

POKROKY VE FOTOCEMII SINGLETOVÉHO KYSLÍKU

KAMIL LANG^a, JIŘÍ MOSINGER^{a,b} a DANA M. WAGNEROVÁ^a

^a Ústav anorganické chemie, Akademie věd České republiky, 250 68 Rež, ^b Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2
lang@iic.cas.cz

Došlo 15.6.04, přepracováno 15.12.04, přijato 11.1.05.

Klíčová slova: singletový kyslík, senzitivace, fotosenzitivace, senzitivátor, excitace

Obsah

1. Úvod
2. Fotosenzitivované reakce kyslíku
3. Singletový kyslík
4. Fotosenzitivátory produkující singletový kyslík
5. Detekce, stanovení a spektroskopie singletového kyslíku
 - 5.1. Chemické metody
 - 5.2. Fyzikální metody
6. Závěr a výhledy

1. Úvod

Od experimentálního důkazu existence singletového kyslíku v 60. letech byla této formě kyslíku pro jeho unikátní vlastnosti a vysokou reaktivitu věnována intenzivní pozornost chemiků a biologů^{1,2}. Termínem singletový kyslík ¹O₂ je označována molekula kyslíku v elektronicky excitovaném stavu, v němž jsou všechny elektrony spárovány, takže multiplicita spinu je 1 (singlet).

V této souvislosti je vhodné připomenout „kyslíkovou anomálii“, která má klíčový význam pro existenci života a spočívá v jedinečné elektronové struktuře kyslíkové molekuly. V základním, energeticky nejnižším stavu má molekula kyslíku v nejvyšším antivazebném orbitálu dva nepárové elektrony s paralelními spiny a tedy multiplicitu spinu 3 (triplet). Naprostá většina látek, např. organické sloučeniny, anorganické anionty, obecné plyny, sloučeniny hlavních podskupin a nepřechodné kovy mají v základním

stavu všechny elektrony spárovány. Jsou tedy v singletovém stavu a pro jejich reakce s tripletovou molekulou kyslíku na singletové produkty platí podle pravidla zachování spinu spinový zákaz. Důsledkem je, že všechny reakce kyslíku v základním stavu se singletovými molekulami mají velmi vysokou aktivační energii a probíhají měřitelnou rychlostí pouze tehdy, podaří-li se vytvořit podmínky pro obejití spinového zákazu^{3,4}. Termodynamicky jsou tyto reakce možné; mají záporné hodnoty Gibbsovy energie a jsou silně exotermní. Je zřejmé, že v případě neexistence spinového zákazu by byla veškerá organická hmota zoxidována v přítomnosti vzdušného kyslíku na oxid uhličitý a vodu⁵.

Podstatou vysoké reaktivity ¹O₂ je skutečnost, že jeho reakce s většinou chemických látek jsou spinově dovolené. Singletový kyslík vzniká řadou fyzikálních, chemických, fotochemických nebo biologických reakcí. Příkladem vzniku ¹O₂ fyzikálním procesem je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je např. klasická reakce chlornanu s peroxidem vodíku², tepelný rozklad endoperoxidů⁶, reakce ozonu a ozonidů s různými látkami⁷ a rozklad peroxochromanu nebo peroxomolybdenanu⁸, případně dosud diskutovaná dismutace superoxidu na kyslík a peroxid vodíku⁹. V biologických systémech produkují ¹O₂ některé peroxidasy⁹. K přímým fotochemickým reakcím patří fotolýza ozonu, probíhající zejména ve vyšších vrstvách atmosféry¹⁰, fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula (CT přechody)¹¹ a fotoexcitace molekulárního kyslíku¹².

Mimořádný význam pro tvorbu ¹O₂ mají fotosenzitivované reakce, na něž se v tomto článku soustředíme. Účinky reakcí generujících ¹O₂, označované souhrnně historickým termínem fotodynamický efekt, nalézají široké uplatnění ve fotobiologii, ve fotomedicině při léčení rakoviny (fotodynamická terapie, PDT) nebo aterosklerózy, při inaktivaci bakterií a virů a v nových insekticidech a herbicidech. Fotodynamická terapie rakoviny spočívá v aplikaci senzitivátoru obvykle intravenózní formou. Po uplynutí doby nutné k selektivní akumulaci senzitivátoru v tumoru je oblast jeho lokalizace ozářena viditelným světlem. Singletový kyslík, případně další reaktivní částice vznikají přímo v tumoru a způsobují jeho oxidativní destrukci, aniž je poškozována okolní zdravá tkáň^{13–16}.

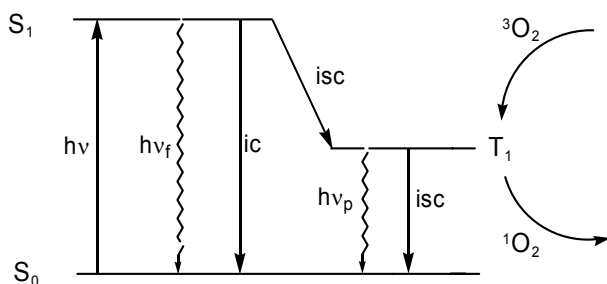
V tomto časopise byly již dříve publikovány některé aspekty chování ¹O₂ (cit.^{17–19}). Další významný vývoj v oblasti fotosenzitivovaných reakcí spojených s tvorbou ¹O₂ nás inspiroval k sepsání tohoto referátu. Chceme podat obecnější pohled na vznik a chování ¹O₂ v konkrétním prostředí, kdy i samotné fyzikálně-chemické a fotofyzikální vlastnosti senzitivátoru jsou ovlivněny jeho nekovalentními interakcemi s okolními molekulami²⁰.

