

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



**Fotodynamický efekt enkapsulovaných
porfyrinových senzitizerů v tenkých
sol-gel maticích**

Diplomová práce

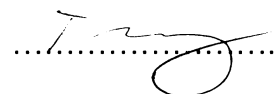
Praha 2006

Václav Tregler

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Mosingera, Ph.D. a že jsem všechnu použitou literaturu řádně citoval.

V Praze dne 31.srpna 2005

Václav Tregler

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tregler', written over a horizontal dotted line.

Úvodem bych především rád poděkoval svému školiteli RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za odborné vedení, veškerou podporu a mnoho cenných rad. Dále bych chtěl poděkovat garantu Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi, CSc. za příkladnou péči garanta o svého studenta. Také bych rád poděkoval Ing. Gabriele Kuncové, CSc. z ÚChP AV ČR za odborné rady v oblasti sol-gel chemie, RNDr. Pavlu Kubátovi, CSc. z ÚFCH AV ČR za pomoc při měření časově rozlišených spekter, ÚChP AV ČR za poskytnutí pracovního místa pro provádění buněčných pokusů. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem svým blízkým za podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 1.1. Fotodynamický efekt..... | 1 |
| 1.1.1. Podstata fotodynamické reakce..... | 1 |
| 1.1.2. Singletový kyslík | 3 |
| 1.1.3. Využití fotodynamické reakce | 6 |
| 1.2. Senzitivizátory | 8 |
| 1.2.1. Obecné vlastnosti porfyrinů | 8 |
| 1.2.2. Vlastnosti TPP | 10 |
| 1.2.3. Vlastnosti TMPyP | 12 |
| 1.3. Metoda sol – gel | 14 |
| 1.3.1. Základy metody sol-gel | 16 |
| 1.3.2. Imobilizace molekul metodou sol-gel | 18 |
| 2. CÍL PRÁCE..... | 21 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 22 |
| 3.1. Použité chemikálie..... | 22 |
| 3.2. Použité media a roztoky..... | 23 |
| 3.2.1. Příprava fyziologického roztoku | 23 |
| 3.2.2. Příprava zásobního roztoku TMPyP | 23 |
| 3.2.3. Příprava zásobního roztoku TPPS4..... | 23 |
| 3.2.4. Příprava zásobního roztoku TPP | 23 |
| 3.2.5. Příprava YPG média | 23 |
| 3.2.6. Příprava zásobního roztoku N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu | 23 |
| 3.2.7. Příprava zásobních roztoků histidinu a tryptofanu | 24 |
| 3.3. Použitý mikroorganismus..... | 24 |
| 3.4. Příprava kvasinek | 24 |
| 3.5. Použité metody | 25 |
| 3.5.1. Elektronová absorpční spektra | 25 |
| 3.5.2. Ozařování vzorků..... | 25 |
| 3.5.3. Práce s buňkami | 25 |
| 3.5.4. Jodidová metoda stanovení $^1\text{O}_2$ | 26 |
| 3.5.5. Metoda odbarvování N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.5.6. Měření fotofyzikálních vlastností..... | 27 |
| 3.5.6.1. Časově rozlišená spektra..... | 27 |
| 3.5.6.2. Doby života excitovaných tripletových stavů senzitizerů..... | 28 |
| 3.5.6.3. Doba života singletového kyslíku..... | 29 |
| 3.6. Imobilizace molekul metodou sol-gel..... | 30 |
| 3.6.1. Příprava a předpolymerace TMOS..... | 30 |
| 3.6.2. Příprava skleněných nosičů pro imobilizaci..... | 31 |
| 3.6.3. Příprava tetraethoxysilanových (TEOS) vrstev s TMPyP..... | 31 |
| 3.6.4. Příprava tetramethoxysilanových (TMOS) vrstev s TMPyP..... | 31 |
| 3.6.5. Příprava polydimethylsiloxanových (PDMS) vrstev s TPP..... | 32 |
| 3.7. Měření fotooxidačních vlastností..... | 33 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUSE..... | 34 |
| 4.1. Příprava matric..... | 34 |
| 4.1.1. Vlastnosti TMOS matric s imobilizovaným kationtovým porfyrinem..... | 34 |
| 4.1.2. Vliv imobilizace na elektronová absorpční spektra porfyrinů..... | 36 |
| 4.2. Fotofyzikální vlastnosti vrstev..... | 39 |
| 4.2.1. Časově rozlišená spektra..... | 40 |
| 4.2.2. Kinetika excitovaných tripletových stavů a singletového kyslíku..... | 41 |
| 4.3. Vliv matrice na agregaci porfyrinů..... | 43 |
| 4.4. Fotooxidační vlastnosti matrice TMOS s imobilizovaným TMPyP..... | 45 |
| 4.4.1. Fotooxidace I ⁻ | 45 |
| 4.4.2. Fotooxidace RNO v přítomnosti histidinu..... | 50 |
| 4.4.3. Fotooxidace tryptofanu..... | 51 |
| 4.5. Cytotoxické účinky TMOS matric s imobilizovaným TMPyP..... | 52 |
| 4.6. Cytotoxické účinky TMOS matric s imobilizovaným TMPyP v přítomnosti histidinu nebo tryptofanu..... | 54 |
| 5. ZÁVĚR..... | 57 |
| 6. SEZNAM LITERATURY..... | 59 |
| 7. SEZNAM ZKRATEK..... | 62 |

1. ÚVOD

1.1. Fotodynamický efekt

Fotosenzitivní reakce molekulového kyslíku našly v poslední době široké možnosti použití v biologii a medicíně. Kompletní pochopení těchto reakcí se stalo interdisciplinárním tématem, které sahá od fotofyziky přes fotochemii a fotobiologii až po fotomedicínu [1-3]. Tak zvaný fotodynamický efekt znamená oxidativní poškození biologického materiálu reaktivní formou kyslíku, generovaného fotodynamickou reakcí.

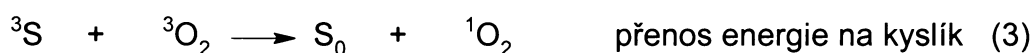
1.1.1. Podstata fotodynamické reakce

Fotodynamická reakce spočívá ve schopnosti tzv. fotodynamicky aktivního barviva (senzitivizátoru) zprostředkovat fotooxidaci nejrůznějších látek [4].

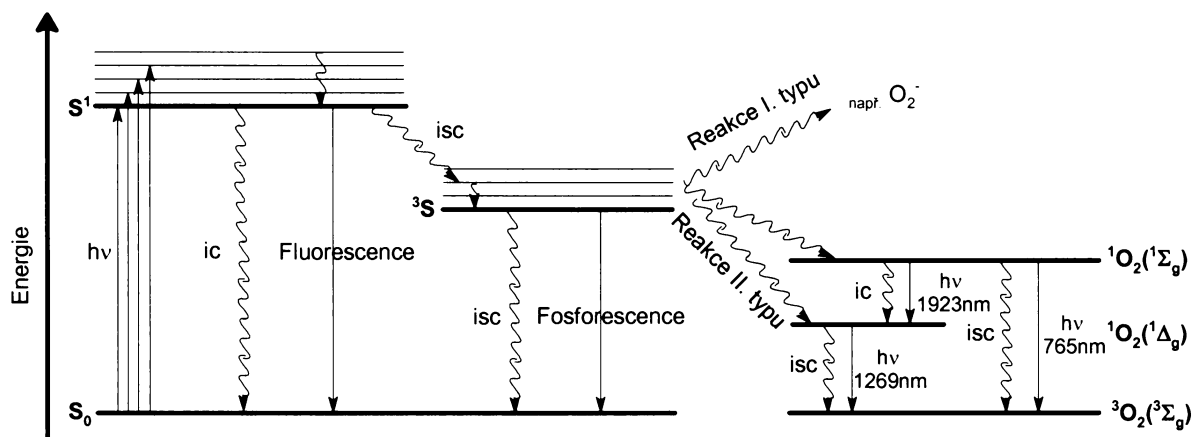
Senzitivizátor (S) se po adsorpci světla dostává do excitovaného singletového stavu (1S_n), který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav (1S_1). Stav 1S_1 se spontánně deaktivuje vnitřní konverzí (ic, z angl. „internal conversion“), vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence nebo mezisystémovým přechodem (isc, z angl. „intersystem crossing“) do stavu tripletového (3S). Vznik 3S nastává nejčastěji během 0,1 až 10 ns. Deaktivace tripletového stavu mezisystémovým přechodem nebo fosforescencí jsou zakázané přechody, a proto mají tripletové stavy senzitivizátorů poměrně dlouhou dobu života a mohou se zúčastňovat řady bimolekulárních reakcí. Zhášení tripletového stavu senzitivizátoru přenosem energie na molekuly kyslíku v základním tripletovém 3O_2 stavu za vzniku singletového kyslíku 1O_2 ($^1\Delta_g$) nebo 1O_2 ($^1\Sigma_g$) [5] jsou označovány jako reakce II. typu. Excitovaný tripletový stav senzitivizátoru může také podstupovat reakci I. typu, kdy reaguje přímo se substrátem nebo s molekulou rozpouštědla mechanismem přenosu elektronů a tvoří tak volné radikály a ion radikály, které

následnou reakcí s molekulárním kyslíkem mohou tvořit různé oxidační produkty (obr.1). Přenos energie nebo elektronu na kyslík jsou kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně chemických a fotofyzikálních vlastnostech senzitizeru, koncentraci kyslíku a substrátu, která reakční cesta převáží.

Fotodynamickou reakci lze popsat tímto reakčním schématem:



Kde S_0 je senzitizer v základním stavu, 1S je senzitizer v excitovaném singletovém stavu, 3S je senzitizer v excitovaném tripletovém stavu a Ac je akceptor singletového kyslíku.



Obr.1: Mechanismus fotosenzitizového přenosu energie – vodorovné čáry znázorňují energetické hladiny, zářivé přechody jsou vyznačeny rovnými šipkami a vlnité šipky značí nezářivé přechody.

Účinnost fotochemické reakce charakterizuje kvantový výtěžek, definovaný jako počet přeměněných molekul na počet absorbovaných světelných kvant. Z definice je zřejmé, že hodnoty jsou většinou ≤ 1 . Mohou však nabývat hodnot > 1 v případech, kdy je počet molekul přeměněných

molekul zvyšován následnými reakcemi, např. řetězovou nebo fotokatalytickou reakcí. Kvantový výtěžek může být vztažen na počet molekul produktu – u fotosenzitizovaných reakcí produkujících singletový kyslík bývá označován Φ_{Δ} .

1.1.2. Singletový kyslík

Molekulární kyslík má v základním tripletovém stavu ve svých π -antivazebných orbitalech 2 nepárové elektrony s paralelním spinem a vyskytuje se tedy v tripletovém stavu. Naprostá většina látek, jakou jsou organické sloučeniny, anorganické aniony, obecné plyny, sloučeniny hlavních podskupin, nepřechodné kovy, atd., má v základním stavu všechny elektrony spárovány a jsou tedy v singletovém stavu. Pro reakci molekuly v singletovém stavu s tripletovou molekulou kyslíku na singletové produkty platí kvantověmechanický zákaz, podle pravidla zachování spinu. Důsledkem je vysoká aktivační energie reakcí kyslíku v základním stavu se singletovými molekulami. Termodynamicky jsou tyto reakce možné, mají záporné hodnoty Gibbsovy energie a jsou silně exotermní. Je zřejmé, že při neexistence spinového zákazu by došlo k okamžité oxidaci organické hmoty a organická hmota by nemohla v přítomnosti kyslíku existovat.

Po přijetí energie může být molekula kyslíku excitována do dvou možných singletových stavů, jejichž vlastnosti jsou uvedeny v tab. 1.

Tab.1: Elektronové stavy molekul kyslíku.

| Elektronový stav | Relativní energie (kJ/mol) |
|---|----------------------------|
| ${}^3\text{O}_2$ (${}^3\Sigma_g^-$) $\uparrow \quad \uparrow$ | 0 |
| ${}^1\text{O}_2$ (${}^1\Delta_g$) $\uparrow\downarrow \quad \text{—}$ | 95 |
| ${}^1\text{O}_2$ (${}^1\Sigma_g^+$) $\uparrow \quad \downarrow$ | 155 |

Jelikož platí spinový zákaz elektronových přechodů mezi stavy o různé multiplicitě, není snadné singletový kyslík generovat přímo excitací molekul kyslíku, ale je možné energii na kyslík přenášet z excitovaných tripletových stavů senzitizerů. Zhášením tripletových stavů senzitizerů v některých organických rozpouštědlech vzniká v primárním kroku přenosu energie jak $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) tak i $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$). Podmínkou je, aby energie ^3S byla větší než energetický rozdíl 157 kJ/mol mezi $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) a kyslíkem v základním stavu $^3\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g$) (poměr mezi produkcí obou forem singletového kyslíku závisí na senzitizeru a rozpouštědle). Vzájemně si konkurující zářivé a nezářivé deaktivace obou forem singletového kyslíku závisí na rozpouštědle, jelikož perturbace molekuly způsobená solvatací zvyšuje pravděpodobnost spinově zakázaných přechodů. Dominujícím procesem však je spinově dovolený přechod $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) \rightarrow $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$). Z toho vyplývá, že déle žijící $^1\Delta_g$ vzniká dvěma reakčními cestami – přímou a nepřímou přes energeticky bohatší, ale krátce žijící, $^1\Sigma_g$. Význam $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) pro tyto reakce spočívá v tom, že je v nezanedbatelné míře prekurzorem $^1\Delta_g$. Experimentální doba života (τ_Δ) pro $^1\Delta_g$ je významně závislá na rozpouštědle [6] viz tab. 2.

Tab.2: Doba života $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) ve vybraných prostředích [7,8].

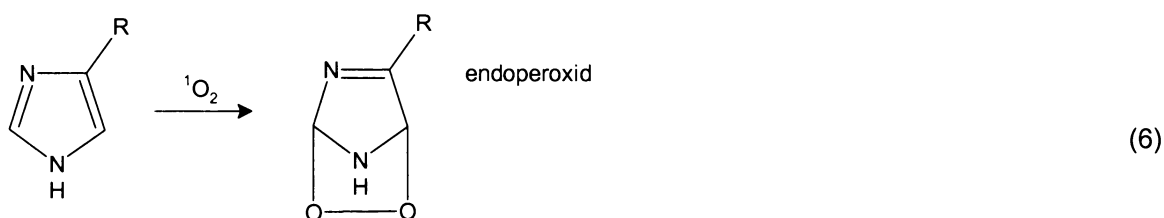
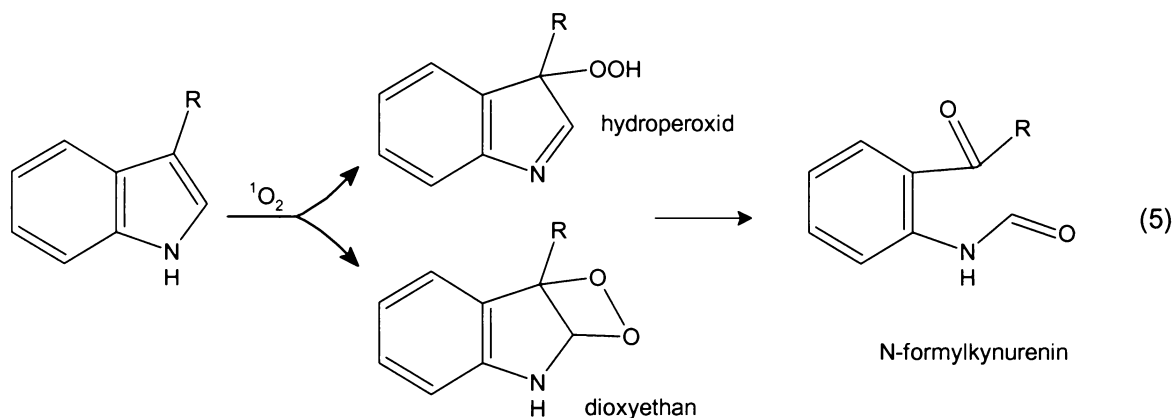
| Prostředí | Doba života τ_Δ $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) [μs] |
|-------------------|---|
| H ₂ O | 3,1 – 4,2 |
| Benzen | 35 – 37 |
| D ₂ O | 44 – 68 |
| CHCl ₃ | 170 – 250 |
| CCl ₄ | (2,6 – 2,8) x 10 ⁴ |
| Plynná fáze | 3,8 x 10 ⁹ |

Tato skutečnost se vysvětluje především přenosem elektronické energie $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) na vibrační stavy molekul rozpouštědla. Přítomnost -OH skupin v molekule rozpouštědla způsobuje nejefektivnější zhášení [9].

Singletový kyslík v roztoku zaniká třemi cestami: fosforescencí, srážkami s molekulami rozpouštědla nebo zhášením. Zhášení znamená interakci s okolními molekulami a nemusí vždy vést k chemické změně. Může nastávat přenosem energie na molekulu zhášeče, která ji následně disipuje do okolního rozpouštědla. Zhášení může probíhat také chemickou reakcí – oxidací reaktantu. Vzhledem k vysoké reaktivitě $^1\text{O}_2$ existuje množství jeho oxidačních reakcí. Typickými reakcemi jsou adice na dvojnou vazbu C=C za vzniku dioxethanů, endoperoxidů a peroxo-sloučenin [5,10].

V biologických systémech jsou proteiny, vzhledem ke svému zastoupení v buňkách, hlavním cílem oxidace singletovým kyslíkem. Zdrojem singletového kyslíku atakující protein jsou především senzitivátory vázané kovalentní vazbou nebo nekovalentní interakcí na protein [11]. Krátká doba života singletového kyslíku v tomto prostředí ($\tau_{\Delta} \leq 250$ ns) omezuje jeho účinek na bezprostřední okolí vzniku, protože jeho difúzní poloměr je menší než 50 nm [12].

Z esenciálních aminokyselin se nejsnadněji oxidují cystein, methionin, tryptofan, tyrosin a histidin a jsou tedy primárním oxidativním cílem [8,13]. Ostatní aminokyseliny reagují se singletovým kyslíkem pomaleji. Reakcemi vzniká směs produktů, jen částečně identifikovaných. Cystein se oxiduje v prvním kroku na bisulfid, v dalších krocích na vyšší oxidační produkty. Oxidace methioninu probíhá přes nestálý zwitterion na sulfoxid. Pro aromatické aminokyseliny je typický vznik endoperoxidu. Následující otevření kruhu vede k hydroperoxidu, který je propagujícím meziproduktem. Počáteční reakční kroky oxidace tryptofanu a histidinu probíhají přes dioxyethan nebo endoperoxid (obr.2). U tryptofanu je typickým produktem N-formylkynurenin [14].



