., Kondo K., Foote CS.: Singlet-Oxygen-Sensitized Delayed Fluorescence: Direct Detection of Triplet Phthalocyanine as an Intermediate; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3751–3755.

-
- ⁹⁵ Mosinger J., Lang K., Plíštil L., Jesenská S., Hostomský J., Zelinger Z., Kubát P.: Fluorescent polyurethane nanofabrics: a source of singlet oxygen and oxygen sensing; *Langmuir* **2010**, 26, 10050–10056.
- ⁹⁶ Mosinger J., Lang K., Hostomsky J., Franc J., Sykora J., Hof M., Kubat P.: Singlet Oxygen Imaging in Polymeric Nanofibers by Delayed Fluorescence; *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 15773–15779
- ⁹⁷ Lhotáková Y., Plíštil L., Morávková A., Kubát P., Lang K., Forstová J., Mosinger J.: Virucidal Nanofiber Textiles Based on Photosensitized Production of Singlet Oxygen; *PLoS One* **2012**, 7, 49226–49226.
- ⁹⁸ Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783.
- ⁹⁹ Gonçalves PJ., Franzen PL., Correa DS., Almeida LM., Takara M., Ito AS., Zilio SC., Borissevitch IE.: Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP); *Spectrochim. Acta A* 2011, 79, 1532–1539.
- ¹⁰⁰ Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $O_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014.
- ¹⁰¹ Chai J., Lu F.; Li B., Kwok DY.: Wettability Interpretation of Oxygen Plasma Modified Poly(methyl methacrylate); *Langmuir* **2004**, 20, 10919–10927.
- ¹⁰² Vesel A.: Modification of Polystyrene with a Highly Reactive Cold Oxygen Plasma; *Surf. Coat. Technol.* **2010**, 205, 490–497.
- ¹⁰³ Vesel A., Junkar I., Cvelbar U., Kovac J., Mozetic M.: Surface Modification of Polyester by Oxygen- and Nitrogen-Plasma Treatment. *Surf. Interface Anal.* **2008**, 40, 1444–1453.
- ¹⁰⁴ Liebscher J., Mrowczynski R., Scheidt HA., Filip C., Hadade ND., Turcu R., Bende A., Beck S.: Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story?; *Langmuir* **2013**, 29, 10539–10548.
- ¹⁰⁵ Lim HS., Park SH., Koo SH., Kwark YJ., Thomas E L., Jeong Y., Cho JH.: Superamphiphilic Janus Fabric; *Langmuir* **2010**, 26, 19159–19162.
- ¹⁰⁶ Iqbal Z., Lai EPC., Avis TJ.: Antimicrobial Effect of Polydopamine Coating on *Escherichia Coli*; *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 21608–21612.

-
- ¹⁰⁷ Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174.
- ¹⁰⁸ Gao Y., Baca AM., Wang B., Ogilby PR.: Activation Barriers for Oxygen Diffusion in Polystyrene and Polycarbonate Glasses: Effects of Low Molecular Weight Additives Macromolecules; *Macromolecules* **1994**, 27, 7041–7048.
- ¹⁰⁹ Strocchi M., Ferrer M., Timmis KN., Golyshin, PN.: Low temperature-induced systems failure in Escherichia coli: Insights from rescue by cold-adapted chaperones; *Proteomics* **2006**, 6, 193–206.
- ¹¹⁰ Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127–25136.
- ¹¹¹ Plíštil L., Henke P., Kubát P., Mosinger J.: Anion Exchange Nanofiber Materials Activated by Daylight with a Dual Antibacterial Effect; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 1321–1329.
- ¹¹² Han P., Bartels Dm.: Temperature Dependence of Oxygen Diffusion in H₂O and D₂O; *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5597–5602.
- ¹¹³ Dolanský J., Henke P., Kubát P., Fraix A., Sortino S., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O₂(¹Δ_g); *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 22980–22989.
- ¹¹⁴ Wolfbeis O S.: An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging; *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4743–4768.
- ¹¹⁵ Morones JR., Elechiguerra JL., Camacho A., Holt K., Kouri JB., Ramírez JT., Yacaman MJ.: The bactericidal effect of silver nanoparticles; *Nanotechnology* **2005**, 16, 2346–2353.
- ¹¹⁶ Richter AP., Brown JS., Bharti B., Wang A., Gangwal S., Houck K., Cohen Hubal EA., Paunov VN., Stoyanov SD., Velez OD.: An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core; *Nat. Nanotechnol.* **2015**, 10, 817–823.