2. Fotosenzitizované reakce kyslíku

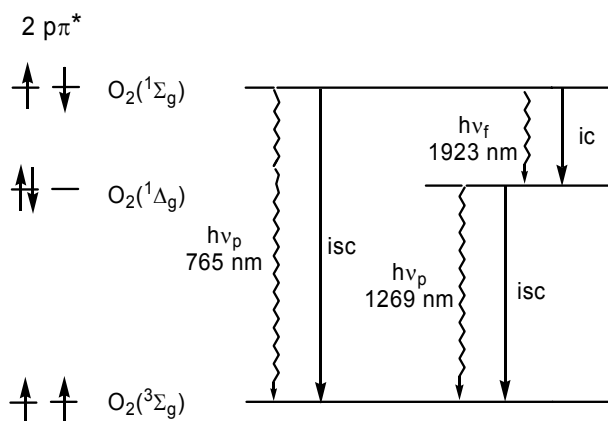
Podle Grotthusova-Draperova teorému vyvolává chemickou změnu pouze světelné kvantum absorbované molekulou. Jelikož molekula kyslíku nemá v běžně přístupné oblasti UV-Vis záření výraznější absorpci, nejčastěji se excituje nepřímo prostřednictvím senzitizeru. Mechanismus fotosenzitizované reakce kyslíku je zjednodušeně znázorněn na obr. 1.

Senzitizer se absorpcí světelného kvanta* dostává do excitovaného singletového stavu S_n , který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav S_1 . Stav S_1 se spontánně deaktivuje vnitřní konverzí (ic), vyzařením přebytečné energie ve formě fluorescence nebo mezisystémovým přechodem (isc) do tripletového stavu T_1 . Vznik T_1 nastává nejčastěji během 0,1 až 10 ns. Deaktivace tripletového stavu mezisystémovým přechodem nebo fosforescencí jsou zakázané přechody, a proto mají tripletové stavy senzitizerů poměrně dlouhou dobu života a mohou se zúčastňovat řady bimolekulárních interakcí. Jejich zhášení rozpuštěným kyslíkem probíhá přenosem energie z excitovaného senzitizeru na kyslík** a vede ke vzniku 1O_2 ve dvou singletových stavech označovaných jako $O_2(^1\Delta_g)$ a $O_2(^1\Sigma_g)$ (obr. 2, cit.²¹). Zhášení senzitizeru kyslíkem může rovněž probíhat přenosem elektronu za vzniku superoxidového anionradikálu O_2^- (cit.²²). Přenos energie nebo elektronu na kyslík jsou kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně-chemických a fotofyzikálních vlastnostech senzitizeru, která z nich převáží.

Z obr. 1 je zřejmé, že deaktivace excitovaných stavů je fyzikální monomolekulární proces, kdežto zhášení kyslíkem případně jinou molekulou je bimolekulární reakce. Pro rychlostní konstantu deaktivace tripletového stavu k^T za nepřítomnosti kyslíku nebo jiného zhášedla platí



Obr. 1. Mechanismus fotosenzitizované produkce 1O_2 ; ic – interní konverze, isc – mezisystémový přechod, $h\nu_f$ – fluorescence, $h\nu_p$ – fosforescence



Obr. 2. Přechody mezi základním a excitovanými stavy kyslíku

$$k^T = (k_{\text{fosforescence}} + k_{\text{isc}}^T) \quad (1)$$

kde $k_{\text{fosforescence}}$ a k_{isc}^T jsou rychlostní konstanty deaktivace fosforescencí a mezisystémovým přechodem. Hodnota $\tau_T = 1/k^T$ je doba života excitovaného senzitizeru v tripletovém stavu. Pro deaktivaci excitovaného singletového stavu platí obdobně $\tau_S = 1/k^S$, kde

$$k^S = (k_{\text{fluorescence}} + k_{\text{ic}}^S + k_{\text{isc}}^S) \quad (2)$$

kde $k_{\text{fluorescence}}$, k_{ic}^S a k_{isc}^S jsou rychlostní konstanty deaktivace S_1 fluorescencí, vnitřní konverzí a mezisystémovým přechodem. Za přítomnosti kyslíku je pozorovaná rychlostní konstanta zhášení senzitizeru v tripletovém stavu k_{obs} dána vztahem

$$k_{\text{obs}} = k^T + k_q [O_2] \quad (3)$$

kde k_q je rychlostní konstanta charakterizující bimolekulární zhášení kyslíkem a zahrnující všechny zhášecí procesy – přenos energie, přenos elektronu a vliv kyslíku na rychlost mezisystémového přechodu (fyzikální zhášení)**. Zhášení kyslíkem je proces řízený difúzí a konstanta k_q je řádu 10^9 – 10^{10} $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Z těchto důvodů je k_{obs} vysoce citlivá na koncentraci kyslíku v reakčním systému.

Účinnost fotochemické reakce charakterizuje kvantový výtěžek, který je definován zlomkem (počet přeměněných molekul)/(počet absorbovaných světelných kvant). Z definice je zřejmé, že jeho hodnoty jsou ≤ 1 . Může však nabývat i hodnot > 1 v případech, kdy je počet přeměněných molekul zvyšován následnými reakcemi, např. řetězovou nebo fotokatalytickou reakcí. Kvantový výtěžek

* Pro dvoufotonové nelineární procesy jsou výtěžky S_1 stavů o ~ 7 – 8 řádů nižší než pro jednofotonové. Přesto se dvoufotonová senzitivace studuje, protože volba vhodnější vlnové délky umožní větší prozáření neprůhledných vzorků.

** Excitované singletové stavy S_1 mohou být také zhášeny kyslíkem, ale efektivita této reakce je nízká vzhledem ke krátké době života těchto stavů. Měly by se brát v úvahu, pokud doba života převyšuje ~ 10 ns.

*** Kyslík zvyšuje rychlost deaktivace tripletového stavu senzitizeru aniž je generován 1O_2 .

může být vztažen na počet molekul produktu – u fotosenzitizovaných reakcí produkujících $^1\text{O}_2$ bývá označován Φ_Δ ,

$$\Phi_\Delta = (\text{počet molekul } ^1\text{O}_2)/(\text{počet světelných kvant absorbovaných senzitizerem}) \quad (4)$$

Hodnoty Φ_Δ při zhášení senzitizeru v tripletovém stavu T_1 ($^3\text{Sens}^*$) jsou v rozmezí 0 (nevzniká $^1\text{O}_2$) až 1 (každá srážka vede ke vzniku $^1\text{O}_2$). Kvantový výtěžek singletového kyslíku Φ_Δ závisí na kvantovém výtěžku tripletových stavů senzitizeru Φ_T podle vztahu

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_\Delta S_q \quad (5)$$

kde S_Δ je frakce tripletových stavů senzitizeru zhášených kyslíkem a poskytujících $^1\text{O}_2$. Pro tripletové stavy s τ_T větší než několik μs a v přítomnosti milimolárních koncentrací kyslíku (rozpuštědla nasycená vzduchem) platí

$$S_\Delta = k_A/k_q \quad (6)$$

kde k_A je rychlostní konstanta vzniku singletového kyslíku přenosem energie.