Obr.2: Reakce histidinu a tryptofanu s $^1\text{O}_2$.

Průběh reakce volné aminokyseliny se singletovým kyslíkem nemusí být totožný s reakcí zbytku aminokyseliny vázané v postranním řetězci proteinu. Lze říci, že cílem oxidativního útoku bývají především postranní řetězce, nikoliv páteř proteinu. Nezanedbatelný vliv má rovněž lokální koncentrace senzitizeru a dostupnost kyslíku. O fragmentaci hlavního řetězce bílkovin je poměrně málo údajů. Je však zřejmé, že reakce singletového kyslíku a peroxidické produkty způsobují většinou nevratné poškození proteinu.

1.1.3. Využití fotodynamické reakce

Velký zájem o problematiku fotodynamického efektu byl vyvolán pracemi upozorňujícími na možnost využití cytotoxicity fotodynamicky generovaného singletového kyslíku pomocí senzitizerů selektivně se vážících na tumory [15,16]. Tato metoda nazývaná fotodynamická terapie (PDT = „photodynamic therapy“) je neinvazivní metodou léčby nejrůznějších typů rakoviny, nemocí koronárních cév, ale i degenerativních změn na sítnici.

Další aplikací fotodynamického efektu, která v poslední době nabývá na významu díky stále rostoucí rezistenci bakteriálních kmenů vůči antibiotikům, je fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (PACT = „photodynamic antimicrobial chemotherapy“). Metoda je převážně využívána pro fotodesinfekci mikrobiálně znečištěné vody [17] nebo krevních konzerv [18].

Zatímco při PDT se používají téměř výhradně porfyrinoidní senzitizerátory, pro PACT se používají i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová barviva a xanthinová barviva (bengálská červeň).

Výsledný antimikrobiální efekt závisí jak na povaze senzitizerátoru, tak na druhu mikroorganismu. Zatímco gram negativní bakterie (např. *Escherichia coli*) obvykle nepodléhají aniontovým a neutrálním senzitizerátorům, ale kladně nabitě senzitizerátory mají výrazný inaktivační účinek. Gram pozitivní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*) podléhají inaktivaci účinkem aniontových, kationtových i neutrálních senzitizerátorů. Kationtové senzitizerátory jsou obecněji účinnější [19]. Účinnost senzitizerátorů je zřejmě závislá na povaze buněčné struktury, která určuje lokalizaci senzitizerátorů, a na jeho interakci s okolními molekulami.

Perspektivní využití singletového kyslíku se objevuje i v oblasti desinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze [18]. Fotodynamická metoda je založena na skutečnosti, že krevní plasma a červené krvinky neobsahují nukleové kyseliny, zatímco bílé krvinky a infikující mikroorganismy nukleové kyseliny obsahují. Lze proto použít selektivně působící kationtové senzitizerátory, které se interkalují do DNA mezi páry basí a které absorbují záření v oblasti mimo hemových pigmentů ($\lambda > 600$ nm). Ze čtyř nukleových basí oxiduje hlavně guanin a způsobuje tak nenávratné poškození DNA.

Využití porfyrinů jako fotodynamických pesticidů, herbicidů nebo insekticidů má výhodu v jejich příbuznosti k biologicky aktivním látkám, pro kterou jsou dobře přijímány organismy, vysokých kvantových výtěžků singletového kyslíku a v absorpci světla v širokém pásmu blízkého UV a VIS záření.

1.2. Senzitizátory

Řada senzitizátorů produkuje singletový kyslík a zprostředkovává fotooxidaci nejrůznějších látek [20]. Pro tuto práci byly použity dva porfyrinové senzitizátory. Důvodem této volby byla rozsáhlá znalost jejich chemických a fotofyzikálních vlastností [21].

Důležitými charakteristikami senzitizátorů jsou

- i) Absorpce světla ve viditelné oblasti spektra.
- ii) Kvantový výtěžek singletového kyslíku Φ_{Δ} . Kvantové výtěžky většiny porfyrinových senzitizátorů se pohybují v rozmezí 0,3 – 0,8 [22].
- iii) Fotostabilita senzitizátoru. Senzitizátor musí být dostatečně stabilní vůči přímé fotodegradaci a oxidaci vznikajícím singletovým kyslíkem, případně oxidaci dalšími reaktivními formami kyslíku. Všechny senzitizátory sice podléhají fotodegradaci, ale se značně rozdílnou rychlostí. Fotochemické odbourávání senzitizátoru („photobleaching“) hraje důležitou roli v medicínských aplikacích a při stanovení výtěžků [23].

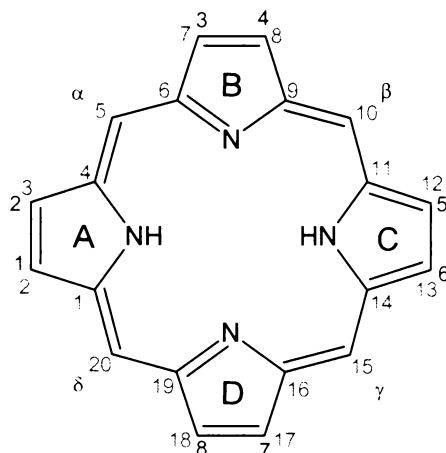
1.2.1. **Obecné vlastnosti porfyrinů**

Porfyriny jsou přírodní makrocyclické sloučeniny, které hrají důležitou roli v metabolismu živých organismů. Příkladem hemoglobin účastníci se transportu kyslíku nebo chlorofyl podílející se na fotosyntéze.

Porfyriny jsou deriváty porfinu jehož základem je tetrapyrrolový kruh. Pyrrolová jádra jsou propojena methinovými můstky. Porfyriny jsou formálně odvozovány od porfinu substitucí vodíku na periferních místech různými postranním řetězci.

Podle názvosloví IUPAC jsou jednotlivé pyrrolové kruhy označovány A,B,C,D ve směru hodinových ručiček, atomy uhlíku jsou číslovány vzestupně 1 – 20 a atomy dusíku 21 – 24 (obr.3). Podle Fishera je však dostatečné

číslování pouze periferních uhlíků 1 – 8, na kterých probíhají přírodní substituce a tzv. interpyrrolických míst označovaných jako $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ která mohou být uměle substituována.



Obr.3: Strukturní vzorec porfinu s anotací. Modrá písmena $\alpha - \gamma$ značí interpyrrolická místa, červená čísla značí periferní uhlíky.

Porfínový cyklus je vysoce konjugovaný, obsahuje 22 π -elektronů a je podobně jako jiné konjugované cyklické sloučeniny. Samotný porfin a většina známých porfyrinů jsou ve vodě nerozpustné sloučeniny. Ve vodě rozpustné jsou porfyriny s dostatečným množstvím ionizovatelných skupin vázaných na porfyrinový cyklus [24].

Z hlediska acidobazických vlastností lze porfyriny považovat za amfolyty, v molekule jsou 2 pyrrolové dusíky schopné přijímat protony a 2 pyrrolové NH skupiny schopné protony odštěpit. Nejstabilnější tautomerní formou je ta, ve které jsou vodíky vázány na protilehlých atomech dusíku. Většina porfyrinů se chová jako slabé kyseliny, v závislosti na periferních substituentech. Izoelektrický bod většiny porfyrinů je mezi $\text{pH} = 3-5$. V tomto izoelektrickém bodu lze ve vodě rozpustné porfyriny z vodného prostředí vysrážet.

Rozsáhlý π -elektronový systém umožňuje značnou absorpci světla, která má za následek intenzivní zbarvení porfyrinů. Díky této vlastnosti a déle žijícím

excitovaným stavům jsou porfyriny vhodné jako senzitivizátory pro fotodynamické reakce.

V UV/VIS oblasti spektra se porfyriny vyznačují intenzivním tzv. Soretovým pásem (kolem $\lambda = 400$ nm) a obvykle čtyřmi méně intenzivními tzv. Q-pásky (v rozmezí $\lambda = 500 - 700$ nm) označujícími se I, II, III a IV ve směru klesající vlnové délky. Podle poměru intenzit pásů I, II, III a IV lze porfyriny rozdělit do 4 základních typů:

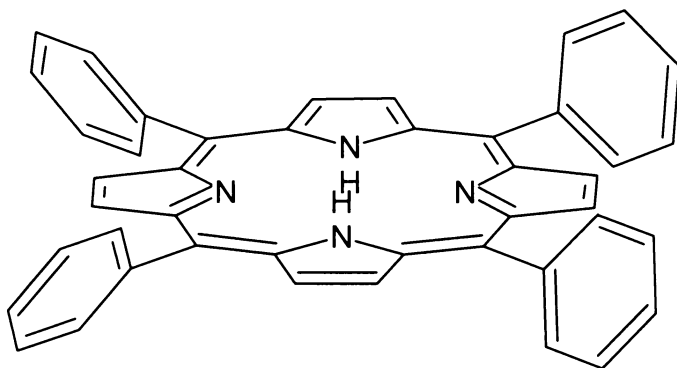
- 1) Etio-typ IV>III>II>I
- 2) Rhodo-typ III>IV>II>I
- 3) Oxorhodo-typ III>II>IV>I
- 4) Phyllo-typ IV>II>III>I

Typickou vlastností porfyrinů je tvorba metalokomplexů. Kovový ion je často koordinován volnými páry pyrrolových atomů dusíku, za disociace dvou atomů vodíku z dusíků pyrrolového kruhu. Inkorporace kovového kationtu je doprovázena spektrální změnou. Většinou dochází k redukci počtu Q-pásů v důsledku změny symetrie molekuly.

Typickou vlastností porfyrinů a metaloporfyrinů je tvorba agregovaných částic, stabilizovaných vodíkovými vazbami, van der Waalsovými silami a především $\pi-\pi$ interakcemi [25]. Agregované částice zhasí excitované stavy senzitivizátorů a snižují tak výrazně jejich fotodynamickou účinnost ve smyslu fotoprodukce 1O_2 .

1.2.2. Vlastnosti TPP

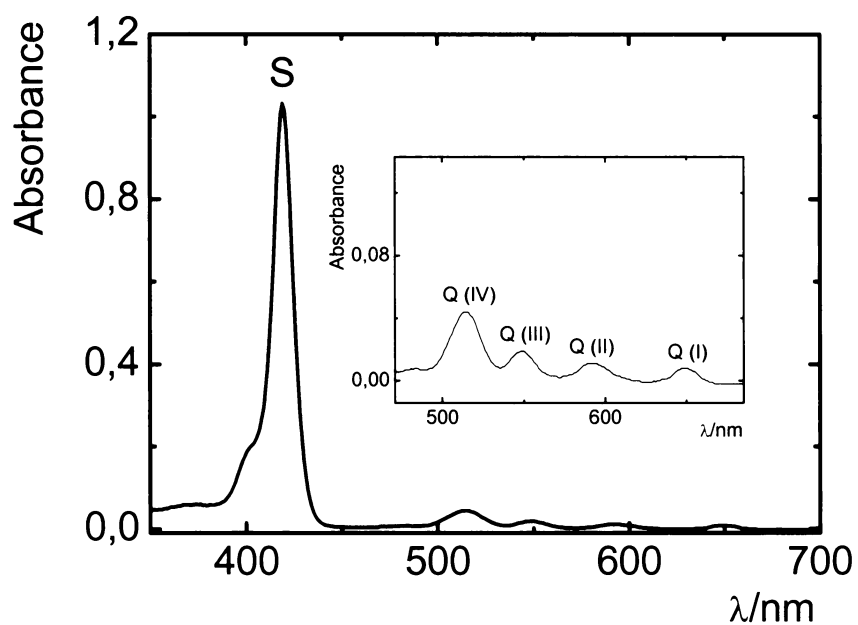
Nepolárním senzitivizátorem vybraným pro tuto práci byl 5,10,15,20 - tetrafenylporfyrin (TPP). TPP je derivát porfinu formálně odvozený od porfinu substitucí vodíku na methionových můstcích fenylů (obr.4).



Obr.4: Molekulová struktura TPP.

TPP je znám jako tzv. čistý senzitizer [26], poskytující fotodynamickou reakcí výhradně singletový kyslík. TPP se také vyznačuje vysokými kvantovými výtěžky singletového kyslíku [27].

TPP se řadí mezi etio-tyr porfyrinů, absorpční spektrum (obr.5).

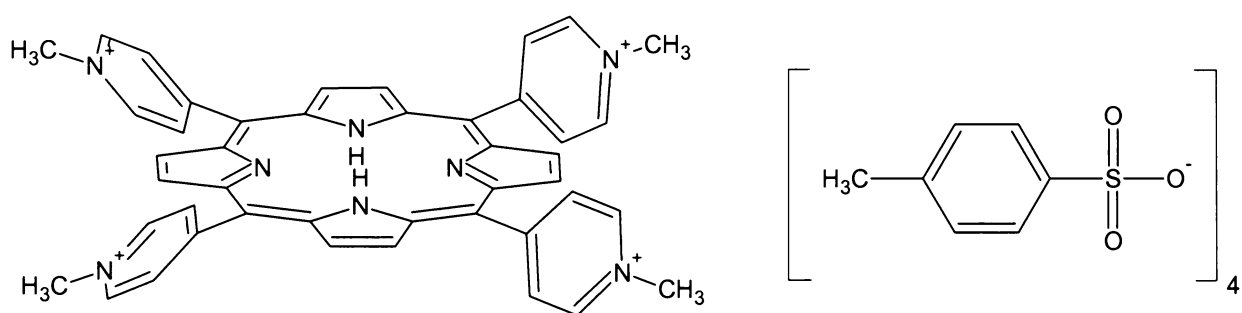


Obr.5: Etio-tyr spektra TPP v toluenu, S-Soretův pás, (I-IV) Q-pásky.

1.2.3. Vlastnosti TMPyP

Kationtové porfyriny vzbudily pozornost jako efektivní fotodynamické senzitivátory pro vazebné schopnosti k nukleovým kyselinám, které jsou schopny selektivně štěpit [28,29] a pro schopnost fotodynamicky inaktivovat rezistentní kmeny bakterií a virů [30,31].

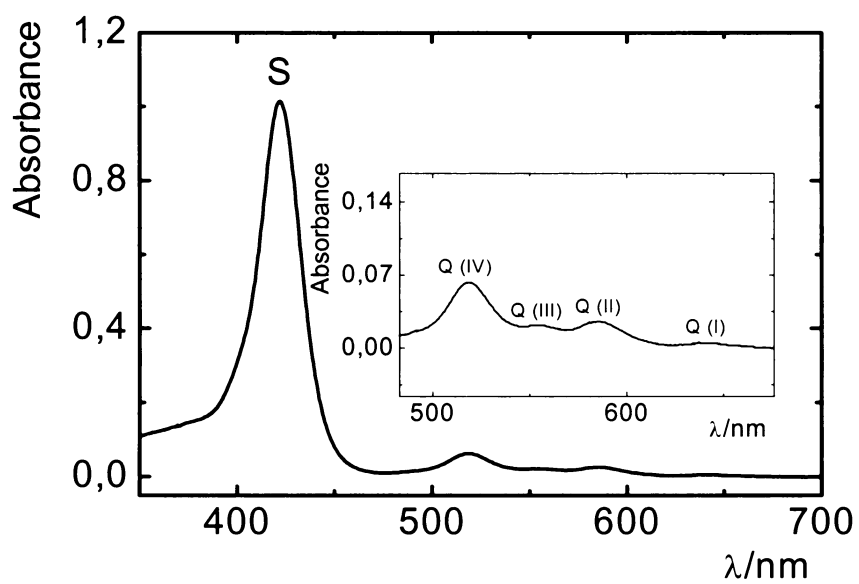
Jedním z nejvíce studovaných kationtových porfyrinů je 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin tetra(toluen-4-sulfonát) TMPyP (obr.6).



Obr.6: Molekulová struktura TMPyP.

TMPyP se vyznačuje vysokým kvantovým výtěžkem singletového kyslíku ($\Phi_{\Delta}=0,58 - 0,9$) [32] a velmi nízkou hodnotou $pK_a=1,4$ [33]. Nízká bazicita pyrrolových dusíků je dána posunem elektronů ke kladně nabitým methylpyridylovým skupinám na periferii. Na rozdíl od ostatních kationtových porfyrinů se TMPyP vyskytuje pouze v monomerní formě ve vodném prostředí až do koncentrace cca 1×10^{-4} M [33]. Kladné náboje z periferie TMPyP jsou delokalizovány na porfyrinový kruh a díky elektrostatickým odpuzivým silám brání tvorbě dimerů a vyšších agregátů [34].

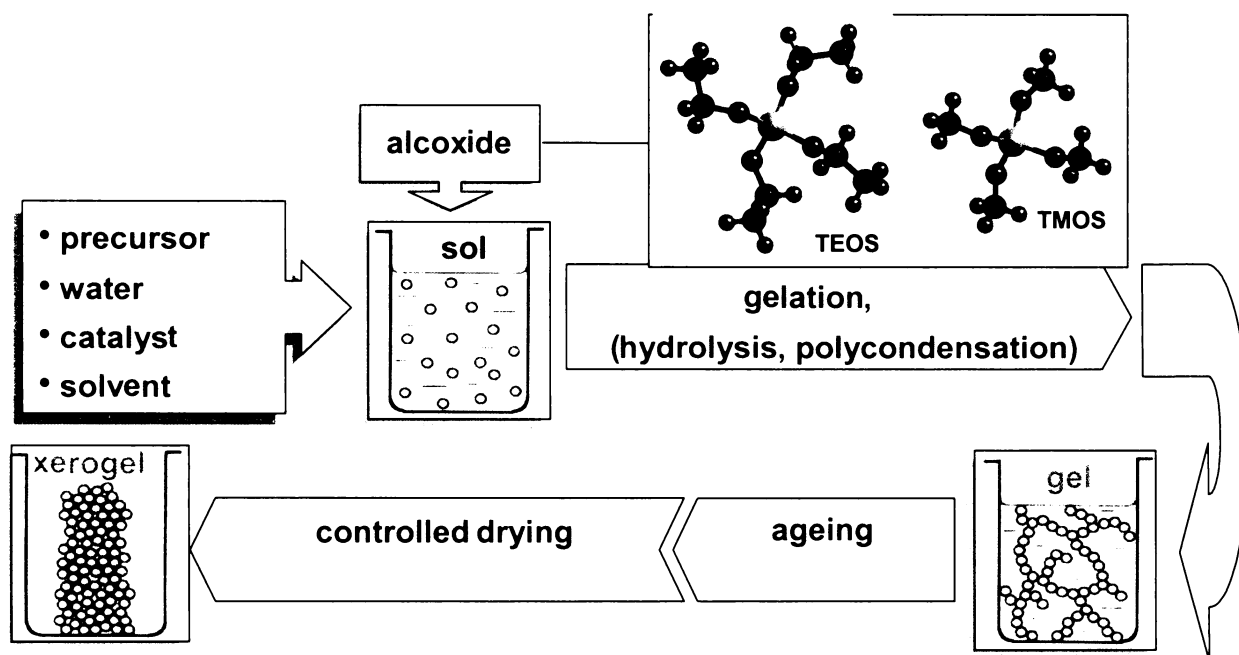
TMPyP se řadí mezi tzv. phyllo-typ porfyrinů, absorpční spektrum (obr.7).