Pro přenos energie je nutný kontakt mezi $^3\text{Sens}^*$ a O_2 dříve než tripletové stavy zaniknou. Faktor S_q v (5) označuje podíl tripletových stavů, které interagují s kyslíkem a je dán

$$S_q = k_q [\text{O}_2]/(k_q [\text{O}_2] + k^T) \quad (7)$$

v němž jmenovatel představuje veškeré procesy deexcitace $^3\text{Sens}^*$. Při dostatečně vysokých koncentracích kyslíku platí $k^T \ll k_q [\text{O}_2]$ a $S_q \cong 1$. Pak

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_\Delta \quad (8)$$

Při nízkých koncentracích kyslíku či vysoké viskozitě (malé k_q) nebo krátkého τ_T (velké k^T) naopak roste význam monomolekulárních deaktivací $^3\text{Sens}^*$ a S_q nabývá na významu. Tyto vztahy mají význam pro účinnost fotodynamických procesů²¹. Z popisu vyplývá, že hodnota Φ_Δ je závislá na koncentraci kyslíku a není tedy neměnným parametrem studovaného senzitizeru.

3. Singletový kyslík

Ve většině literatury pojednávající o $^1\text{O}_2$ v roztoku, zejména v kontextu s fotodynamickým efektem, je termínem singletový kyslík označována stabilnější forma singletového kyslíku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. V posledních letech významně vzrostl zájem o generaci a reakce energeticky bohatší ale méně stabilní formy $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ v roztoku i v plynné fázi^{23–25}. Přispěl k tomu biologický význam fotosenzitizovaných reakcí kyslíku a potřeba porozumět jejich detailnímu mechanismu, spolu s vývojem časově rozlišených spektrálních metod. Energie singletových stavů $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ je 94,1 a 156,9 kJ.mol⁻¹ (tab. I).

Zhášení tripletových stavů senzitizerů v některých organických rozpouštědlech produkuje v primárním kroku přenosu energie jak $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ tak i $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ (obr. 2). Podmín-

Tabulka I

Vlastnosti singletových stavů kyslíku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$

Parametr	$\text{O}_2(^1\Delta_g)$	$\text{O}_2(^1\Sigma_g)$	
Energie, kJ.mol ⁻¹	94,1	156,9	
Přechod	$\text{O}_2(^1\Delta_g) \rightarrow$ $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$	$\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow$ $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$	$\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow$ $\text{O}_2(^1\Delta_g)$
Vlnová délka, nm ^a	1269–1282	765	1914–1936
<i>Radiační doba života τ_r</i>			
Plyn ^a	64,6 min	11,8 s	6,7 min
Roztok ^a	0,25–10 s	1 s	0,33–1,4 ms
<i>Experimentální doba života</i>			
Rozpuštědlo	τ_Δ ^c	τ_Σ ^a	
H ₂ O	3,8 μs	8,2 ps	
D ₂ O	62 μs	42 ps	
CH ₃ OH	10 μs	18 ps	
CD ₃ OD	240 μs ^b	94 ps	
(CH ₃) ₂ CO	50 μs	123 ps	
(CD ₃) ₂ CO	723 μs	294 ps	
CHCl ₃	264 μs	1,18 ns	
CDCl ₃	740 μs	2,22 ns	
CCl ₄	28 ms ^b	105–132 ns	

^a cit.²³, ^b cit.²⁸, ^c cit.²⁹

kou je, aby energie T_1 stavů byla větší než energetický rozdíl 157 kJ.mol⁻¹ mezi $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ a kyslíkem v základním stavu – v tomto značení $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$. Poměr mezi produkcí obou forem singletového kyslíku $^1\Sigma/^1\Delta$ závisí na povaze senzitizeru i rozpouštědla. Ve studovaných systémech byl zjištěn v rozmezí 1,7–0,4. Je tedy zřejmé, že v roztocích vzniká značný podíl $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$. Diagram energetických hladin a přechodů mezi stavy kyslíku a obsazení nejvyššího antivazebného orbitalu je znázorněn na obr. 2.

Vzájemně si konkurující zářivé a nezářivé deaktivace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ (obr. 2) závisí na rozpouštědle, jelikož perturbace molekuly způsobená solvatací zvyšuje pravděpodobnost spinově zakázaných přechodů $\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow \text{O}_2(^3\Sigma_g)$ a $\text{O}_2(^1\Delta_g) \rightarrow \text{O}_2(^3\Sigma_g)$. Dominujícím procesem je spinově dovolený přechod $\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow \text{O}_2(^1\Delta_g)$. Z toho vyplývá, že $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ vzniká dvěma reakčními cestami – přímou a nepřímou přes energeticky bohatší meziproduct $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$. Účast $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ v oxidačních reakcích nebyla doposud prokázána. Význam $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ pro tyto reakce spočívá v tom, že je v nezanedbatelné míře prekurzorem $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, který je oxidačním činidlem fotosenzitizovaných oxidací. Experimentální doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, τ_Δ , je významně závislá na rozpouštědle a nabývá hodnot od přibližně 4 μs ve vodě až po 100 ms v některých slabě interagujících halogenovaných uhlovodících (tab. I). Tato sku-

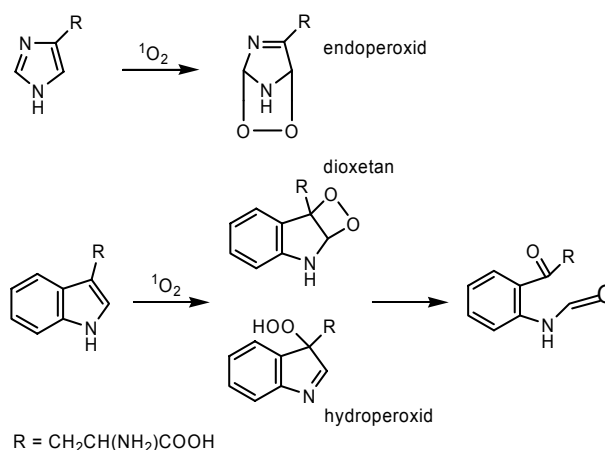
tečnost se vysvětluje neradiačním mechanismem deaktivace, kdy elektronická energie $O_2(^1\Delta_g)$ přechází na vibrační stavy molekul rozpouštědla. Přítomnost skupin OH v molekule rozpouštědla způsobuje neefektivnější zhášení $O_2(^1\Delta_g)$. Projevem tohoto mechanismu je výrazný isotopový efekt, jak je zřetelné z tab. I.