Obr.7: Phyllo-typ spektra TMPyP v deionizované H_2O , S-Soretův pás, (I-IV) Q-pásky.

1.3. Metoda sol – gel

Metoda sol-gel poskytuje relativně nekomplikovaný prostředek přípravy anorganických a organo-anorganických hybridních skel pomocí hydrolyzy a kondenzace vhodných prekurzorů [35]. Nejvíce používané prekurzory, pro přípravu materiálů s analytickým použitím, jsou křemičité alkoxydy, zejména tetraethoxysilan (TEOS) a tetramethoxysilan (TMOS). Během sol-gel transformace postupně stoupá viskozita roztoku, ze solu (koloidní suspence velmi malých částic, 1–100 nm) se stává pevná zesíťená hmota – gel. Vysušením gelu vzniká xerogel viz, obr.8.



Obr.8: Schématické zobrazení metody sol-gel.

Metoda sol-gel byla původně vyvinuta pro přípravu keramických materiálů za nízkých teplot. Později ale našla použití i v dalších oblastech, např. pro vytváření slabých ochranných vrstev, vytvářených metodou tzv. „dip-coating“ nebo pro imobilizaci biologického materiálu (tzv. „biocers“ = biologically modified ceramics) [36].

Metoda sol-gel poskytuje užitečnou cestu přípravy anorganických a organických hybridních materiálů. Podstatnou výhodou této metody je lehkost přípravy a modifikovatelnost sol-gelových materiálů. Mírné reakční podmínky dovolují imobilizaci různých molekul jako jsou proteiny, enzymy, barvy atd. [37,38]. Imobilizace lze dosáhnout pouhým přidáním činidla do solu dříve než začne gelace. Takto připravené materiály jsou transparentní, chemicky a mechanicky stálé a mohou být připraveny v různých velikostech a tvarech včetně tenkých filmů, vláken a prášků. Kontrolou reakčních podmínek, stejně jako typem a koncentrací prekurzorů, lze dosáhnout požadované velikosti a četnosti pórů, indexu lomu a povrchové plochy.

Při přípravě keramických materiálů metodou sol-gel je možné vycházet z nejrůznějších prekurzorů. Zdaleka nejčastěji se používají křemičité materiály (alkoxydy, chlorid křemičitý apod.), nicméně je možné použít i např. nitráty, vhodné alkoxydy nebo chloridy zirkonia, titanu a dalších kovů.

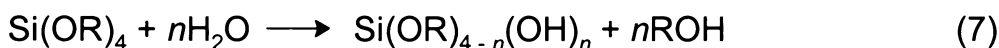
Požadovaných vlastností materiálu je možné dosáhnout i použitím směsi prekurzorů nebo jejich chemickou modifikací. Zejména se používá náhrada některých alkoxydových skupin prekurzoru jinými skupinami, které nepodléhají kondenzační reakci (takovým prekurzorem je např. methyltrimethoxysilan) [39]. Pak je možné tvořit materiály např. s hydrofobní povahou, s nabitými skupinami, se skupinami pro kovalentní modifikace apod. Při tvorbě solu nebo při gelaci je také možné přidat do směsi další látky, které se sice neúčastní polymerační reakce, ale vylepšují vlastnosti výsledného materiálu, např. měkkost, porozitu, vlhkost atd. [40].

1.3.1. Základy metody sol-gel

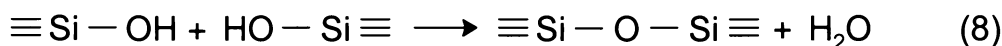
Chemické reakce odehrávající se během transformace sol→ gel→ xerogel silně ovlivňují vlastnosti produktu.

Sol-gel polymerizační reakci lze rozdělit na 2 základní kroky:

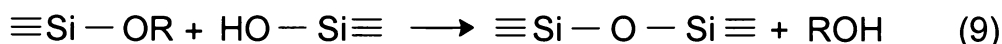
1. Hydrolýza alkoxidových skupin za vzniku reaktivních silanolových skupin



2. Kondenzace silanolových skupin vedoucí ke vzniku solu eventuálně gelu



(vodní kondenzace)



(alkoholová kondenzace)

Je velice obtížné oddělit tyto 2 kroky, jelikož kondenzace často začíná před ukončením hydrolýzy. Oba reakční kroky probíhají na atomu křemíku nukleofilní substitucí ($\text{S}_{\text{N}}2\text{-Si}$). Jelikož jsou křemičité alkoxidy poměrně málo reaktivní (ve srovnání s kovovými alkoxidy), urychluje se reakce kyselými, bazickými nebo nukleofilními katalyzátory. Kysele katalyzovaná hydrolytická reakce má za následek protonizaci alkoxidové skupiny a následný nukleofilní atak vody za vzniku pentakoordinovaného intermediátu. Částečný kladný náboj alkoxidu je kompenzován a činí tak alkohol lepší odstupující skupinou [41]. Při bazicky katalyzované hydrolytické reakci dochází k nukleofilnímu ataku křemíkového atomu hydroxidovým aniontem za vzniku negativně nabitého pentakoordinovaného intermediátu, následované vytlačením alkoxidového aniontu.

Fyzikální vlastnosti (průměrná velikost pórů a jejich distribuce, povrchová plocha atd.) suchého gelu závisí na reakčních podmínkách. Poměr voda/silan,

povaha a koncentrace katalyzátoru a alkoxidového prekursoru jsou typické vlastnosti silně ovlivňující relativní reakční rychlosti hydrolýzy a kondenzace. Všeobecně, nízké pH a malá koncentrace vody vede ke vzniku materiálů s malou průměrnou velikostí pórů, naproti tomu vysoké pH a vysoká koncentrace vody vede k více porézním materiálům. Za nízkého pH probíhá kondenzace přednostně mezi silanolovými skupinami monomerů nebo na konci polymerů. To vede k formaci gelů složených zejména z lineárních vzájemně propletených řetězců. Za vysokého pH probíhá kondenzace především mezi vysoce rozvětvenými oligomery, dochází ke vzniku částic, které se po dosažení kritické velikosti stávají stabilní a nedochází tak ke gelaci, ale k precipitaci. Rychlost hydrolýzy a kondenzace je také závislá na velikosti alkoxidové skupiny, vzhledem k sférickým faktorům. Čím je alkoxidová skupina větší a rozvětvenější, tím pomalejší je hydrolýza [42].

Složitost polymeračního procesu je více zřetelná při preparaci matric z organokřemičitých prekursorů (o obecném vzorci $R_{4-x}Si(OR')_x$, kde R a R' představuje funkční skupinu a $x = 1-3$). Organokřemičité prekurzory mohou být hydrolyzovány nebo kondenzovány s křemičitými alkoxidy (nejčastěji TEOS nebo TMOS), tyto materiály jsou potom označovány jako ORMOSILs (z angl. „Organically Modified Silicates“) [43]. Funkční skupiny používané u organicky modifikovaných silikátů jsou: $R=CH_3$, C_2H_5 , C_6H_5 , $(CH_2)_nNH_2$, $(CH_2)_nSH$. Nejběžněji používanými prekurzory jsou trialkoxidy křemíku ($x=3$), kde funkční skupina R je vázána na křemík nehydrolyzovatelnou vazbou. Tyto prekurzory mohou být použity samostatně nebo s tetraalkoxidy ($x=4$) pro lepší zesílení. Výhodou tohoto přístupu je tvorba matric s požadovanými vlastnostmi (polarita, index lomu, povrchové vlastnosti) vhodnou volbou funkční skupiny R.

Principem metody je rozdělení celého procesu do 3 hlavních částí. Prvním krokem je příprava solu (předpolymerovaná koloidní směs) z nízkomolekulárních prekursorů, druhým krokem je gelace solu a posledním krokem je odstranění rozpouštědla, které vede k výslednému pevnému materiálu.

Předpolymerace prekursoru je prováděna obvykle v silně kyselém nebo silně zásaditém prostředí. Tím se dosahuje pomalého průběhu reakce, který umožní vzniknout kompaktním nanočásticím.

Gelace směsi je navozena změnou reakčních podmínek, např. pH (neutralizací nebo přidáním vhodného pufru), teploty (zahřátím) nebo přidáním katalyzátoru (např. fluoridové anionty). Polykondenzační reakce se touto změnou velice urychlí a dá během krátké doby (řádově desítky sekund až minuty) vzniknout gelu. I po zatuhnutí ale dochází k dalším kondenzačním reakcím (tzv. stárnutí gelu), kdy reagují poslední volné skupiny a zmenšují se póry v matrici.

Sušení materiálu je krok, kterým se nepříliš pevný gel mění v tuhý rigidní materiál. Sušení materiálu je obvykle doprovázeno smršťováním matrice, při kterém může docházet i k jejímu praskání. Vysušování je proto potřeba dělat opatrně, nejčastěji se používá opatrné vysušování při teplotách kolem 40°C .

1.3.2. Imobilizace molekul metodou sol-gel

Metod imobilizace molekul v sol-gel matrici je celá řada a nové jsou stále vyvíjeny. Metody je možné rozdělit podle mnoha kritérií, např. podle povahy vazby mezi imobilizovaným materiálem a matricí, komplexnosti imobilizovaného materiálu, použité matrice atd.[44].

A) Podle vazby mezi imobilizovaným materiálem a matricí:

1. **Kovalentní spojení.** Při tomto spojení dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi imobilizovaným materiálem a matricí. Výhodou této vazby je její velká pevnost, kovalentní vazba však může výrazně narušit biologickou aktivitu materiálu, např. při kovalentním navázání enzymu přes své aktivní místo. Praktickým příkladem může být kovalentní prokřížení bílkovin pomocí glutaraldehydu.
2. **Nekovalentní spojení.** Nekovalentními vazbami uplatňujícími se při imobilizacích jsou iontové interakce, hydrofobní interakce a Van der Waalsovy síly. Tyto vazby mají obecně menší vazebnou energii, obvykle jich však vznikne větší množství, takže pevnost celého souboru nekovalentních vazeb může být s kovalentní srovnatelná, ne-li vyšší. Pevnost těchto vazeb také závisí na vlastnostech prostředí, např. hydrofobní interakce jsou pevnější v polárních prostředích, v nepolárním

prostředí prakticky zanikají. To může být jak nevýhoda (možné přerušení vazeb a uvolnění imobilizovaného materiálu), tak výhoda (při vratných imobilizacích). Nevýhoda nesespecifických vazeb je také v tom, že část biologického materiálu může ztratit imobilizací svoji aktivitu v důsledku nevhodné orientace. Příkladem nekovalentní imobilizace jsou nejrůznější nesespecifické absorpce a adsorpce nebo naopak vysoce specifické imobilizace bílkoviny pomocí příslušné protilátky.

3. **Imobilizace bez kovalentního i nekovalentního spojení.** V tomto případě je imobilizovaný materiál obklopen matricí tak, aby se nemohl z matrice uvolnit, obvykle se používá anglický termín „entrapment“ (zapouzdření). Výhodou je skutečnost, že neexistence chemických vazeb umožňuje dosáhnout téměř plné biologické aktivity imobilizovaného materiálu. Naopak nevýhodou je možnost úniku molekul z matrice při jejím poškození. Na poškození matrice se může imobilizovaný materiál i přímo podílet.

B) Podle použité matrice:

1. **Imobilizace bez matrice.** Biologický materiál je možné křížovými vazbami pospojovat tak, že vznikne vysokomolekulární nerozpustná hmota. Používá se např. už zmiňované prokřížování enzymů pomocí glutaraldehydu.
2. **Imobilizace do organické matrice.** Příkladem je imobilizace za použití vysokomolekulárních polysacharidů, např. agaru nebo alginátu.
3. **Imobilizace do anorganické matrice.** Příkladem může být už zmíněná metoda sol-gel za použití silikátových prekurzorů.
4. **Imobilizace do hybridní matrice.** Výše uvedené postupy se často kombinují (např. hybridní matrice oxid křemičitý-alginát), zejména pro dosažení lepších mechanických vlastností matrice a zároveň vyšší míry zachování imobilizovaného materiálu.

Imobilizace molekul představuje postup, kterým je možné vylepšit vlastnosti imobilizovaného materiálu. Imobilizací lze získat mnoha výhod [45-47] mezi které patří:

- zvýšení stability použitého materiálu (vyšší termální stabilita imobilizovaných molekul apod.)
- možnost opakovaného použití materiálu a jednodušší izolace z reakční směsi
- ochrana proti kontaminujícím mikroorganismům
- vhodná prostorová orientace materiálu např. pro aplikaci v senzorech

Použitím vhodné matrice a vhodné metody je možné dosáhnout téměř 100% zachování aktivity a její udržení po dobu několika měsíců.

Použití metody sol-gel z křemičitých prekurzorů přináší ještě další výhody, kterými jsou zejména:

- vysoká porozita matrice
- dobré optické vlastnosti (křemičitá matrice je plně transparentní pro světlo ve VIS oblasti, do určitého obsahu materiálu si tuto transparentnost udržuje)
- dobré mechanické vlastnosti
- rigidita matrice

Metodou sol-gel může být imobilizován i biologický materiál. Nejčastěji imobilizovaným biologickým materiálem jsou enzymy [48], naopak imobilizace celých mikrobiálních buněk není ještě zdaleka tak rozšířená. Nicméně i na tomto poli se v poslední době objevují mnohé úspěšné výsledky. První imobilizace celých buněk metodou sol-gel byla provedena v roce 1980 u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Byly úspěšně použity při kvašení piva, přičemž jejich aktivita byla srovnatelná s aktivitou volných buněk. Také kinetická charakteristika zůstala nezměněná a reakce probíhala podle kinetiky Michaelis a Mentenové [49].

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- 1)** Metodou sol-gel připravit transparentní, porézní tenkou vrstvu s imobilizovaným fotodynamickým senzitizerem.
- 2)** Zjistit fotofyzikální vlastnosti takto imobilizovaného senzitizeru.
- 3)** Ověřit fotodynamický efekt (fotocytotoxicitu) těchto vrstev vůči kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* DMB 60.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin tetra(toluen-4-sulfonát)
(Fluka)

5,10,15,20- tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin tetrasodná sůl dodekahydrát
(Aldrich)

5,10,15,20-tetrafenylporfyrin (Fluka)

Tetramethoxysilan (Fluka)

Tetraethoxysilan (Fluka)

Polydimethylsiloxan – Sylgard ® (Dow Corning)

Tryptofan (Fluka)

Histidin (Fluka)

Bacteriological pepton (Oxoid)

Yeast extract (Aplichem)

Glukóza (Lachema)

N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline (Fluka)

NaN₃ (Lachema)

D₂O (Fluka)

NaOH p.a. (Lachema)

NaCl p.a. (Lachema)

HCl p.a. (Lachema)

Toluen p.a. (Lachema)

3.2. Použitá media a roztoky

3.2.1. Příprava fyziologického roztoku

9 g NaCl bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované H₂O.

3.2.2. Příprava zásobního roztoku TMPyP

Pro většinu experimentů byl TMPyP rozpuštěn v deionizované H₂O nebo fyziologickém roztoku. Přesná koncentrace byla zjišťována absorpční spektroskopií ($\epsilon_{422} = 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_r = 1363,63$). Zásobní roztok byl uchován v chladu a temnu.

3.2.3. Příprava zásobního roztoku TPPS4

Navážené množství TPPS4 bylo rozpuštěno ve deionizované H₂O. Přesná koncentrace byla stanovena absorpční spektroskopií ($\epsilon_{412} = 3,07 \times 10^5$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_r = 1239,11$). Zásobní roztok byl uchován v chladu a temnu.

3.2.4. Příprava zásobního roztoku TPP

Přesně navážené množství bylo rozpuštěno v toluenu.

3.2.5. Příprava YPG média

| | |
|-----------------|--------|
| „Yeast extract“ | 10 g/l |
| Pepton | 10 g/l |
| Glukóza | 20 g/l |

Odvážené množství látek bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody.

3.2.6. Příprava zásobního roztoku N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu

0,015g RNO bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody.

3.2.7. Příprava zásobních roztoků histidinu a tryptofanu

Zásobní roztoky histidinu a tryptofanu byly připraveny, není-li uvedeno jinak, rozpuštěním v destilované vodě.

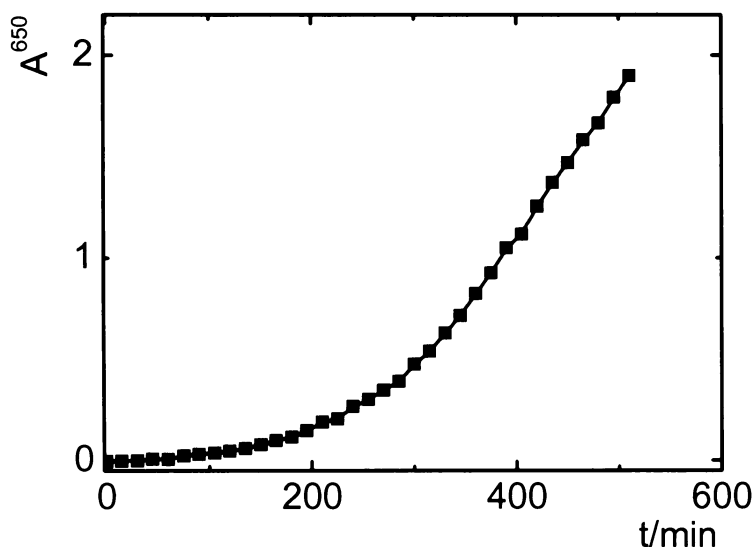
Veškeré roztoky použité při práci s buňkami byly sterilizovány a autoklávu po dobu dvaceti minut při 120 °C a 0,1-0,15 Mpa.