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 rozptyluje do okolního rozpouštědla. Tento mechanismus se označuje jako fyzikální zhášení a takto působí např. β -karoten či některé komplexy přechodných kovů. Zhášení může probíhat také chemickou reakcí – oxidací reaktantu (chemické zhášení). Vzhledem k vysoké reaktivitě 1O_2 existuje množství jeho oxidačních reakcí, které však mají jisté selektivní rysy. Typickou reakcí je adice na dvojné vazby C=C, izolované nebo konjugované, jako jsou oxidace olefinů (en-reakce, [2+2] cykloadice), 1,3-dienů ([4+2] cykloadice), aromatických sloučenin a heterocyklů^{21,26,29}. Meziprodukty, případně produkty, jsou dioxetany, endoperoxidy a peroxosloučeniny. Reakce nenasycených lipidů jsou typicky en-reakce. Výsledná rychlostní konstanta zhášení 1O_2 je dána součtem rychlostních konstant fyzikálního a chemického procesu. V rámci tohoto referátu se nebudeme zabývat celým rozsahem oxidací 1O_2 , kterým byla věnována speciální literatura^{27,29}, ale soustředíme se na vybrané substráty, zejména složky proteinů a DNA. Důvodem je rostoucí význam přikládání vzniku 1O_2 v biologických systémech vlivem endogenních a exogenních senzitivátorů a dalekosáhlým důsledkům jeho reakcí.

Aminokyseliny a zbytky aminokyselin v proteinech. Proteiny jsou, vzhledem ke svému zastoupení v buňkách, hlavním cílem oxidace singletovým kyslíkem. Zdrojem 1O_2 atakujícího protein jsou především senzitivátory vázané kovalentní vazbou nebo nekovalentní interakcí na protein³⁰. Krátká doba života singletového kyslíku v tomto prostředí ($\tau_A \leq 250$ ns) omezuje jeho účinek na bezprostřední okolí vzniku, protože jeho difuzní poloměr je menší než 50 nm (cit.³¹).

Z esenciálních aminokyselin se nejsnadněji oxidují cystein, methionin, tryptofan, tyrosin a histidin a jsou tedy primárním cílem oxidačního ataku^{29,30,32,33}. Ostatní aminokyseliny reagují s 1O_2 podstatně pomaleji. Reakcemi vzniká směs jen částečně identifikovaných produktů. Cystein se oxiduje v prvním stupni na disulfid, v dalších pak 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 stupně oxidace tryptofanu a histidinu, které probíhají přes dioxetan nebo endoperoxid, jsou znázorněny na obr. 3. U tryptofanu je typickým produktem *N*-formylkynurenin.

Průběh reakce volné aminokyseliny s 1O_2 nemusí být totožný s reakcí zbytku aminokyseliny vázané v postranním řetězci proteinu. Lze říci, že cílem oxidační-

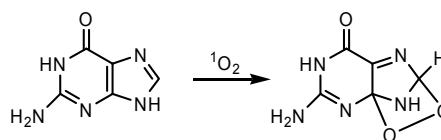


Obr. 3. Reakce histidinu a tryptofanu s 1O_2

ho ataku bývají především postranní řetězce, nikoliv hlavní řetěz proteinu. Nezanedbatelný vliv má rovněž lokální koncentrace senzitivátoru a dostupnost kyslíku. O fragmentaci hlavního řetězce bílkovin je poměrně málo údajů. Je však zřejmé, že reakce s 1O_2 a peroxidovými produkty způsobují většinou nevratné poškození proteinu³².

Nukleové kyseliny, DNA. Singletový kyslík reagující s nukleovými kyselinami vzniká převážně reakcemi senzitivátorů interkalovaných mezi páry bází nebo vázaných do žlábků šroubovice. Vzhledem k negativnímu náboji fosfosacharidové kostry interagují s nukleovými kyselinami senzitivátory s kladně nabitými periferními substituenty^{34–38}. Aniontové senzitivátory rozptýlené v okolí nukleové kyseliny způsobují méně významné, tzv. nespecifické oxidace. Singletový kyslík reaguje hlavně s jednou ze čtyř nukleobází, a to s guaninem³⁹. Reakce s guaninem nebo guanosem byly studovány v souvislosti s oxidačním štěpením DNA. Prvním krokem reakce je [4+2] cykloadice 1O_2 na C-4 a C-8 purinového kruhu a vznik nestálého endoperoxidu (obr. 4). Komplikovaný mechanismus následných reakcí vede k řadě produktů, z nichž ne všechny byly identifikovány. Složení produktů závisí na tom, zda je guanin vázán v oligonukleotidu nebo DNA. Oxidace singletovým kyslíkem je jednou z příčin poškození nukleových kyselin. V důsledku oxidačních procesů dochází ke štěpení DNA – vzniku zlomů na jednom nebo méně často obou vlákních DNA (cit.⁴⁰).

Reakce 1O_2 jsou citlivé ke sterickým faktorům. Z těchto důvodů je v současnosti věnována pozornost vli-



Obr. 4. Reakce guaninu s 1O_2

vu mikrookolí, zejména schopnosti supramolekulárních struktur se zabudovaným senzitizerem řídit reakční průběh. Tento přístup slibuje získání důležitých informací o procesech probíhajících v biologických systémech na molekulární úrovni.

4. Fotosenzitizátory produkující singletový kyslík

Design, syntéza a studium vlastností senzitizerů produkujících $^1\text{O}_2$ se v posledních letech rozvinuly v souvislosti s aplikacemi ve fotomedicině, zejména při fotodynamické terapii rakoviny. K senzitizerům produkujícím $^1\text{O}_2$ patří velký počet barviv, aromatických a heterocyklických organických sloučenin a barevných kovových komplexů. Jak bylo uvedeno v kap. 2, zhašení tripletových stavů kyslíkem může probíhat přenosem elektronu za vzniku O_2^- nebo přenosem energie vedoucí ke vzniku $^1\text{O}_2$. Obecně platí, že senzitizery označované jako (n,π^*) , kde excitovaný elektron pochází z nevazebného orbitalu, poskytují převážně O_2^- . Typickým příkladem je antrachinon a jeho deriváty⁴¹. Senzitizery typu (π,π^*) , kde excitovaný elektron pochází z π orbitalu, poskytují $^1\text{O}_2$. K tomuto typu náležejí např. barviva jako eosin, akridin, bengálská červeně, methylenová modř, anthracen, triarylmethanová barviva, dále porfyriny, ftalocyaniny, expandované porfyriny

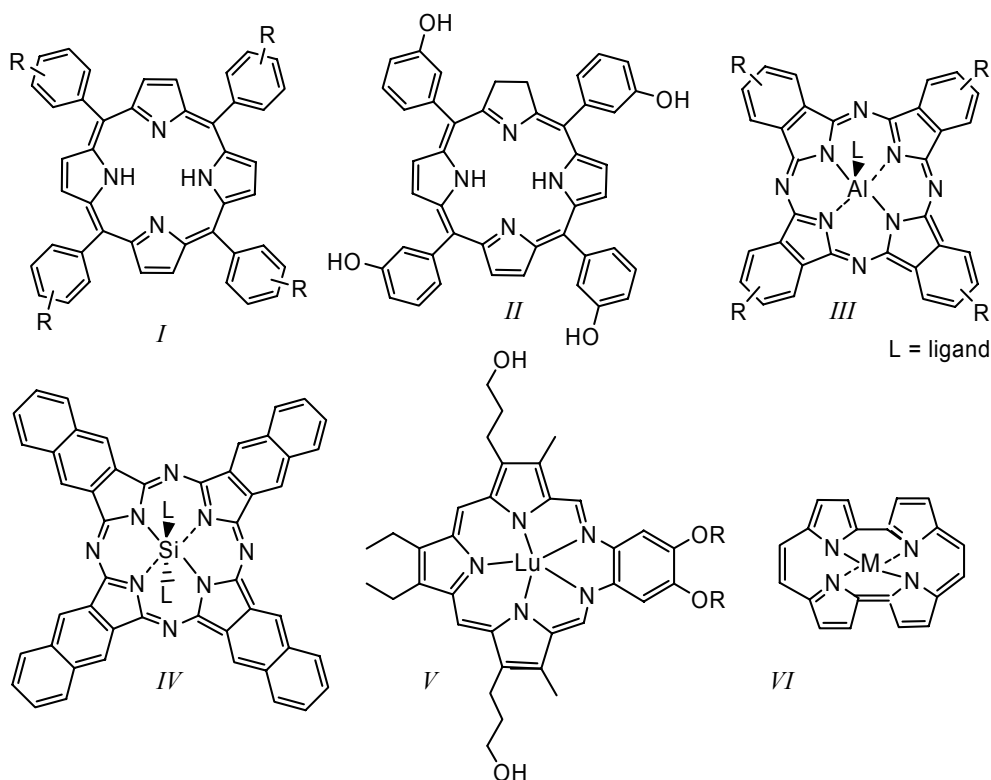
a jejich metalokomplexy. Senzitizery používané v souvislosti s fotobiologickými a fotomedicinskými aplikacemi jsou obvykle látky s porfyrinoidní strukturou tj. tetrapyrrolové resp. oligopyrrolové makrocykly^{13,16,42–45}. Důvodem je jejich strukturální podobnost s přírodními porfyriny, které často tvoří aktivní místa biomolekul, a jejich vhodné fyzikálně-chemické a fotochemické vlastnosti. Důležitými charakteristikami senzitizerů jsou:

i) Kvantový výtěžek singletového kyslíku Φ_Δ . Kvantové výtěžky většiny porfyrinoidních senzitizerů se pohybují v rozmezí 0,3–0,8 (cit.^{46,47}).

ii) Fotostabilita senzitizeru. Senzitizer musí být dostatečně stabilní vůči přímé fotodegradaci a oxidaci vznikajícím $^1\text{O}_2$, případně oxidaci dalšími reaktivními formami kyslíku. Všechny senzitizery sice podléhají fotodegradaci, ale se značně rozdílnou rychlostí. Fotochemické odbourávání senzitizeru (photobleaching) hraje důležitou roli v medicinských aplikacích a při stanovení výtěžků $^1\text{O}_2$ (cit.⁴²).

iii) Nízká toxicita senzitizeru je podmínkou při medicinských aplikacích⁴⁸.

Hlavní typy porfyrinoidních senzitizerů s potenciálním využitím ve fotomedicině jsou znázorněny na obr. 5 (cit.^{13,16,42,43,45,48,49}). Typickými senzitizery jsou substituované porfyriny *I* a 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)chlorin *II*. Chlorin *II* je zvláště výhodný pro své spektrální vlastnosti. Další částečnou hydrogenací porfyrinové jed-



Obr. 5. Některé porfyrinoidní senzitizery

notky lze získat odpovídající bakteriochlorin. Ftalocyaniny a naftalocyaniny jsou odvozeny od základního skeletu tetraazaporphyrinu (porfyrinu) a mají velmi vhodnou absorpci v oblasti vyšších vlnových délek. Využívá se např. Al(III)-ftalocyanin *III* sulfonovaný do různého stupně nebo Si(IV)-naftalocyanin *IV*. Z expandovaných porfyrinů našel praktické uplatnění hlavně hydrofobní Lu(III)-texasfyrin *V*. K dalším porfyrinoidním senzitivátorům patří substituované porfyceny *VI*.