3.3. Použitý mikroorganismus

Kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 byl poskytnut z Environmental Biotechnology, University of Tennessee Knoxville, USA.

3.4. Příprava kvasinek

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 byly kultivovány ve 250 ml Erlenmayerových baňkách s 50 ml YPG média při laboratorní teplotě. Jako inokulum byly použity kvasinky napěstované na agarových vrstvách. Buňky byly kultivovány přes noc při 25 °C, poté bylo 5 ml přeočkováno do čerstvého YPG média. V rané exponenciální fázi obr.9 (OD 0,8-1,0) byly nakultivované buňky přemístěny do lednice (T = 8 °C), kde byl ochlazením zastaven jejich růst.



Obr.9: Růstová křivka buněk *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 v roztoku YPG.

3.5. Použité metody

3.5.1. Elektronová absorpční spektra

Absorpční spektra roztoků byla měřena na UV-VIS spektrofotometru Unicam UV 300 a spektrofotometru Hewlet-Packard HP8452A v rozsahu 190 – 800 nm. Není-li uvedeno jinak, bylo měření prováděno v 1 cm křemenné kyvetě v deionizované H₂O nebo fyziologickém roztoku. V některých případech byly roztoky s precipitátem přímo v kyvetě odstředěny na odstředivce Hettich EBA 21 při 4000 ot/min.

3.5.2. Ozařování vzorků

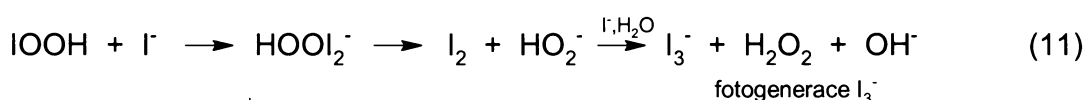
Roztok o objemu 2 ml byl nalit do křemenné kyvety 1 x 1 x 4 cm s míchadélkem, kyveta byla uzavřena, umístěna v kovovém bloku na optické lavici a ozařována 5 mW zeleným He-Ne laserem ($\lambda = 543$ nm) nebo bílým nefokusovaným světlem (300 W stabilizovaná halogenová žárovka). V případě ozařování matric bylo do dráhy laserového paprsku umístěno podložní sklíčko (upravené pro velikost kyvety 1x3 cm) s imobilizovaným porfyrinem. Roztok byl míchán během ozařování shora rotujícím magnetem. Alternativou bylo ozařování matric s imobilizovaným senzitivátorem na dně Erlenmayerových baněk bílým světlem (300 W stabilizovaná halogenová žárovka).

3.5.3. Práce s buňkami

Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna v laminárním boxu HH1.2 Basis (Helta-Holten AIS). Kultivace buněk byla prováděna v termostatované rotační třepačce Unimax 1010DT (Heidolph) při rychlosti třepání 170 rpm a 30 °C. Sterilizace roztoků pro buněčné pokusy byla prováděna autoklávem Chirana PS121 V/I.

3.5.4. Jodidová metoda stanovení $^1\text{O}_2$

Metoda je založena na reakci $^1\text{O}_2$ (produkovaného fotodynamickou reakcí) s I^- v přítomnosti $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ jako katalyzátoru. Reakčním produktem je I_3^- , jehož množství je přímo úměrné generovanému $^1\text{O}_2$. Produkce trijodidového aniontu je měřena v maximu absorpčního pásu I_3^- při $\lambda=351$ nm [50]. Vznik I_3^- založený na reakci singletového kyslíku s I^- v mírně kyselém či neutrálním vodném prostředí lze popsat následujícím schématem [51]:



3.5.5. Metoda odbarvování N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu

Tato metoda je vhodná pro měření produkce singletového kyslíku generovaného na základě fotodynamické reakce ve vodných neutrálních prostředích. Je založená na odbarvovací reakci ve vodě rozpustného N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu (RNO) s singletovým kyslíkem v přítomnosti imidazolu nebo histidinu [52].

Stupeň odbarvení žlutého barviva RNO je přímo úměrný celkové produkci fotodynamickou reakcí generovaného singletového kyslíku a lze jej spektrofotometricky sledovat jako úbytek absorbance barviva při 440 nm.

Přítomnost imidazolu nebo histidinu je pro stanovení singletového kyslíku nezbytná. Bez jejich přítomnosti zůstává RNO do značné míry rezistentní vůči působení $^1\text{O}_2$. Reakcí $^1\text{O}_2$ s imidazolem (histidinem) se nejprve tvoří přechodný trans-annulární peroxidový intermediát, schopný následné odbarvovací reakce s RNO.

Celkovou reakci lze vyjádřit rovnicemi:



kde A je imidazol (histidin), $[\text{AO}_2]$ je přechodný trans-annulární peroxid, AO_2 je konečný produkt oxidace A (přeměnou nebo rozkladem metastabilního $[\text{AO}_2]$), $\text{R}'\text{NO}$ jsou oxoprodukty RNO.

Výhodou metody je možnost jejího použití ve vodných neutrálních vzduchem saturovaných roztocích. Proto našla tato metoda širokého využití hlavně pro sledování produkce singletového kyslíku v biologických systémech.

3.5.6. Měření fotofyzikálních vlastností

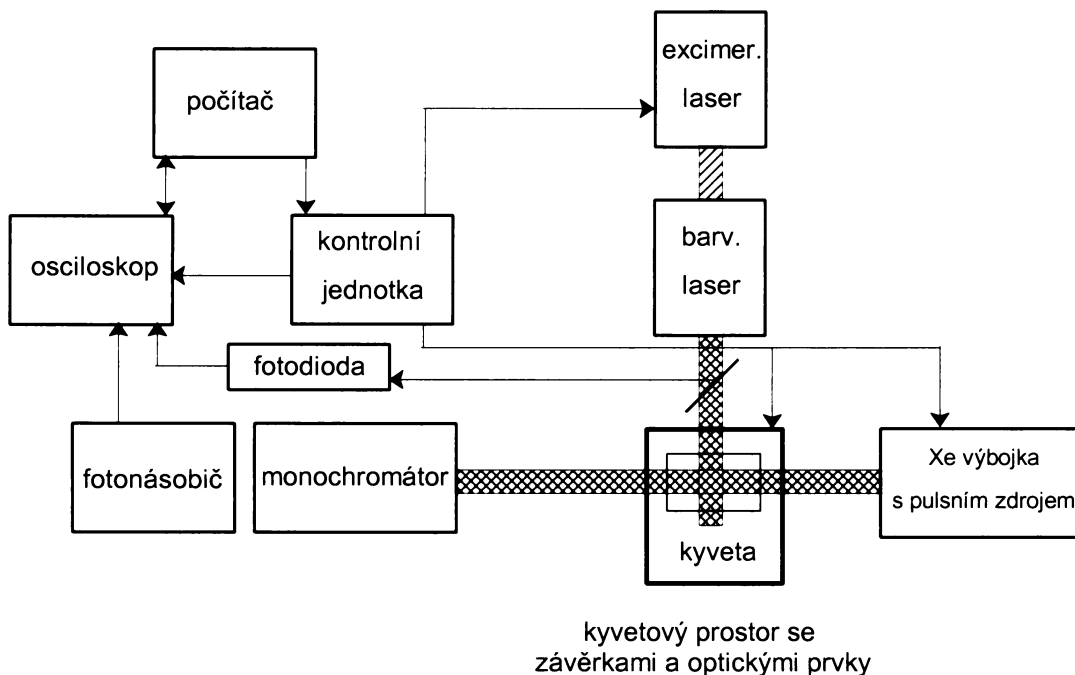
Doba života tripletových stavů, absorpční maxima tripletových stavů a doba života singletového kyslíku byla měřena na laserovém kinetickém spektrofotometru Applied Photophysics. Jako zdroj excitačního záření byl použit barvivový laser FL-3002 (Lambda Physiks), který poskytuje puls pološířky cca 28 ns a energii 0,05 až 5 mJ/puls v rozmezí vlnových délek 420 až 425 nm. Barvivový laser byl čerpán XeCl excimerovým laserem COMPEX 102 (Lambda Physiks). Časové profily vyhasínání tripletního stavu po excitaci pulsem 250 W Xe lampy (vybavené pulzní jednotkou) byla měřena pomocí fotonásobiče R928 (Hamamatsu)

3.5.6.1. Časově rozlišená spektra

Diferenční absorpční spektra pro TMPyP v roztoku a imobilizovaném v matrici byla změřena laserovou kinetickou spektroskopií. Schéma aparatury pro měření časově rozlišených spekter je znázorněno na obr.10.

Ze spekter byla určena absorpční maxima tripletových stavů (T-T = triplet – triplet přechody). Nalezených absorpčních maxim tripletových stavů bylo využito pro měření dob života tripletových excitovaných stavů.

Triplet-tripletová spektra byla naměřena v rozmezí 460-570 nm s krokem 3 nm.



Obr.10: Schéma aparatury pro měření časově rozlišených spekter.

3.5.6.2. Doby života excitovaných tripletových stavů senzitizerů

Koncentrace c_t tripletových stavů senzitizerů v čase t po laserovém pulsu je dána rovnicí:

$$c_t = c_0 \times \exp(-k_c t) \quad (16)$$

kde c_0 je počáteční koncentrace tripletových stavů senzitizerů a k_c celková rychlostní konstanta deaktivace. Celková rychlostní konstanta deaktivace je pak dána vztahem:

$$k_c = k_{et}[{}^3\text{O}_2] + k_s \quad (17)$$

kde k_{et} je rychlostní konstanta zhášení tripletového stavu senzitizeru kyslíkem, $[^3O_2]$ je molární koncentrace 3O_2 v daném prostředí, k_s je rychlostní konstanta spontánní deaktivace (v nepřítomnosti kyslíku).

Střední doba života tripletových stavů τ je definována jako reciproká hodnota rychlostní konstanty spontánní deaktivace (k_s) a je dána vztahem:

$$\tau = 1/k_s \quad (18)$$

Rychlostní konstanty deaktivace k_c byly určeny z naměřených úbytků absorbance tripletového stavu senzitizerů v čase po laserovém pulsu. Úbytek absorbance tripletových stavů lze popsat rovnicí:

$$A_t = A_0 \times \exp(-k_c t) \quad (19)$$

kde A_0 je počáteční absorbance tripletových stavů senzitizeru a A_t je absorbance tripletových stavů v čase t po laserovém pulsu.

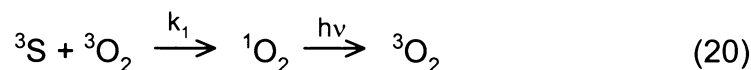
Experimentální data byla vyhodnocena v programu Acorn proložením exponenciální funkcí pro určení jednotlivých rychlostních konstant spontánní deaktivace k_s . Analyzované křivky byly průměrem 50 měření.

3.5.6.3. Doba života singletového kyslíku

Kinetika vyhasínání singletového kyslíku byla monitorována při jeho charakteristické fosforescenci při 1270 nm $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$. Přechod je spinově zakázán, proto jsou kvantové výtěžky fosforescence menší než 10^{-4} [53]. K excitaci byl používán barvivový laser stejný jako v případě měření transienční absorpce. Po průchodu paprsku interferenčním filtrem (Laser Components) byla detekce prováděna Ge fotodiodou (Judson J-16-8SP-R05M-SH) a získaný signál byl po zesílení zaznamenáván na osciloskopu.

Interferenční filtr propouští kromě záření o $\lambda=1270$ nm také částečně červené záření, které přísluší fluorescenci TMPyP4T. Tato fluorescence trvá 7-10 ns a lze ji proto odlišit od déle trvající fosforescence 1O_2 . Vznik a zánik 1O_2

popisuje rovnice:



kde ${}^3\text{S}$ je tripletový excitovaný stav senzitizeru, ${}^3\text{O}_2$ kyslík v základním stavu. Následující rovnice platí pro $t > 5$ ns, kdy již nejsou přítomny tripletové stavy senzitizeru:

$$-d[{}^1\text{O}_2]/dt = k[{}^1\text{O}_2] \quad (21)$$

Matematickou úpravou lze získat rovnici jednoduché exponenciální funkce:

$$[{}^1\text{O}_2] = [{}^1\text{O}_2]_{t=0} \times \exp(-kt) \quad (22)$$

Rozpadové křivky byly získány průměrem 1000 měření. Signál singletového kyslíku byl vyhodnocen v programu OriginPro 7.5 proložením exponenciální funkcí.

3.6. Imobilizace molekul metodou sol-gel

3.6.1. Příprava a předpolymerace TMOS

TMOS (tetramethoxysilan) skladovaný při 4°C, byl vytemperován na laboratorní teplotu a do 25 ml kádinky bylo suchou Pasteurovo pipetou odváženo 4,1 g. Poté byly přidány 2 ml deionizované vody a směs byla vychlazená na 4°C. K vychlazené směsi bylo za stálého míchání pomalu přikapáváno 0,5 ml 0,1M HCl. Poté byla směs rychle zchlazená na cca 4°C (pro zpomalení polymerační reakce) a dále míchána po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byla směs ponechána 24 hodin při 4°C. Vzniklý předpolymer byl skladován při -15°C, pro zastavení polymeračních reakcí.

3.6.2. Příprava skleněných nosičů pro imobilizaci

Molekuly senzitivátoru byly imobilizovány v sol-gelové matrici na podložních mikroskopických sklíčkách, upravených na velikost kyvety, na dně Erlenmayerových baněk nebo na skleněné misky o vnějším průměru 3,5 cm (průměr víčka 4 cm). Před použitím byly nosiče očištěny postupem zahrnující:

1. Otření ethanolem
2. Otření acetonem
3. Otření toluenem
4. Ponoření nosiče do 1M NaOH (cca 18 hodin)
5. Opláchnutí nosiče destilovanou a deionizovanou vodou
6. Ponoření nosiče do ultrazvukové lázně (20 minut)
7. Sušení nosiče 2 hodiny při 120°C

Takto ošetřené skleněné nosiče mají na svém povrchu maximum -OH skupin a poskytují tak nejlepší možnost pro vazbu TMOS a TEOS matric [54].

3.6.3. Příprava tetraethoxysilanových (TEOS) vrstev s TMPyP

Tetraethoxysilan byl smíchán s etanolem v poměru 1:1, po té byl po dobu 1 hodiny zahříván na teplotu 60 °C za stálého míchání. Po 1 hodině byl přidán nasycený roztok TMPyP rozpuštěného v deionizované H₂O. Roztok byl promíchán po dobu 5 min. Následně byla mikroskopická podložní skla, upravená na velikost kyvety, potažená metodou "dip coating". Mikroskopická podložní skla byla následně sušena po dobu 24 hodin při teplotě 75 °C.

3.6.4. Příprava tetramethoxysilanových (TMOS) vrstev s TMPyP

Příprava tetramethoxysilanových vrstev probíhala na dno Erlenmayerových baněk nebo na mikroskopická podložní skla upravená na velikost kyvety.

Vlastní imobilizace probíhala v těchto krocích:

1. V plastové zkumavce byla smíchána směs předpolymerovaného TMOSu a TMPyP (fyziologického roztoku nebo destilované H₂O) objemovém poměru 1:1 a řádně promíchána na vortexu.
2. Ke směsi byl přidán 0,5 M NaOH (poloviční objem pipetovaného TMOSu) a směs byla opět promíchána na vortexu.
3. Směs byla vylita na sklíčko nebo do Erlenmayerovy baňky.
4. Po zatuhnutí (cca 1-2 minuty) byla vrstva převrstvena daným roztokem, aby nedocházelo k jejímu vysychání.

V období mezi měřeními byly vrstvy uchovávány v ledničce při cca 10°C ponořené ve fyziologickém roztoku

3.6.5. Příprava polydimethylsiloxanových (PDMS) vrstev s TPP

Proces syntézy pro polydimethylsiloxanové matrice byl proveden smícháním dvou složek, předpolymeru (Dow Corning, RTV 615A) a cross-linkeru (Dow Corning, RTV 615B) v poměru 10:1 v toluenu. Roztok byl připraven tak, aby celková objemová koncentrace toluenu byla 80 %.

Před přidáním TPP bylo nutno provést předpolymeraci. Jako katalyzátor polymerace působí kyselina chloroplaticitá. Přidáním porfyrinu by došlo k tvorbě metalokomplexu a k zastavení reakce. Předpolymerace probíhala při 60 °C po dobu 45 min. Poté byl přidán nasycený roztok TPP v toluenu, tak aby celková koncentrace nepřesáhla 2×10^{-5} M (při vyšší koncentraci dochází k precipitaci TPP v matrici). Roztok byl poté míchán 1 hodinu za pokojové teploty. Následovalo naliti roztoku na Petriho misky a 24 hodinová evaporace rozpouštědla z matrice. Po 24 hodinách byla matrice sušena při teplotě 80 °C po dobu 2 hodin.

3.7. Měření fotooxidačních vlastností

Sol-gel matrice s obsahem imobilizovaného senzitizeru byly nanесeny na podložní sklíčka 1 x 3 cm a vloženy do křemenné kyvety s příslušným substrátem. Křemenná kyveta byla umístěna do termostatovaného bloku a ozařována He-Ne laserem v pravidelných časových intervalech. Absorbance fotoproduktu byla odečtena na UV/VIS spektrofotometru.