Porfyrinoidní senzitivátory mohou být jak volné ligandy, tak i metalokomplexy s centrálními ionty Al, Zn, Mg, Ga, Si, Ge, Sn nebo lanthanoidy. Komplexy s přechodnými kovy jsou jako senzitivátory neúčinné, protože jejich doba života v tripletovém stavu je řádu pikosekund až nanosekund, tedy příliš krátká pro bimolekulární reakci s kyslíkem⁴².

Vznikající ¹O₂ atakuje bezprostřední okolí senzitivátoru. Difuzní poloměr kulové oblasti, v níž se reakce může uskutečnit, je dán dobou života ¹O₂ a rychlostí difuze v daném prostředí (tab. I). Interakce senzitivátoru s biopolymerem a hostitelskými molekulami závisí na velikosti, znaménku a distribuci náboje na periférii senzitivátoru a na hydrofilnosti nebo hydrofobnosti interagujících partnerů. Z aniontových senzitivátorů byly nejpodrobněji prostudovány sulfonované a karboxylované tetrafenylporfyriny a ftalocyaniny^{43,48}. Tetra- a trisubstituované senzitivátory jsou hydrofilní, mono- a disubstituované se chovají jako amfifilní. Aniontové senzitivátory interagují s kladně nabitými protonovanými aminokupinami proteinů a jsou tedy klíčem k degradaci proteinů vlivem ¹O₂ (cit.^{50,51}).

Zjištění, že se kladně nabitý 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyrin interkaluje do DNA převážně v místě párů bází guanin-cytosin, obrátilo pozornost ke kationtovým senzitivátorům³⁴. Kationtové senzitivátory mohou pronikat do jádra buňky a interagovat s DNA, takže představují potenciální specifické poškození vlivem vznikajícího ¹O₂.

Velmi zajímavou skupinu senzitivátorů představují amfifilní asymetricky substituované senzitivátory s oddělenými nabitými hydrofilními nebo nenabitými hydrofobními oblastmi, které mohou nezávisle interagovat s okolními molekulami. Příkladem může být asymetrický disulfonovaný ftalocyanin *III* nebo chlorin *II*, u něhož volná otáčivost hydroxyfenylových skupin způsobuje, že se na molekule podle povahy okolí vytváří hydrofilní nebo hydrofobní zóna (cit.^{13,42}).

Představiteli nenabitých hydrofobních senzitivátorů jsou nesubstituované ftalocyaniny *III* a naftalocyaniny *IV*, z porfyrinů např. oktaethylporfyrin. Pro medicínské aplikace je výhodné využít afinitu hydrofobních senzitivátorů k lipofilním membránám. Vzhledem k nerozpustnosti hydrofobních senzitivátorů v polárním prostředí je nutno je zabudovat do vhodných nosičů jako jsou cyklodextriny, micely, liposomy apod.^{43,52–54}

Porfyrinoidní senzitivátory jsou většinou rovinné a vzhledem ke konjugovanému systému dvojných vazeb mají tendenci vytvářet agregáty vázané π-π interakcemi. Agregace způsobuje radikální snížení produkce ¹O₂, proto-

že absorbovaná energie se převážně uvolní rychlými nerediačními procesy. Agregaci lze zabránit použitím nosičů.

5. Detekce, stanovení a spektroskopie singletového kyslíku

5.1. Chemické metody

Pro detekci a stanovení výtěžků ¹O₂ v kapalně fázi lze použít metod založených na jeho reakcích s vhodnými látkami tvořícími charakteristické primární či sekundární produkty fotooxidace. Zatímco většina termických oxidací kyslíkem je teplotně závislá, oxidace singletovým kyslíkem na teplotě takřka nezávisí a často probíhají stereospecificky. Pro použití dané reakce k detekci je důležité, aby byla dostatečně selektivní pro ¹O₂, tj. aby dovozovala odlišení vlivu ¹O₂ od ostatních reaktivních oxo-částic (např. O₂⁻, OH⁻). To bývá častým problémem těchto metod, který je však vyvážen jednoduchostí experimentálního provedení.

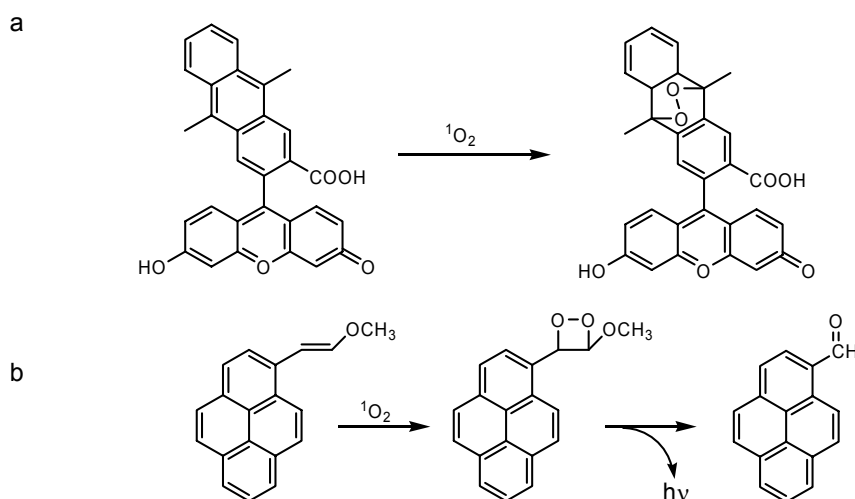
Měření kvantových výtěžků fotooxidace Φ_{-Q} za podmínek kontinuálního ozařování slouží k získání jak hodnot Φ_Δ, tak i rychlostních konstant fyzikálního a chemického zhášení. Za předpokladu ustáleného stavu vzniku ¹O₂ a podmínek, kdy koncentraci zhášeče Q lze považovat za konstantní (tj. méně než 10% úbytek během experimentu), se získává rovnice

$$\Phi_{-Q} = \Phi_{\Delta} \frac{k_r [Q]}{k_d + k_q [Q]} \quad (9)$$

kde k_r představuje rychlostní konstantu chemického zhášení (reakce), k_q je rychlostní konstanta zahrnující všechny zhášečící procesy (tj. chemické i fyzikální) a k_d je rychlostní konstanta zahrnující fosforescenci a srážky s molekulami rozpouštědla (tj. $1/\tau_{\Delta}$). Mnohé z těchto rychlostních konstant jsou kriticky zhodnoceny v kompilaci F. Wilkinsona a spol.²⁸