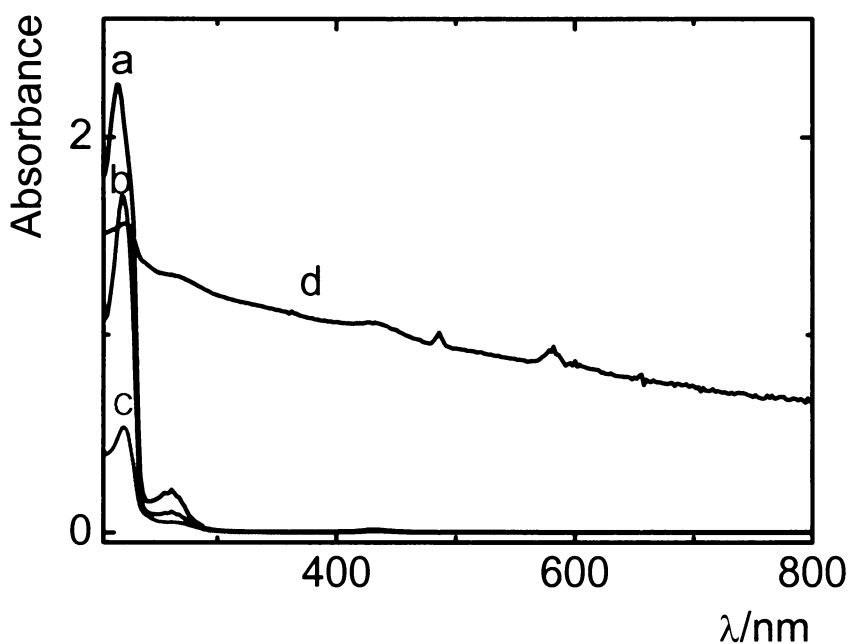
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Příprava matric

4.1.1. Vlastnosti TMOS matric s imobilizovaným kationtovým porfyrinem

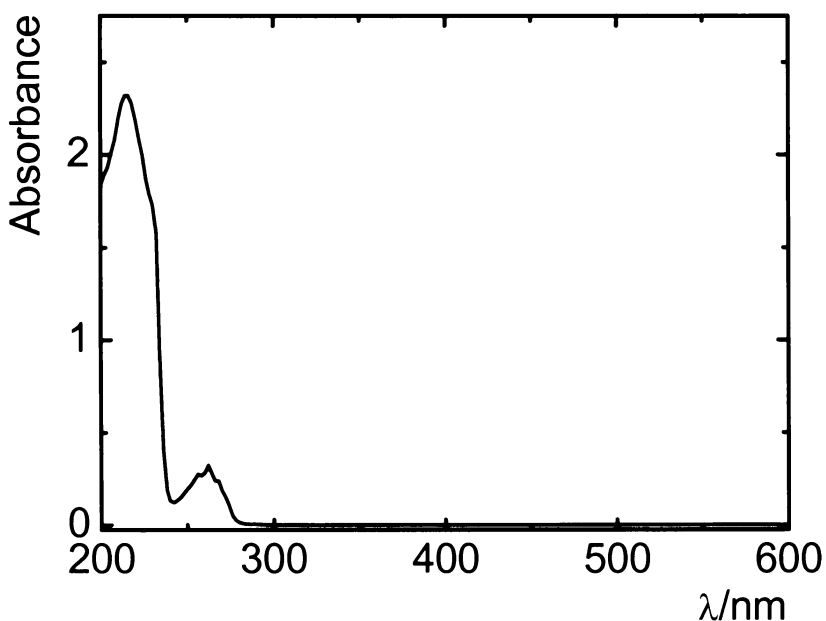
Byla řešena otázka, zda vodorozpustné kationtové porfyrinové senzitivátory imobilizované v TMOS matricích nejsou vyplavovány do vodného media. Jako modelový byl zvolen vodorozpustný kationtový TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici podle metodiky kapitola 3.6.4. 3 mm sol-gelové vrstvy TMOS s různou koncentrací imobilizovaného TMPyP na podložních sklíčkách 1 x 3 cm byly převrstveny 4 ml deionizované H₂O a ponechány stát jednu hodinu. Roztoky nad matricemi byl odebrány a byla změřena jejich absorpční spektra.

Na absorpčních spektrech nebyly zjištěny absorpční pásy odpovídající TMPyP a je tedy zřejmé, že ani při vysokých koncentracích imobilizovaného porfyriu v TMOS matricích nedochází k jeho uvolňování do vodného prostředí (obr.11). Jak je dále vidět z obr.11, při nižších koncentracích porfyriu dochází k rozpouštění matrice, které se projeví zakalením roztoku nad ní a spektroskopicky zvýšením absorpce pozadí. Je možné že, porfyriny přítomné při tvorbě matrice zvyšují počet míst, kolem kterých probíhá spojování koloidních částic předpolymeru, a tím zvyšují pevnost matrice. Obdobný efekt byl pozorován při imobilizaci, jiných organických látek, ale i u bakterií *Pseudomonas fluorescens* HK44 [55].



Obr.11: Soudržnost matrice v závislosti na koncentraci imobilizovaného TMPyP. Absorpční spektrum vodného roztoku nad TMOS matricí s imobilizovaným TMPyP. $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ TMPyP (a), $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ TMPyP (b), $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ TMPyP (c), $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ TMPyP (d) .

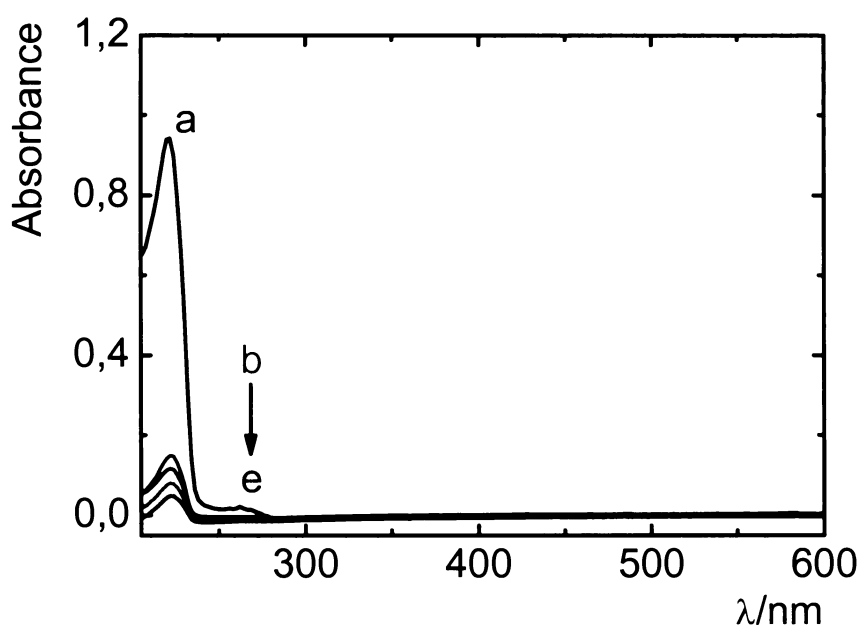
Na obr.11 je patrný absorpční pás při $\lambda=220 \text{ nm}$ odpovídající toluen-4-sulfonátu (obr.12).



Obr.12: Absorpční spektrum $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ toluen-4-sulfonátu v destilované H_2O .

Zatímco kationtový porfyrin TMPyP je zadržován v matrici elektrostatickými interakcemi mezi kladně nabitými periferními skupinami TMPyP a záporně nabitými skupinami sol-gelu [54], je kontraanion toluen-4-sulfonát vyplavován do roztoku nad matricí vlivem elektrostatické repulze.

Opakovaným promýváním TMOS matrice s imobilizovaným TMPyP deionizovanou vodou se potvrdil předpoklad, že po vyplavení toluen-4-sulfonátu do vodného roztoku nastává rovnováha mezi toluen-4-sulfonátem v roztoku a v matrici. Při porušení rovnováhy dochází k dalšímu vyplavení toluen-4-sulfonátu z matrice (obr.13).



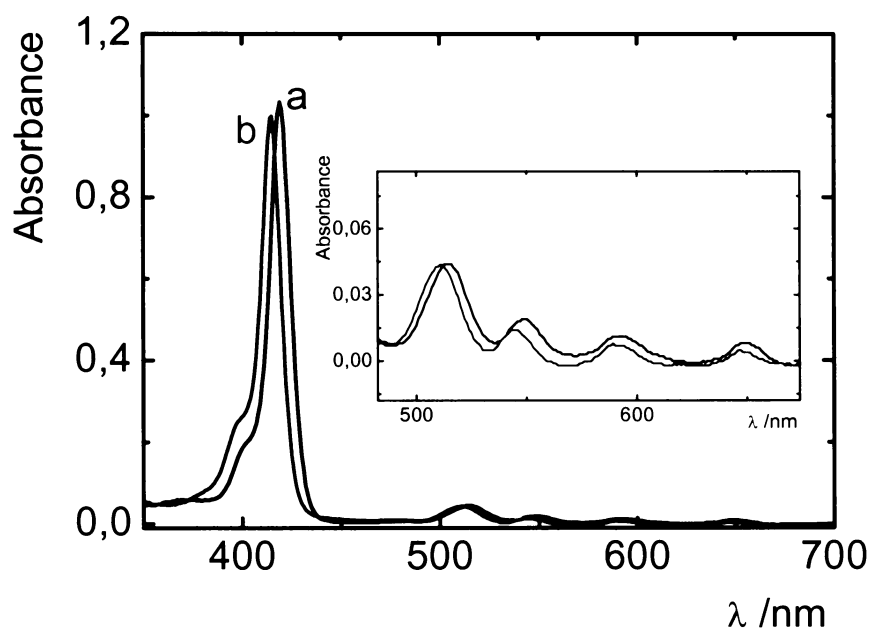
Obr.13: Absorpční spektrum vodného roztoku nad vrstvou TMOS s imobilizovaným TMPyP po 1.promytí (a), 2.promytí (b), 3.promytí (c), 4.promytí (d), 5.promytí deionizovanou H₂O (e).

4.1.2. Vliv immobilizace do matrice na elektronová absorpční spektra porfyrinů

Elektronová absorpční spektra roztoků TMPyP byla měřena v rozsahu vlnových délek $\lambda = 350 - 700$ nm v destilované H_2O , TPP byl měřen ve stejném rozsahu v toluenu v křemenné kyvetě. Pro měření vodných roztoků TMPyP byly použity plastové kyvety z důvodu adsorpce TMPyP na stěnu křemenných kyvet.

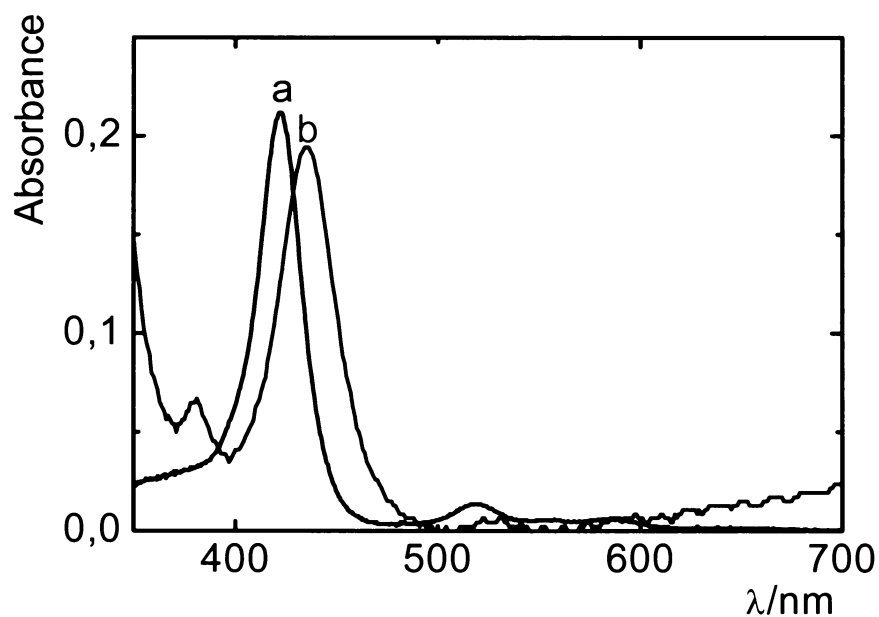
Sol-gel matrice s immobilizovaným porfyrinem byly nanесeny na podložní mikroskopická sklíčka (kapitola 3.6.4.) a po zafixování v kyvetovém prostoru spektrofotometru byla měřena jejich absorpční spektra.

Immobilizace TPP do PDMS matrice má za následek hypsochromní posun Soretova pásu a Q – pásů, jak je vidět na obr.14. Při vyšších koncentracích TPP dochází, po evaporaci toluenu z PDMS matrice, k precipitaci TPP.



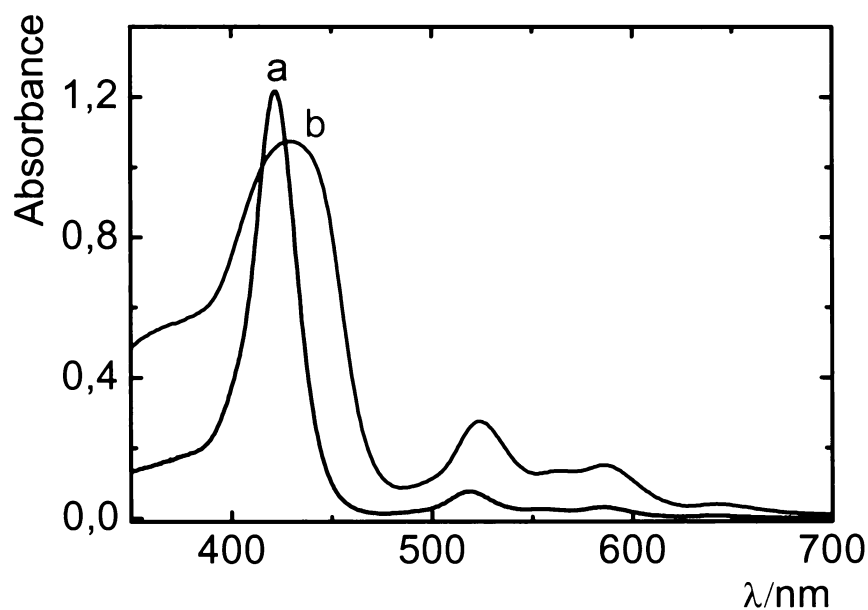
Obr.14: Absorpční spektrum 4×10^{-6} M TPP v toluenu (a), immobilizovaného v PDMS matrici (b). Vložený obrázek: Absorpční spektrum Q-pásů 4×10^{-6} M TPP.

Byla též testována imobilizace kationtového TMPyP do TEOS matrice. V tomto případě došlo k výraznému bathochromní posunu Soretova pásu (obr.15).



Obr.15: Absorpční spektrum 1×10^{-6} M TMPyP v destilované H_2O (a), imobilizovaného v TEOS matrici (b).

Imobilizace TMPyP do TMOS matrice má za následek výrazné rozšíření a bathochromní posun Soretova pásu (obr.16).



Obr.16: Absorpční spektrum 5×10^{-6} M TMPyP v destilované H_2O (a), imobilizovaného v TMOS matrici (b).

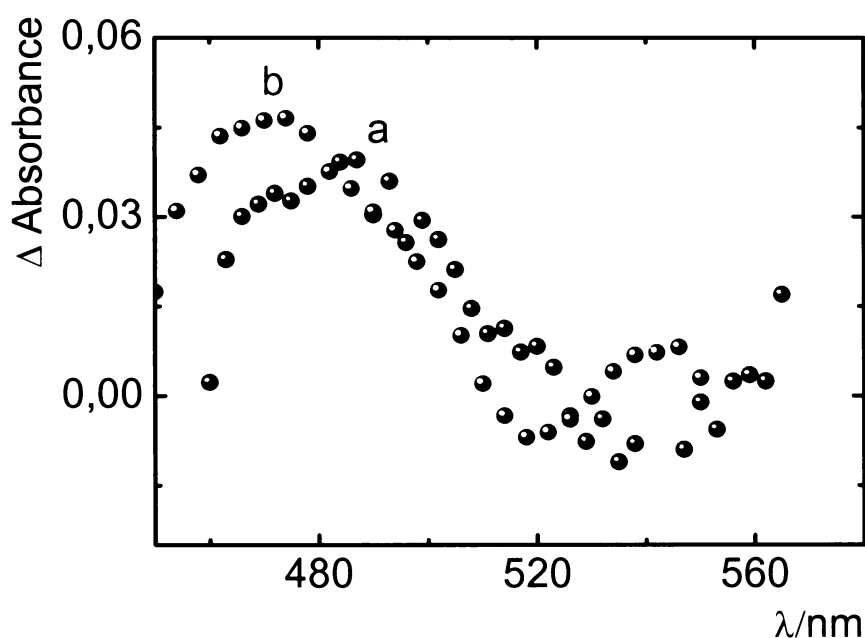
Spektrální posuny imobilizovaného TPP a TMPyP v sol-gelových maticích se zatím nepodařilo uspokojivě vysvětlit.

4.2. Fotofyzikální vlastnosti vrstev

4.2.1. Časově rozlišená spektra

U TMPyP ve vodném roztoku a TMPyP imobilizovaném v TMOS matrici byla změřena časově rozlišená triplet-tripletová (T-T) spektra metodou laserové zábleskové fotolýzy popsanou v kapitole 3.5.6.1.

Z diferenčního absorpčního spektra byla určena maxima příslušející T-T přechodům. Z naměřeného spektra plyne, že imobilizace TMPyP má za následek bathochromní posun maxima diferenčního absorpčního spektra (obr.17). Maximum pro TMPyP v roztoku bylo nalezeno při vlnové délce $\lambda = 470$ nm, pro TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici při $\lambda = 490$ nm.

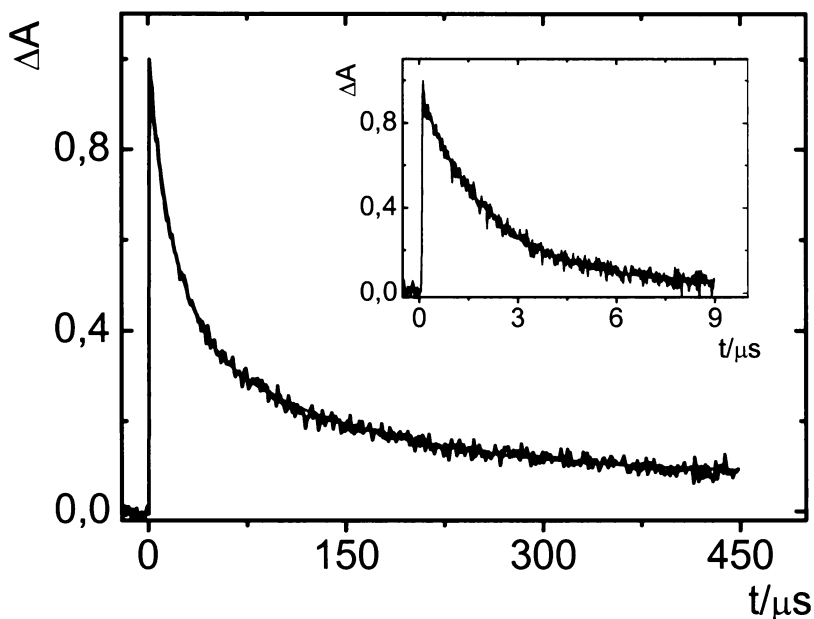


Obr.17: Diferenční absorpční spektrum příslušející T-T přechodům porfyriu TMPyP imobilizovaném v TMOS matrici v čase 22 μ s po excitačním laserovém pulsu (a), v deionizované H₂O v čase 124 ns po excitačním laserovém pulsu (b).

4.2.2. Kinetika excitovaných tripletových stavů a singletového kyslíku

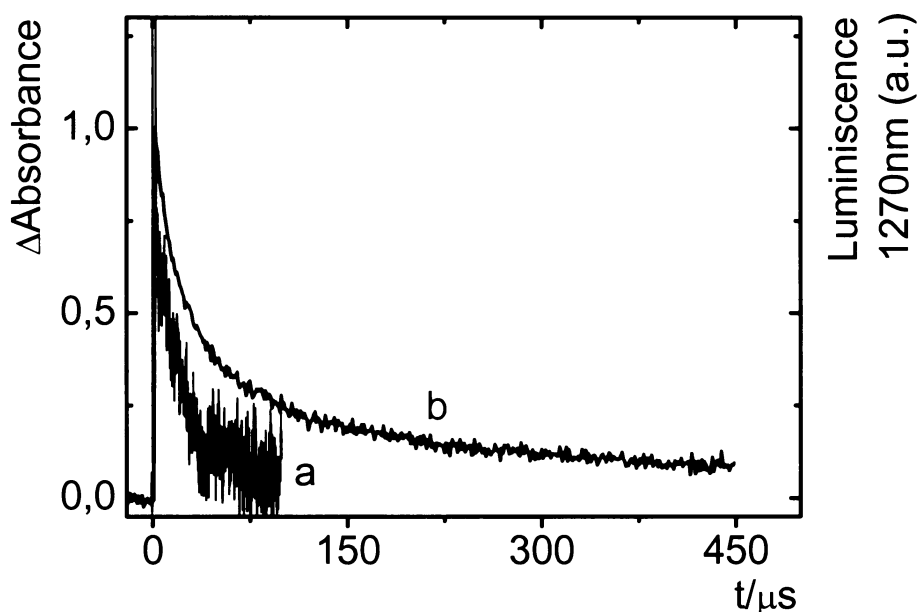
Kinetika excitovaných stavů TMPyP v roztoku i imobilizovaném stavu v TMOS matrici byla analyzována podle metody popsané v kapitole 3.5.6.2. Časové závislosti absorbance tripletových stavů byly měřeny v maximech odečtených z diferenčních absorpčních spekter (obr. 17) jako průměr z 50 měření.

Zatímco kinetická stopa TMPyP v roztoku vykazuje monoexponenciální charakter s dobou života $\tau_T = 2.1 \mu\text{s}$, (obr.18, vložený obrázek) u TMPyP imobilizovaného v matrici má mnohem složitější charakter a ukazuje na excitované tripletové stavy s různou dobou života. Z kinetických stop TMPyP v roztoku a imobilizovaného v matrici vyplývá podstatně delší doba života tripletových stavů v případě imobilizovaného porfyriu (obr.18).



Obr.18: Závislost absorbance tripletového stavu TMPyP na čase po laserovém pulsu. 4×10^{-6} M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici (a). Vložený obrázek: 4×10^{-6} M TMPyP v deionizované H_2O (b).

Pomocí časově rozlišené luminiscence (kapitola 3.5.6.3.) byla též sledována produkce singletového kyslíku u TMPyP imobilizovaném v TMOS matrici. Jak vyplývá z obr.19, singletový kyslík je produkován zhášením pouze části tripletových stavů TMPyP. Dlouhá doba života tripletových stavů TMPyP imobilizovaných zřejmě uvnitř matrice je evidentně dána tím, že dochází k omezené difúzi kyslíku k excitovaným tripletovým stavům v matrici a tedy k omezenému zhášení excitovaných tripletových stavů kyslíkem.

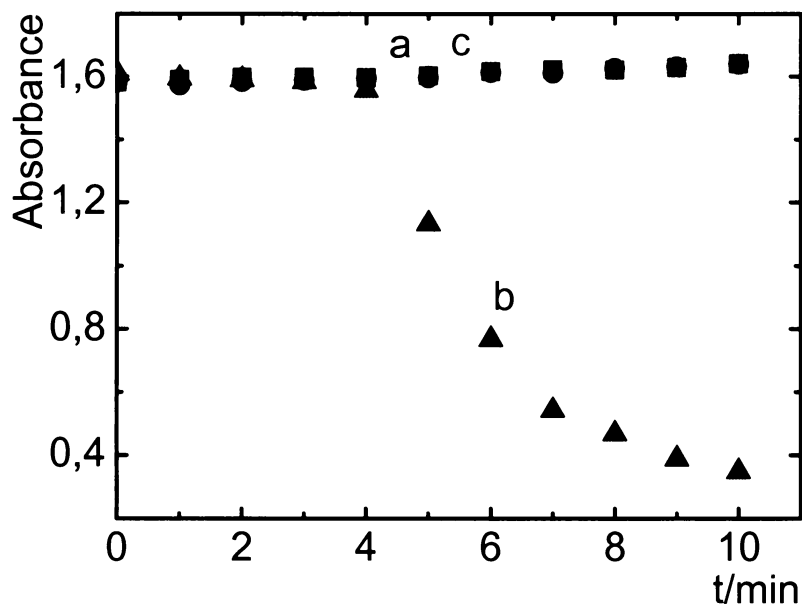


Obr.19: Porovnání kinetiky deaktivace singletového kyslíku (a, pravá osa) a tripletového stavu TMPyP v TMOS matrici (b, levá osa). 4×10^{-6} M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici.

4.3. Vliv matrice na agregaci porfyrinů

Řada ve vodě rozpustných porfyrinů a metaloporfyrinů tvoří ve vodných roztocích agregované částice. Agregace porfyrinů je spojena se změnou v jejich absorpčních a fluorescenčních spektrech. Soretův pás „face-to-face“ (H-typ) agregátů je modře posunut, zatímco u agregátů typu „edge-to-edge“ (J-typ) červeně [25]. Je např. známo, že kationtový senzitivátor TMPyP agreguje ve vodném prostředí v přítomnosti I_3^- , se kterým vytváří omezeně rozpustné iontové páry TMPyP – $(I_3^-)_4$. Trijodidový kontraanion může být generován i fotodynamickou reakcí, oxidací jodidu singletovým kyslíkem [50] viz kapitola 3.5.4. Ozáření TMPyP v jodidovém vodném roztoku tedy se dosáhne jeho nespecifické agregace, projevující se typickým rozšířením Soretova pásu s hypochromním efektem.

Pro fotodynamické reakce je agregace nežádoucím jevem neboť zháší excitované stavy senzitivátorů a tím následně zamezuje produkci singletového kyslíku. Byla proto testována možnost zamezit agregaci porfyrinových senzitivátorů jejich imobilizací do sol-gelových matic. Za tímto účelem byl proveden následující pokus. 4×10^{-6} M TMPyP či TPPS4 v 0,1 M KI byl ozařován He-Ne laserem ($\lambda_{exc} = 543$ nm). Jak je vidět z obr.20a,b kationtový TMPyP v průběhu ozařování vykazuje značný hypochromní efekt Soretova pásu indikující rozsáhlou agregaci, zatímco aniontový TPPS4 za stejných experimentálních podmínek neagreguje. TMPyP imobilizovaný v TMOS rovněž nevykazoval agregaci (obr. 20c). Podobný efekt byl nalezen u TEOS matrice. Po imobilizaci porfyrinů do sol-gel matrice dochází k jeho enkapsulaci, která zjevně brání jejich volnému pohybu a tedy i agregaci porfyrinů vlivem okolního prostředí.



Obr.20: Absorpční změny Soretova pásu během ozařování 5 mW He-Ne laserem. 4 μ M TPPS4 při 412 nm v 0,1 M KI (a), 4 μ M TMPyP při 422 nm v 0,1 M KI (b), TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici při 430 nm (c). Matrice byla nanášena na podložní sklíčka a ponořena v 0,1 M KI.

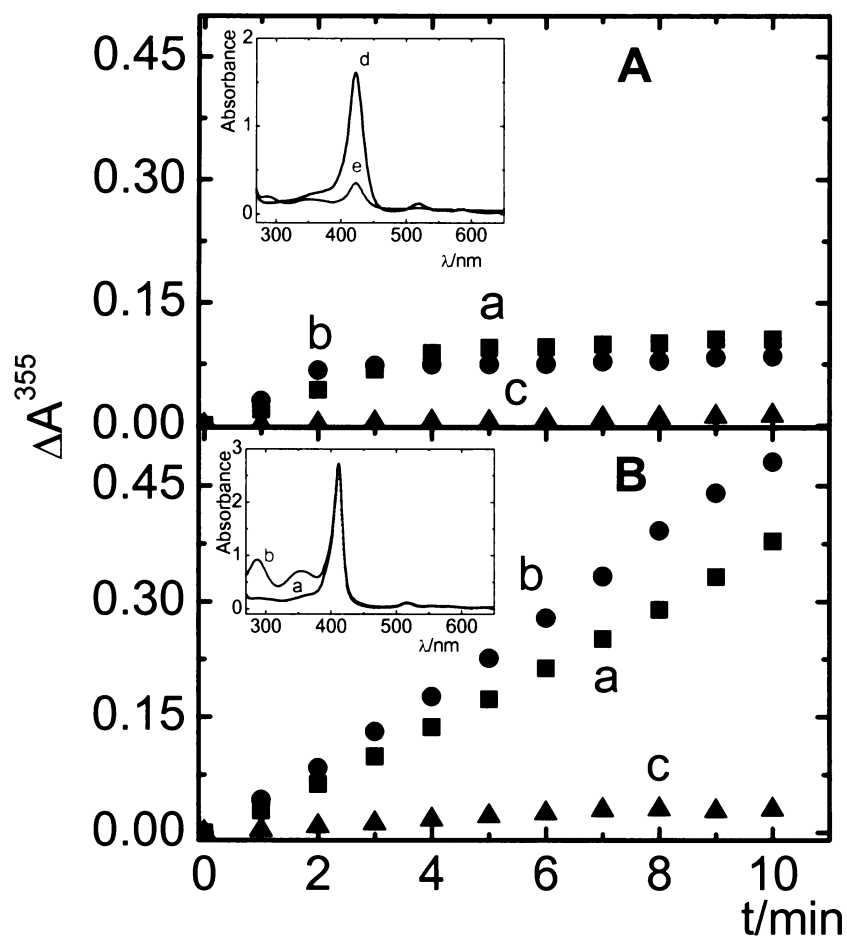
4.4. Fotooxidační vlastnosti matrice TMOS s imobilizovaným TMPyP

Bylo zjišťováno, zda $^1\text{O}_2$ fotogenerovaný TMOS matricí s imobilizovaným TMPyP má schopnost oxidovat nízkomolekulární látky v roztoku nad matricí. Jako modelové substráty byly zvoleny I^- , tryptofan a RNO v přítomnosti histidinu. Oxidace I^- a RNO v přítomnosti histidinu jsou používané v chemických metodách detekce singletového kyslíku [50,52]. Produkce singletového kyslíku byla sledována spektrofotometricky jako nárůst absorpce I_3^- resp. pokles absorpce RNO při 440 nm v závislosti na době ozařování, v případě tryptofanu jako pokles absorpčních pásů při $\lambda = 216$ a 280 nm.

4.4.1. Fotooxidace I^-

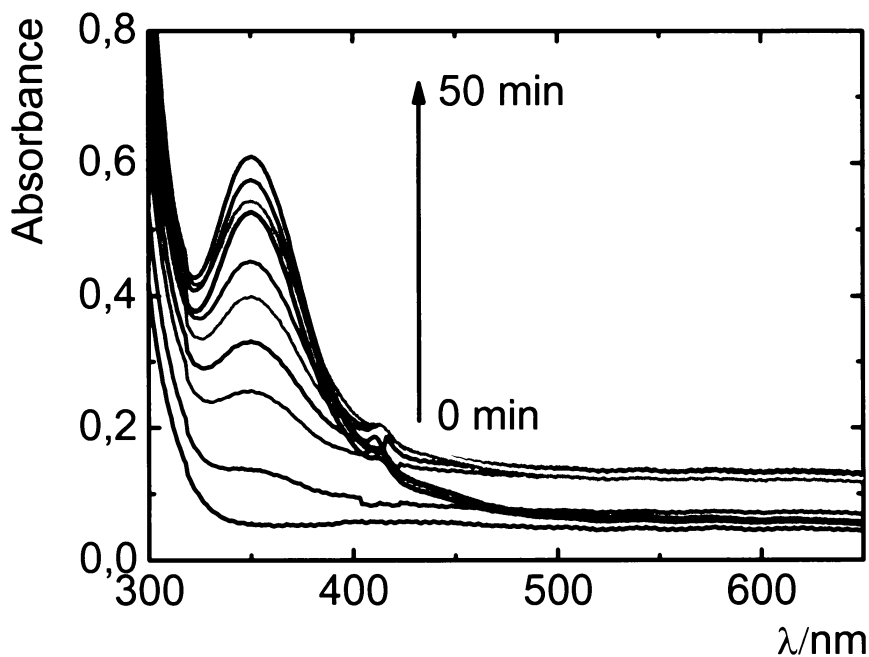
V souladu s předpokladem imobilizovaný TMPyP v TMOS matrici oxiduje I^- na I_3^- . Vznik singletového kyslíku fotodynamickou cestou u použitých senzitizerů byl ověřen (společně s detekcí charakteristické fosforescence při $\lambda = 1270$ nm) pokusy s NaN_3 a D_2O . Azid sodný patří mezi fyzikální zhášedce singletového kyslíku [21] a jeho přidání k ozařované směsi brání oxidaci akceptoru (substrátu). V D_2O má singletový kyslík cca 16x delší dobu života než v H_2O . To se projeví vyšší koncentrací oxidovaného substrátu.

Jak je vidět na obr.21 u kationtového TMPyP i aniontového TPPS4 roste absorpce I_3^- s dobou ozařování. Akcelerace produkce I_3^- je zesílena v D_2O a potlačena v NaN_3 . Z obr.21A plyne, že po cca 4 minutách ozařování, se produkce singletového kyslíku zastavuje u kationtového TMPyP z důvodu již zmíněné indukované agregace.

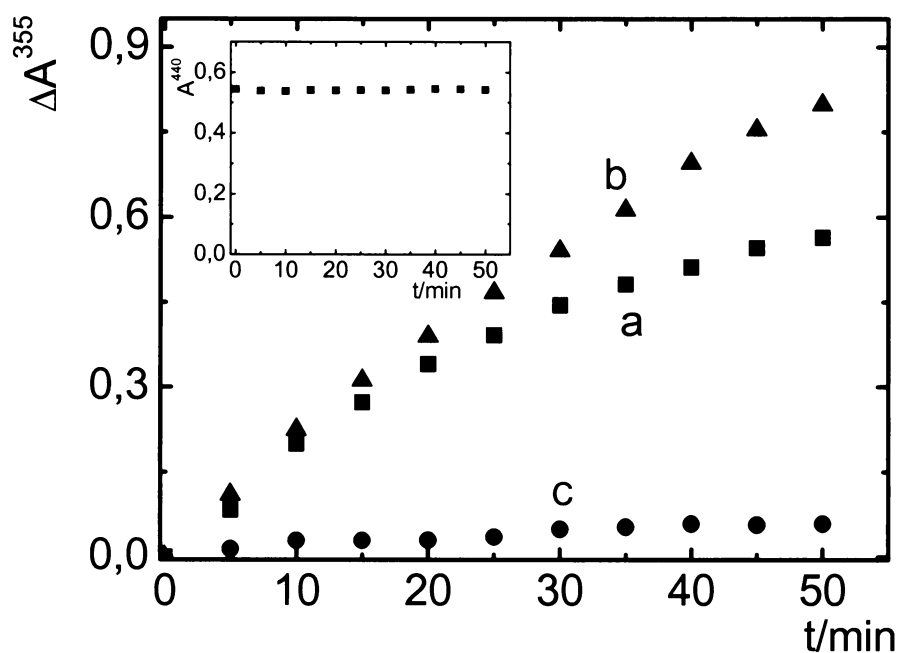


Obr.21: Závislost absorbance I_3^- na době ozařování 4×10^{-6} M TMPyP (A) resp. TPPS4 (B) 4×10^{-6} M v jodidovém detekčním činidle s obsahem H_2O (a) s obsahem D_2O (b) s obsahem H_2O v přítomnosti 0,1M NaN_3 (c). Vložené obrázky: UV/VIS spektra roztoků porfyrinů v jodidovém činidle před (d) a po (e) 10 minutovém ozařování He-Ne laserem.

Oproti vodnému roztoku TMPyP imobilizovaný v matrici TMOS nevykazuje indukovanou agregaci I_3^- ani po 50 minutách ozařování (obr.22,23). Produkce I_3^- v čase ozařování není zcela lineární, ale je opět zesílena přítomností D_2O a potlačena přítomností NaN_3 . Za shodných experimentálních podmínek ve tmě nebyly pozorovány žádné spektrální změny. Z toho plyne, že TMPyP imobilizovaný v matrici TMOS produkuje singletový kyslík na základě fotodynamické reakce a že je v dostatečném kontaktu s chemickým okolím matric včetně rozpuštěného kyslíku. Matrice ale brání pohybu kationtového porfyriu a tedy jeho indukované agregaci a tím udržuje imobilizovaný porfyrin v fotodynamicky aktivním stavu.