Zhášečící metody se běžně využívají k diagnostice přítomnosti ¹O₂ v komplexních reakcích. Inhibice sledované reakce přidávkem fyzikálních zhášečů jako azidu sodného či β-karotenu svědčí o přítomnosti ¹O₂. Rovněž se používají chemické zhášeče jako histidin, který reaguje za vzniku příslušného endoperoxidu, 2,5-dimethylfuran, tryptofan, kyselina močová nebo 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO). Často používaným způsobem jak diagnostikovat účast ¹O₂ v reakci je použití D₂O místo H₂O. Doba života singletového kyslíku v D₂O je 16× vyšší než v H₂O (tab. I) a pravděpodobnost chemické reakce je tedy vyšší. Přítomnost ¹O₂ indikuje zvýšení reakční rychlosti nebo vyšší výtěžek reakčních produktů.

Odbarvovací metody. Odbarvovací metody jsou založeny na skutečnosti, že během reakce s ¹O₂ se absorpční pásy reaktantu snižují úměrně množství generovaného ¹O₂. Reakci tak lze pohodlně spektrofotometricky či fluorescenčně sledovat. Metody bývají citlivé, protože ¹O₂ má



Obr. 6. Luminiscenční detekce $^1\text{O}_2$ založená na oxidaci 6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3H-xanthen-3-onu (a) a 1-((E)-2-methoxyvinyl)pyrenu (b)

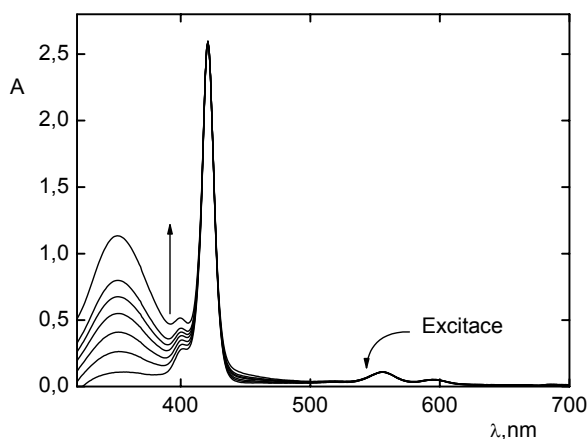
velkou schopnost působit destruktivně na chromofory molekul reaktantu. Reaktanty jsou většinou tvořeny konjugovaným systémem dvojných vazeb, se kterými $^1\text{O}_2$ reaguje za vzniku endoperoxidů či hydroperoxidů. Přes jednoduchost odbarvovacích metod je nutné mít na zřeteli určitá omezení, zvláště je-li $^1\text{O}_2$ generován fotosenzitizovanou reakcí v roztocích: *i*) senzitivizátor i reaktant jsou rozpuštěny ve stejném rozpouštědle, nesmějí se tedy příliš lišit polaritou; *ii*) Senzitivizátor i reaktant musejí být navzájem zcela indiferentní v základních i excitovaných stavech. Nežádoucí jsou tedy i možné donor-akceptorové přenosy elektronu či energie mezi excitovaným senzitivizátorem a reaktantem; *iii*) Absorpční pásy senzitivizátoru a reaktantu by se neměly překrývat z důvodu filtračního efektu dopadajícího záření. V této souvislosti je třeba připomenout, že i samotné senzitivizátory často podléhají fotodegradaci; *iv*) Podobnou reakci mohou také vyvolat jiné reaktivní formy kyslíku (např. O_2^- , OH).

V literatuře je popsána řada odbarvovacích metod. Pro stanovení $^1\text{O}_2$ v organických rozpouštědlech se doporučuje použití reakce 1,3-difenyliisobenzofuranu sledované poklesem absorpce při 440 nm (cit.⁵⁵). Ve vodném prostředí lze například použít draselné soli 1,3-bis[4-(9-karboxynonyl)fenyl]-5,6-dimethyl-4,7-dihydroisobenzofuranu, tryptofanu, kyseliny močové či N,N' -dimethyl-4-nitrosoanilinu (RNO) (cit.⁵⁶). Posledně zmíněná reakce s RNO se používá i pro biologická prostředí. Pokles absorpce pásu RNO při 440 nm je přímo úměrný celkovému množství generovaného $^1\text{O}_2$. Je nutná přítomnost imidazolu nebo histidinu, jejichž přechodný endoperoxid způsobuje měřené odbarvení.

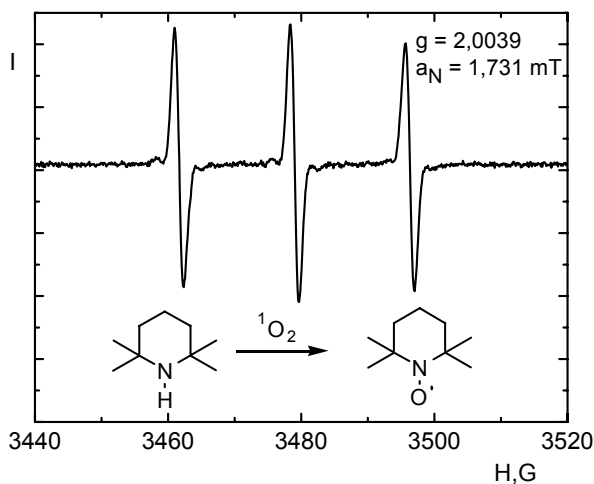
Vznik specifických produktů. Cholesterol reaguje s $^1\text{O}_2$ za tvorby specifických produktů. Tato specifická činí cholesterol efektivním indikátorem $^1\text{O}_2$ *in situ* v biologickém prostředí, kde může být použit jiných detekčních technik problematické. Cholesterol reaguje s $^1\text{O}_2$ za vzniku 5-hyd-

roperoxy-5 α -cholest-6-en-3 β -olu, 6 α -hydroperoxycholest-4-en-3 β -olu a 6 β -hydroperoxycholest-4-en-3 β -olu, zatímco reakcí s kyslíkem v základním stavu vznikají jiné hydroperoxidové produkty⁵⁷.