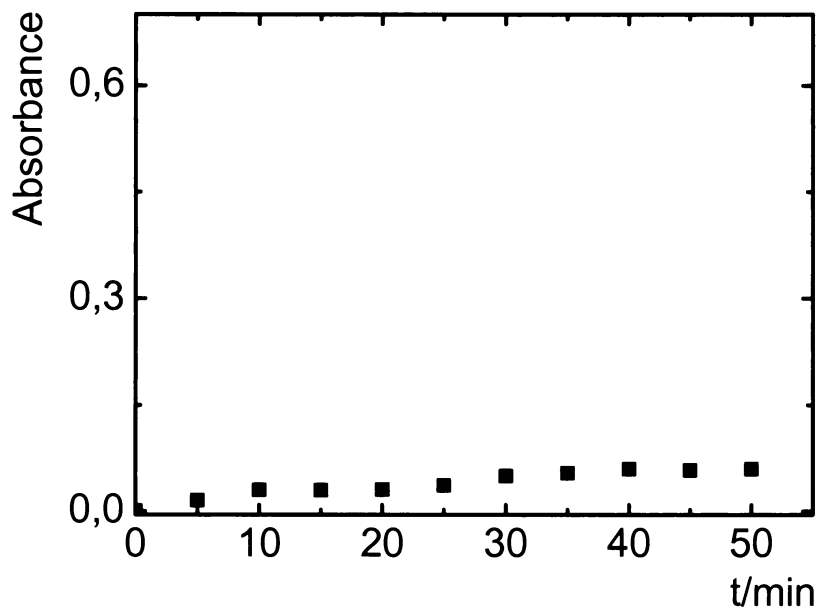


Obr.22: Absorpční spektra supernatantu po ozařování $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ TMPyP imobilizovaném v TMOS matrici v jodidovém detekčním činidle He-Ne laserem 0-60 min.



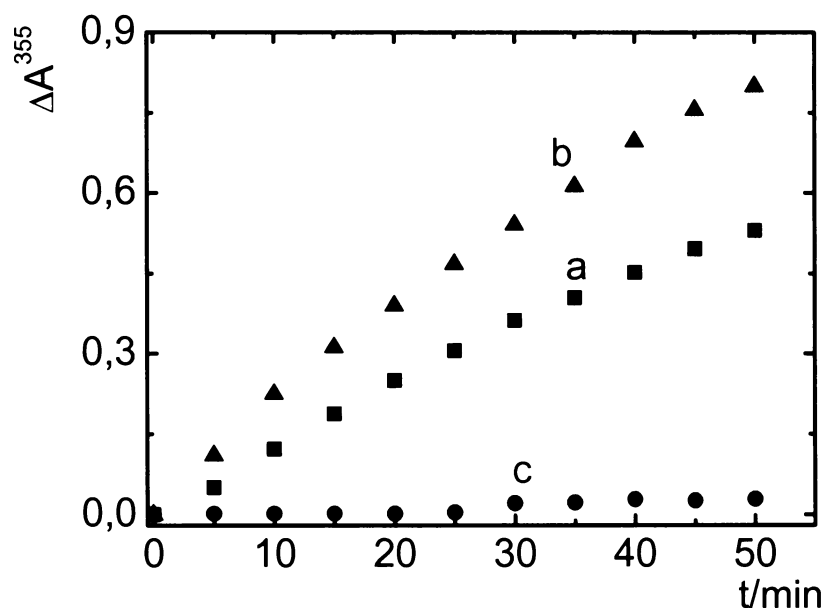
Obr.23: Produkce I_3^- během ozařování 4×10^{-5} M TMPyP imobilizovaného v TMOS matrici ponořené do jodidového detekčního činidla v H_2O (a) v D_2O (b) v H_2O v přítomnosti $0,1M$ NaN_3 (c). Vložený obrázek: Konstantní absorbance Soretova pásu při 440 nm imobilizovaného TMPyP během doby ozařování.

Byla též testována možnost imobilizovat kationtový TMPyP v matrici TEOS. Jak je ale vidět z obr.24 produkce I_3^- během doby ozařování je minimální. To je patrně dáno nízkou porozitou matrice, která brání kontaktu imobilizovaného TMPyP s molekulárním kyslíkem nebo jodidem.



Obr.24: *Produkce I_3^- během ozařování 4×10^{-5} M TMPyP imobilizovaného v TEOS matrici ponořené do jodidového detekčního činidla.*

Rovněž byla testována možnost imobilizace nepolárního TPP do PDMS matrice. Podle předpokladu též imobilizovaný TPP produkuje při ozařování matrice singletový kyslík, jak vyplývá z obr.25.

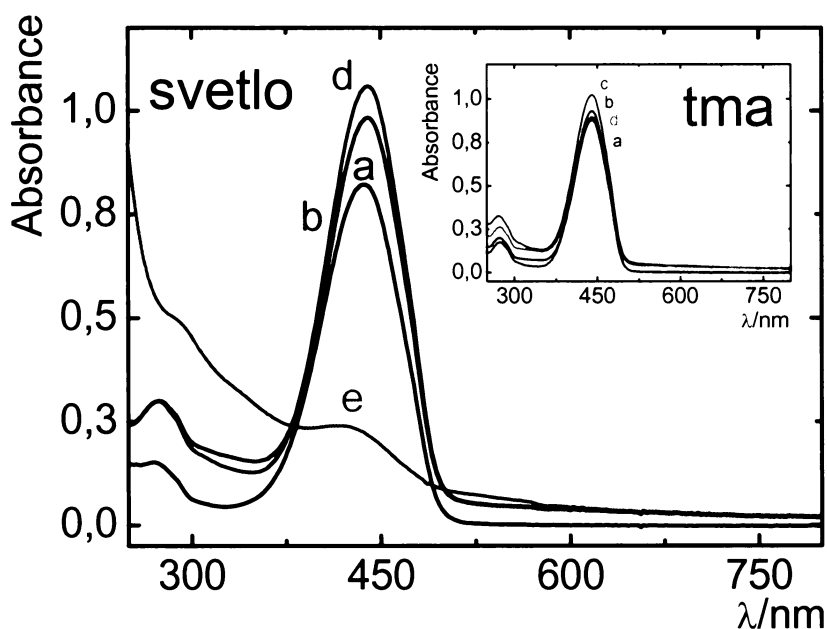


Obr.25: *Produkce I_3^- během ozařování 4×10^{-5} M TMPyP imobilizovaného v TMOS matrici ponořené do jodidového detekčního činidla s obsahem H_2O (a) s obsahem D_2O (b) s obsahem H_2O v přítomnosti 0,1M NaN_3 (c).*

4.4.2. Fotooxidace RNO v přítomnosti histidinu

Oxidace RNO singletovým kyslíkem v přítomnosti histidinu je popsána v kap. 3.5.5. Metodika přípravy sol-gel matric s TMPyP a fotooxidační test je popsán v kap. 3.6. a 3.7.

Obr.28 znázorňuje absorpční spektra roztoku RNO nad matricí po hodině ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou. Je patrné, že pouze u systému TMPyP imobilizovaného v TMOS matrici s roztokem histidinu nad matricí vede k odbarvení roztoku RNO. Pro ověření vzniku singletového kyslíku fotodynamickou reakcí byl proveden stejný pokus ve tmě. Bez přístupu světla nedochází ke generaci singletového kyslíku vedoucí k oxidaci histidinu a následné oxidaci RNO. Mírný pokles absorbance RNO není způsoben oxidací, ale sorpcí matrice, jak ukázaly orientační pokusy (obr.26, vložený obrázek).

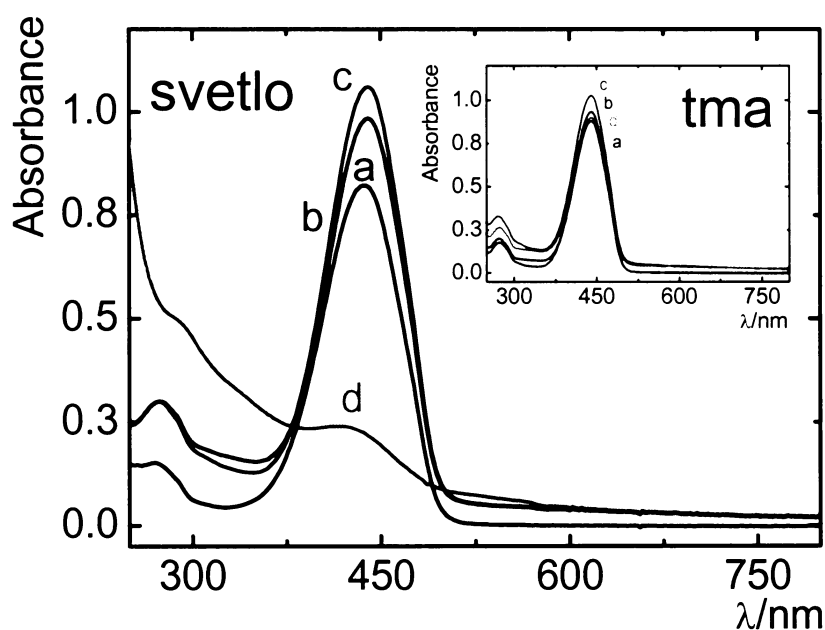


Obr.26: Absorpční spektrum 50 μM roztoku RNO v H₂O po hodině ozařování za přítomnosti: 4x10⁻⁵ M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici (a), TMOS matrice (b), TMOS matrice + 10⁻³ M histidin v H₂O (c), 4x10⁻⁵ M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici + 10⁻³ M histidin v H₂O (d). Vložený obrázek: kontrolní pokusy ve tmě.

4.4.2. Fotooxidace RNO v přítomnosti histidinu

Oxidace RNO singletovým kyslíkem v přítomnosti histidinu je popsána v kap. 3.5.5. Metodika přípravy sol-gel matric s TMPyP a fotooxidační test je popsán v kap. 3.6. a 3.7.

Obr.28 znázorňuje absorpční spektra roztoku RNO nad matricí po hodině ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou. Je patrné, že pouze u systému TMPyP imobilizovaného v TMOS matrici s roztokem histidinu nad matricí vede k odbarvení roztoku RNO. Pro ověření vzniku singletového kyslíku fotodynamickou reakcí byl proveden stejný pokus ve tmě. Bez přístupu světla nedochází ke generaci singletového kyslíku vedoucí k oxidaci histidinu a následné oxidaci RNO. Mírný pokles absorbance RNO není způsoben oxidací, ale sorpcí matrice, jak ukázaly orientační pokusy (obr.26, vložený obrázek).



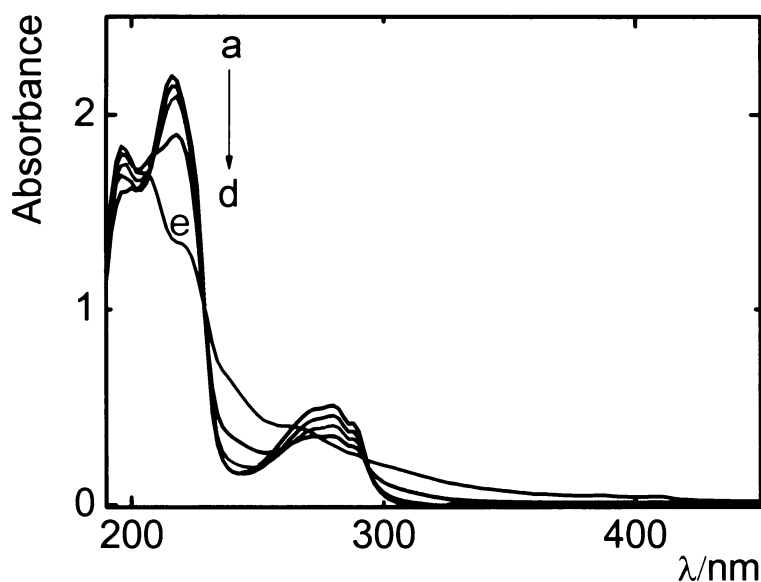
Obr.26: Absorpční spektrum 50 μM roztoku RNO v H₂O po hodině ozařování za přítomnosti: 4x10⁻⁵ M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici (a), TMOS matrice (b), TMOS matrice + 10⁻³ M histidin v H₂O (c), 4x10⁻⁵ M TMPyP imobilizovaný v TMOS matrici + 10⁻³ M histidin v H₂O (d). Vložený obrázek: kontrolní pokusy ve tmě.

4.4.3. Fotooxidace tryptofanu

Je známo, že tryptofan patří mezi aminokyseliny podléhající oxidaci singletovým kyslíkem. Počáteční reakční kroky oxidace tryptofanu probíhají přes dioxyethan nebo endoperoxid (obr.2, str.6). U tryptofanu je typickým produktem N-formylkynurenin [14].

Jak je vidět z obr.27 fotooxidace tryptofanu se spektrálně projevuje především poklesem absorpčního pásu tryptofanu při $\lambda = 216$ a 280 nm a rozšířením absorpčního pozadí ukazující na pravděpodobnou směs oxidačních produktů včetně N-formylkynureninu, který absorbuje v oblasti $\lambda = 230 - 260$ nm. [14]

Za shodných experimentálních podmínek ve tmě nebyly pozorovány žádné spektrální změny.



Obr.27: Absorpční změny 10^{-4} M tryptofanu v deionizované H_2O v průběhu fotooxidace tryptofanu TMOS matricí s imobilizovaným TMPyP. 0 min (a), 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e) ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou.

4.5. Cytotoxické účinky TMOS matric s imobilizovaným TMPyP

V předchozích pokusech byla dokázána schopnost TMOS matric s imobilizovaným TMPyP generovat singletový kyslík a fotooxidovat nízkomolekulární látky. Je známo, že singletový kyslík generovaný senzitivátory ve vodných roztocích má výrazné cytotoxické účinky [22,23].

U TMOS matric s imobilizovaným TMPyP byly zjišťovány cytotoxické účinky singletového kyslíku vůči kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60.

Do osmi vysterilizovaných Erlenmayerových baněk byla připravena sol-gelová vrstva TMOS, složení viz tab.3. Čtyři baňky obsahovaly v TMOS matrici imobilizovaný TMPyP, čtyři baňky sloužily jako kontrola (bez TMPyP).

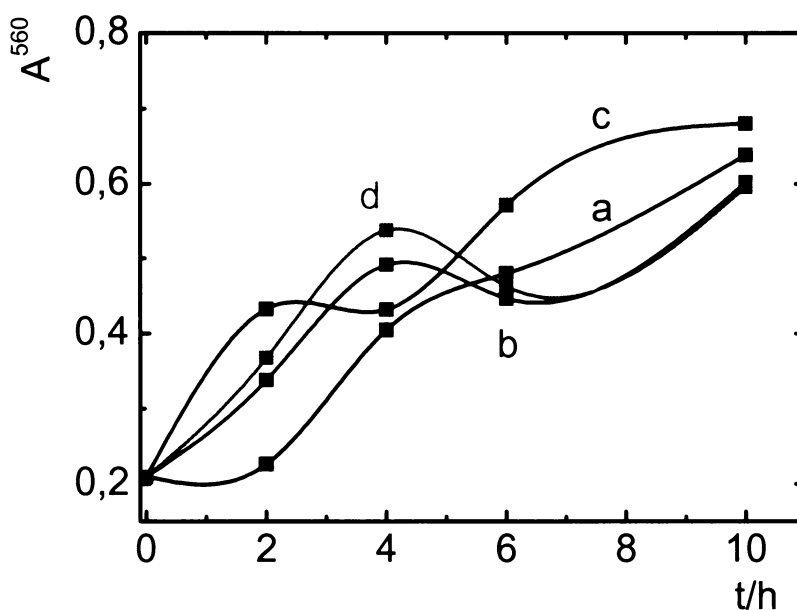
Tab.3. Složení použitých sol-gel matric.

| | TMOS | NaOH (0,05 M) | Fyz. Roztok | TMPyP (10^{-4} M) |
|----------------------|------|---------------|-------------|----------------------|
| Sol-gel | 1 ml | 0,5 ml | 1 ml | |
| Sol-gel + TMPyP4T | 1 ml | 0,5 ml | | 1ml |

Do čtyřech baněk obsahujících TMOS vrstvu s imobilizovaným TMPyP bylo napipetováno 10 ml fyziologického roztoku a 300 μ l buněčné suspenze *Saccharomyces cerevisiae* DMB 60. Dvě baňky byly obaleny alobalem, aby bylo zamezeno přístupu světla a tím generaci singletového kyslíku. Pro kontrolní pokus byly použity čtyři baňkami obsahujícími pouze TMOS, kde ve dvou baňkách bylo zamezeno přístupu světla. Všechny baňky byly umístěny do termostatovatelné třepačky a ozařovány dvě hodiny 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou, za rychlosti třepání 170 rpm a teploty $T = 30$ °C. Po skončení ozařování bylo do každé baňky přidáno 10 ml YPG media. Buňky byly dále kultivovány při stejné rychlosti protřepávání a stejné teplotě. Každé dvě hodiny byly sterilně odebírány vzorky do 0,5 ml křemenných kyvet a následně

změřen rozptyl vzorku při vlnové délce $\lambda = 560$ nm. Nárůst rozptylu při $\lambda = 560$ nm je přímo úměrný koncentrace buněk v roztoku [55].

Z obr.28 je patrné, že singletový kyslík produkovaný TMPyP imobilizovaným v TMOS matrici nemá cytotoxické účinky. To je nejspíše dáno krátkou dobou života singletového kyslíku. Krátká doba života singletového kyslíku současně znamená malý difúzní poloměr $^1\text{O}_2$. Během své doby života $^1\text{O}_2$ nedokáže difundovat z vnitřku matrice k povrchu a působit cytotoxicky na *Saccharomyces cerevisiae* DMB 60.



Obr.28: Růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 v čase po 2 hodinách ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou v přítomnosti TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP (a), kontrola: TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP bez ozáření (b), TMOS matrice (c), kontrola: TMOS matrice bez ozáření (d).

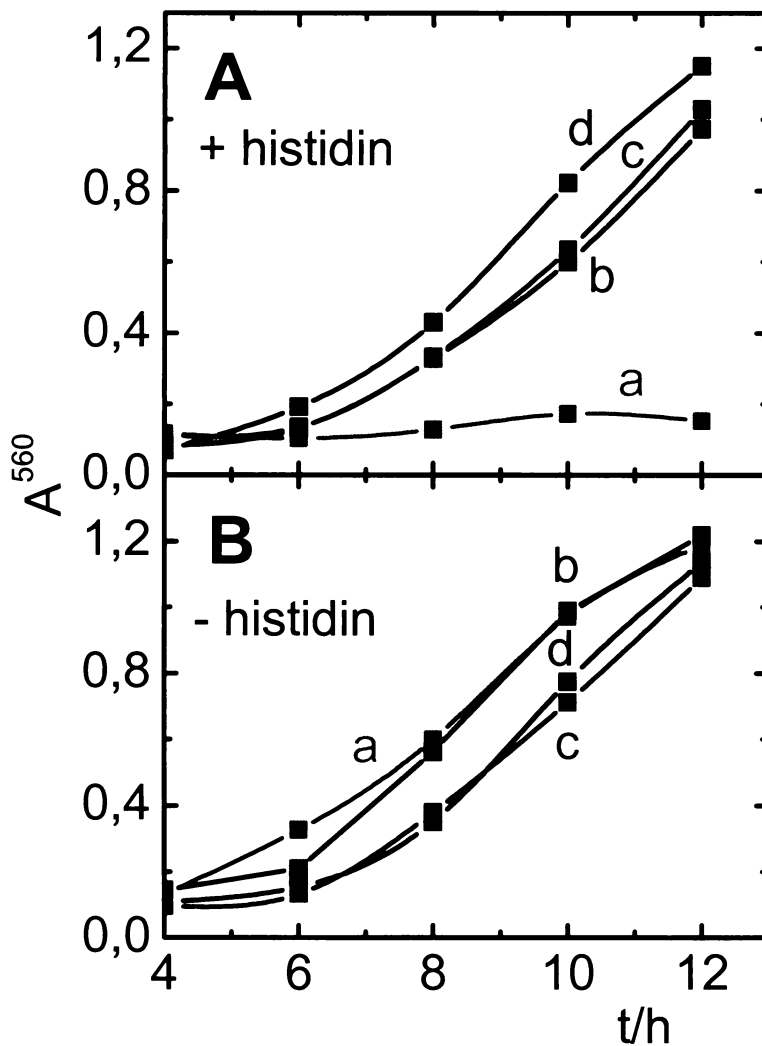
4.6. Cytotoxické účinky TMOS matric s imobilizovaným TMPyP v přítomnosti histidinu nebo tryptofanu

Jak již bylo ukázáno, matrice s imobilizovaným TMPyP fotooxidují prostřednictvím $^1\text{O}_2$ nízkomolekulární látky, ale nejsou cytotoxické ani na světle vůči *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60. Důvodem může být stérický efekt pórů v sol-gel matricích v kombinaci s krátkým difúzním poloměrem $^1\text{O}_2$. Velikost pórů v matricích je obtížné zjistit, ale lze předpokládat že umožní proniknout nízkomolekulárním substrátům dovnitř matric a oxidovat se $^1\text{O}_2$, na rozdíl od objemných makromolekul či zde použitých mikroorganismů.

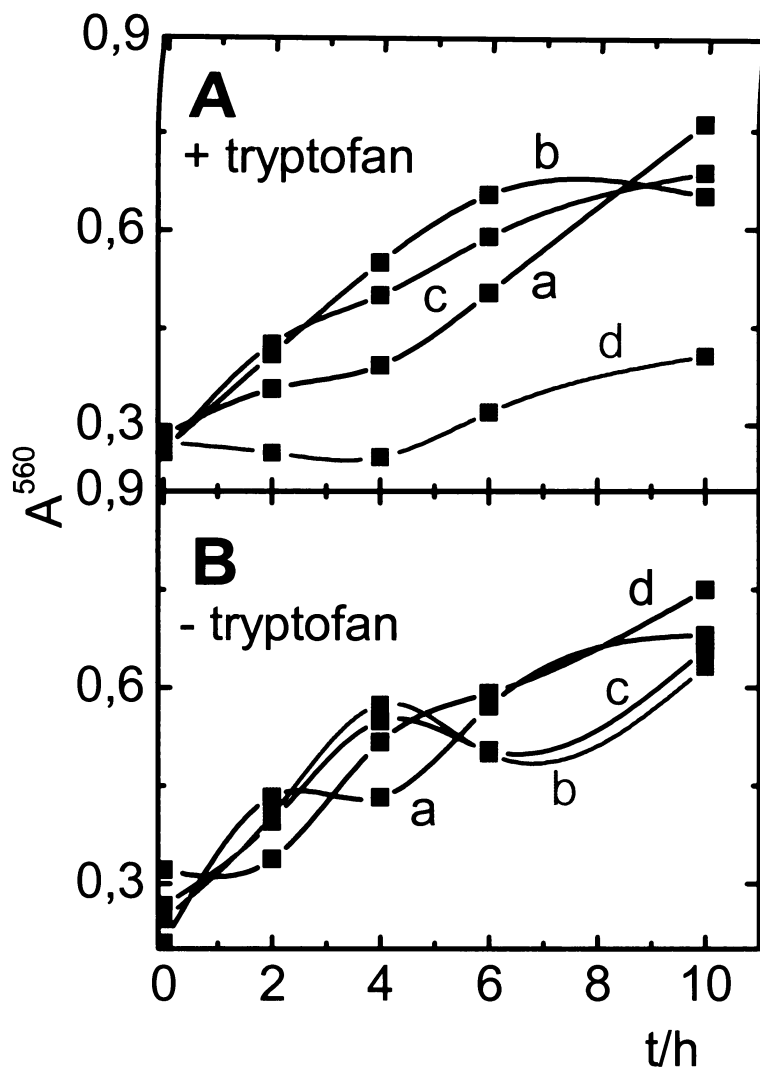
Byl proveden pokus s cílem zjistit, zda cytotoxicita nemůže být zprostředkována pomocí netoxických nízkomolekulárních substrátů schopných oxidovat se $^1\text{O}_2$ na toxické oxoprodukty. Jako modelové sloučeniny byly vybrány aminokyseliny histidin a tryptofan. Histidin tvoří reakcí se $^1\text{O}_2$ toxické endoperoxidy, tryptofan se oxiduje obvykle na směs oxoproduktů, včetně toxického N-formylkynureninu.

Metodika postupu přípravy pokusu byla stejná jako v kap. 4.5., pouze matrice TMOS s imobilizovaným TMPyP byly převrstveny roztokem 1×10^{-3} M histidinu resp. 1×10^{-3} M tryptofanu namísto fyziologického roztoku.

Jak ukazuje obr.29 a 30 přítomnost histidinu i tryptofanu v ozařovaných mediích měla výrazný toxický vliv a výrazně omezila či zastavila buněčný růst *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60.



Obr.29: Růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 v čase po 2 hodinách ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou v přítomnosti TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP (a), kontrola: TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP bez ozáření (b), TMOS matrice (c), kontrola: TMOS matrice bez ozáření (d). (A) v přítomnosti 1×10^{-3} M histidinu, (B) v nepřítomnosti.



Obr.30: Růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* DBM 60 v čase po 2 hodinách ozařování 300 W stabilizovanou halogenovou žárovkou v přítomnosti TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP (a), kontrola: TMOS matrice s imobilizovaným 4×10^{-5} M TMPyP bez ozáření (b), TMOS matrice (c), kontrola: TMOS matrice bez ozáření (d). (A) v přítomnosti 1×10^{-3} M tryptofanu, (B) v nepřítomnosti.

5. Závěr

V této práci byly zjištěny následující skutečnosti:

- i) Polární kationtový TMPyP i nepolární TPP senzitivátory lze metodikou popsanou v kap. 3.6. imobilizovat do tenkých transparentních porézních vrstev sol-gelových matric.
- ii) V případě kationtového TMPyP imobilizovaného do TMOS matric bylo prokázáno, že se porfyrin nevyplavuje z matrice do vodného prostředí. Kontraanion (toluen-4-sulfonát) není v matrici zadržován a je vyplavován do vodného prostředí.
- iii) Imobilizované porfyrinové senzitivátory mají odlišné UV-VIS spektrální charakteristiky oproti roztokům a tyto formy lze tedy spektrálně rozlišit.
- iv) Tripletové excitované stavy imobilizovaného porfyrinu (TMPyP) mají výrazně delší doby života než v roztocích, z důvodu rigidizace molekul a omezenému přístupu nejdůležitějšího zhášeče tripletových stavů – kyslíku.
- v) Pomocí časově rozlišené spektroskopie, detekcí charakteristické fosforescence $^1\text{O}_2$ při $\lambda = 1270$ nm a dvěma chemickými metodami (Jodidová metoda a metoda odbarvování RNO) bylo prokázáno, že imobilizované senzitivátory při ozařování VIS světlem produkují singletový kyslík.
- vi) Imobilizace TMPyP v sol-gel matrici brání agregaci porfyrinového senzitivátoru indukované I_3^- . Agregace je nežádoucím jevem, neboť zháší excitované stavy senzitivátoru a tím omezuje/zastavuje produkci $^1\text{O}_2$. Bylo zjištěno, že imobilizovaný TMPyP je schopen produkovat $^1\text{O}_2$ i v přítomnosti látek, které ve vodných prostředích vedou k jeho agregaci.
- vii) Singletový kyslík produkovaný imobilizovanými senzitivátory je schopen oxidovat nízkomolekulární látky obsažené v převrstveném roztoku nad matricí (I^- , RNO, histidin, tryptofan)
- viii) Použité sol-gel matrice s imobilizovaným porfyrinem nejsou toxické ve tmě, ale ani na světle vůči testovaným kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. Důvodem proč ozařované matrice nevykazují cytotoxický efekt, přestože produkují cytotoxický $^1\text{O}_2$ je patrně skutečnost, že rozhodující podíl cytotoxického $^1\text{O}_2$ je fotogenerován uvnitř matric a vzhledem ke krátké době

života a tím malému difúznímu poloměru nepronikne k povrchu matric. Pozoruhodná je zejména skutečnost, že zatímco $^1\text{O}_2$ oxiduje nízkomolekulární látky, není cytotoxický (neoxiduje) vůči shora uvedeným kvasinkám. Rozhodujícím důvodem může být velikost a tedy filtrový efekt pórů v matricích. Velikost pórů je obtížné zjistit, ale lze předpokládat že umožní proniknou nízkomolekulárním látkám dovnitř matric a oxidovat se $^1\text{O}_2$, na rozdíl od objemných mikroorganismů.

ix) Toxicita matric s imobilizovaným senzitizerem vůči *Saccharomyces cerevisiae* může být zprostředkována nepřímo, je-li ve vodném mediu přítomna nízkomolekulární látka snadno se oxidující $^1\text{O}_2$ na toxický oxoprodukt. Tento efekt byl nalezen u dvou aminokyselin, histidinu a tryptofanu.

Lze předpokládat že shora uvedené poznatky budou užitečné při studiu imobilizovaných senzitizerů pro fotooxidační a fotodesinfekční aplikace.

6. SEZNAM LITERATURY

- [1] Nilsson R., Merkel P.B., Kearns D.R.: *Photochem. Photobiol.* 16, 117 (1972)
- [2] Schweitzer C., Schmidt R.: *Chem. Rev.* 103, 1685 (2003)
- [3] Aveline B.M., Redmont R.W.: *Photochem. Photobiol.* 69, 306 (1999)
- [4] Lissi E.A., Encias M.V., Lemp E., Rubio M.A.: *Chem. Rev.* 93, 699 (1993)
- [5] Benasasson R.V., Land E.J., Truscott T.G.: Oxford University Press, 101 (1993)
- [6] Mosinger J., Micka Z.: *Chemické listy* 88, 212 (1994)
- [7] Wilkinson F., Helman F.P., Ross A.B.: *J.Chem. Phys. Ref.Data* 24, 663 (1995)
- [8] Scurlock R.G., Nomell S., Braslavsky S.E., Ogyllby P.R.: *J. Phys. Chem.* 99, 3521 (1995)
- [9] Foote C.S., Clennan E.L.: *Active Oxygen in Chemistry* 2, 105 (1995)
- [10] Davies M.J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761-770 (2003)
- [11] Ochsner M.: *J. Photochem. Photobiol. B* 39, 1 (1997)
- [12] Kubát P., Lang K., Mosinger J., Wagnerová D.M.: *J. Phys. Chem.* 210, 243 (1999)
- [13] Tsentelovich Y.P., Snytnikova O.A., Sherin P.S., Forbes M.D.E.: *J. Phys. Chem. A* 109, 3565 (2005)
- [14] MacDonald I.J., Dougherty T.J.: *J. Porphyrins Phtalocyanines* 5, 105 (2001)
- [15] Nyman E.S., Hynninen P.H.: *J. Photochem. Photobiol. B* 73, 1 (2004)
- [16] Jemli M., Alouini Z., Sabbahi S., Gueddari M.: *J. Environ. Monitoring* 4, 511 (2002)
- [17] Waiwright M.: *Chem.Soc.Rev.* 31, 128 (2002)
- [18] Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J.H., Brown S.B.: *J. Photochem. Photobiol. Sci. B* 32, 159 (1996)
- [19] Lissi E.A., Encias M.V., Lemp E., Rubio M.A.: *Chem. Rev.* 93, 699 (1993)
- [20] Boyle R.B., Dolphin D.: *Photochem. Photobiol.* 64, 469 (1996)

- [21] Lang K., Mosinger J., Wagnerová D.M.: *Coordination Chem. Rev.* 248, 321 (2004)
- [22] Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B.: *J.Phys.Chem.Ref.Data* 22, 113 (1993)
- [23] Ali H., van Lier J.E.: *Chem.Rev* 99, 2379 (1999)
- [24] *Porphyrins and Metalloporphyrins*, edit. Smith K.M., Elsevier (1975)
- [25] Kano K., Fukada K., Wakami H., Nishiyabu R., Pasternack R.F.: *J.Am.Chem.Soc.* 122, 7494 (2000)
- [26] Ghiggino K.P., Bennett L.E., Henderson R.W.: *Photochem. Photobiol.* 47, 65 (1990)
- [27] Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 22, 113 (1993)
- [28] Pasternack R.F., Gibbs E.J., Villafranca J.J.: *Biochemistry* 22, 2406 (1983)
- [29] Zupán K., Herébyi L., Tóth K., Csík G.: *Biochemistry* 43, 9151 (2004)
- [30] Reddi E., Ceccon M., Valduga G., Jori G., Bommer J.C., Elisei F., Latterini L., Mazzucato U.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 75, 462 (2002)
- [31] Maisch T., Szeimies R.M., Jori G., Abels C.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 907 (2004)
- [32] Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 22, 113 (1993)
- [33] Baker H., Hambright P., Wagner L.: *J. Am. Chem. Soc.* 5, 5942 (1973)
- [34] Pasternack R.F., Gibbs E.J., Gaudemer A., Antebi A., Bassar S., De Poy L.: *J. Am. Chem. Soc* 107, 8179 (1985)
- [35] Schmidt, H., Scholze, H., Kaiser, A.: *J. Non-Crystalline Solids* 63, 1 (1984)
- [36] Bötcher H., Soltmann U., Mertig M., Pompe W.: *J. Mater. Chem.* 14, 2176 (2004)
- [37] Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M.: *Chem. Mater.* 6, 1605 (1994)
- [38] Avnir, D. : *Acc. Chem. Res.* 28, 328 (1995)
- [39] Ferrer M.L., Yuste L., Rojo F., Del Monte F.: *Chem.Mater.* 15, 3614 (2003)

- [40] Coiffier A., Coradin T., Roux C., Bouvet O.M.M., Livage J.: *J. Mater. Chem.* 11, 2039 (2001)
- [41] Corriu, R.J.P., Leclerque, D. : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 1420 (1996)
- [42] Hensch, L.L., West, J.K.: *Chem. Rev.* 90, 33 (1990)
- [43] Schmidt, H.: *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 32, 327 (1984)
- [44] Scouten W.H., Luong J.H.T., Brown R.S.: *Trends Biotechnol.* 13, 178 (1995)
- [45] Livage J., Coradin T., Roux C.: *J. Phys. Condens. Matter* 13, 673 (2001)
- [46] Junter G.A., Coquet L., Vilain S., Jouenne T.: *Enzyme Microb. Tech.* 31, 201 (2002)
- [47] Nassif N., Roux C., Coradin T., Rager M.-N., Bouvet O.M.M., Livage J.: *J. Mater. Chem.* 13, 203 (2003)
- [48] Suss W., Slowik P., Bottcher H.: *Pharmazie* 54, 513 (1999)
- [49] Rouxhet P.G., Van Haecht J.L., Didelez J., Gerard P., Briquet M.: *Enzyme Microb. Tech.* 3, 49 (1981)
- [50] Mosinger J., Janošková M., Lang K., Kubát P.: *J. Photochem. Photobiol. A* 181, 283 (2006)
- [51] Mosinger J., Mosinger B.: *Experientia* 51, 106 (1995)
- [52] Xu Z.F., Luo G.H., Wang A.G., Chen Y.Z.: *Progress in Biochem. Biophys.* 27, 78 (2000)
- [53] Krasnovsky A.A.: *Biofizika* 21, 748 (1976)
- [54] Brányik T., Kuncová G., Páca J., Demnerová K.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13, 283 (1998)
- [55] Osobní sdělení, Ing. G. Kuncová, CSc., UChP AV Praha

7. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-----------------------------|---|
| TMPyP4T | 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin tetra(toluen-4-sulfonát) |
| TPPS4 | 5,10,15,20- tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrin tetrasodná sůl dodekahydrát |
| TPP | 5,10,15,20-tetrafenylporfyrin |
| TEOS | Tetraethoxysilan |
| TMOS | Tetramethoxysilan |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| RNO | N,N-dimethyl-4-nitrosoanilin |
| P | porfyrin |
| S ₀ | senzitivátor v základním stavu |
| ¹ S | senzitivátor v singletovém stavu |
| ³ T | senzitivátor v tripletovém stavu |
| ³ O ₂ | kyslík v základním stavu |
| ¹ O ₂ | kyslík v singletovém stavu |
| PDT | photodynamic therapy |
| PACT | photodynamic antimicrobial chemotherapy |
| k _c | celková rychlostní konstanta deaktivace tripletových stavů senzitivátorů |
| τ | střední doba života tripletových stavů (spontánní deaktivace) |
| k _{et} | bimolekulární rychlostní konstanta zhášení tripletových stavů |
| I ⁻ | jodidový anion |
| I ₃ ⁻ | trijodidový anion |