Příkladem vhodných fluorescenčních činidel jsou sloučeniny odvozené od fluoresceinu např. 6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3H-xanthen-3-on (DMAX, obr. 6a). DMAX reaguje s $^1\text{O}_2$ na odpovídající endoperoxid. Zatímco výchozí DMAX je slabě fluoreskující látkou, jeho endoperoxid vykazuje intenzivní fluorescenci⁵⁸. Vhodným komerčním činidlem je 1-((E)-2-methoxyvinyl)pyren, který reakcí se $^1\text{O}_2$ tvoří dioxetano-



Obr. 7. Absorpční spektrum Zn-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinu v jodidovém detekčním činidle po 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16 min (směr šipky) ozařování He-Ne laserem (543 nm); růst absorpce při 351 nm odpovídá nárůstu koncentrace I_3^- . Absorpční pásy u 420 nm a výše přísluší senzitivizátoru a během ozařování se nemění. $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KI, $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátový pufr, pH 6,2



Obr. 8. Stanovení $^1\text{O}_2$ po reakci s 2,2,6,6-tetramethylpiperidinem; singletový kyslík je generován kontinuálním ozářováním roztoku 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinu v rezonátoru EPR spektrometru. Spektrum poskytl P. Stopka z ÚACH AVČR v Řeži

vý meziprodukt rozkládající se na pyren-1-karbaldehyd spolu s chemiluminiscencí při 465 nm, která se deteguje (obr. 6b) (cit. ⁵⁹).

Relativně málo je známo o reakcích $^1\text{O}_2$ s anorganickými látkami. Reakce $^1\text{O}_2$ s Γ^- ve vodném prostředí vede složitým mechanismem ke vzniku I_3^- v přítomnosti katalyzátoru $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (cit. ⁶⁰). Koncentraci vznikajícího I_3^- lze sledovat v jeho absorpčním pásmu při 351 nm, jak je patrné z obr. 7. Nevýhodou metody je její nízká specifita, naopak výhodou je její jednoduchost a vysoká citlivost.

Elegantní metodou, i když instrumentálně náročnou, je využití elektronové paramagnetické rezonance (EPR). Metoda se nazývá spinový záchyt a je založena na reakci $^1\text{O}_2$ s neradikálovou sloučeninou za vzniku poměrně stabilního radikálového produktu. Na stanovení $^1\text{O}_2$ se používá 2,2,6,6-tetramethylpiperidin a jeho deriváty, např. 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidon. Vznikající nitroxidový radikál dává EPR spektrum se třemi liniemi, jejichž intenzita je úměrná koncentraci $^1\text{O}_2$ v roztoku (obr. 8).

5.2. Fyzikální metody

Fyzikálními metodami rozumíme přímou detekci luminiscence $^1\text{O}_2$ ve studovaném prostředí (časově rozlišená nebo za stacionárních podmínek), fototermální techniky (fotoakustická kalorimetrie nazývaná také „laser-induced optoacoustic spectroscopy“ – LIOAS, časově rozlišený „thermal lensing“ – TRTL) a časově rozlišenou absorpci $^1\text{O}_2$ v IČ oblasti. Výhodou spektroskopických metod je, že vznik a reakce $^1\text{O}_2$ jsou detegovány přímo, a tím odpadá vliv vedlejších reakcí s chemickými činidly. Na druhé straně spektrální metody jsou náročnější na vybavení

a vyžadují použití laserových zdrojů a speciálně konstruovaných detektorů.

Fototermální techniky⁶¹. Excitovaná molekula uvolňuje absorbovanou energii radiačními nebo neradiačními procesy (obr. 1). Průběh neradiačních procesů je spojen se vznikem částic s vysokým obsahem energie (např. „uložená“ energie E_Δ v $^1\text{O}_2$ je $94,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) nebo s disipací tepla do okolí. Teplo uvolněné během neradiačních procesů excitované molekuly do okolního rozpouštědla způsobuje změny indexu lomu (metoda TRTL) a vznik tlakového rázu (metoda LIOAS). Protože jsou tyto techniky kalorimetrické, je důležité vzít v úvahu energetickou bilanci fotosenzitizovaného procesu, uvážit časové intervaly, ve kterých probíhají konkrétní procesy disipace absorbované energie, a dát je do souvislosti s časovým rozlišením měření. Deaktivace S_1 do základního resp. do tripletového stavu probíhá v přítomnosti kyslíku obvykle v časech kratších než 10^{-8} s. Rychlost deaktivace T_1 stavů závisí na viskozitě rozpouštědla, koncentraci kyslíku a je obvykle v rozmezí 10^{-7} až 10^{-6} s. Deaktivace $^1\text{O}_2$ probíhá v časech delších než 10^{-6} s (tab. I). Tepelnou disipaci můžeme tedy rozdělit na rychlou probíhající v časech kratších než je časové rozlišení a pomalou představující energii uloženou v částicích, které žijí déle než je integrační doba měření uvolněného tepla a které zůstanou nedetegovány. Z toho pak plyne energetická bilance

$$E_a = \alpha E_a + \Phi_f E_f + \Phi_\Delta E_\Delta \quad (10)$$

kde E_a představuje celkovou absorbovanou energii a α je frakce absorbované energie uvolněné jako „rychlé“ teplo. Druhý člen rovnice představuje energii ve formě fluorescence, která je vyjádřena jako součin kvantového výtěžku fluorescence Φ_f a energie fluorescenčního stavu E_f . Jde o zjednodušenou bilanci senzitivovaného procesu. Pokud vznikají další produkty či probíhají další procesy (např. fosforescence), musí být v rovnici (10) také zahrnuty.

Při použití metody LIOAS jsou tlakové vlny převedeny na elektrický signál piezoelektrickým čidlem, které je umístěno na vnější stěně kyvety nejčastěji ve směru kolmém na dopadající laserový puls. Časové rozlišení je limitováno efektivním akustickým tranzitním časem, které se vypočte z $\tau_a = 2R/v_a$, kde R je poloměr excitujícího pulsu a v_a je rychlost zvuku v rozpouštědle. Při poloměru štěrbin 0,25 mm je časové rozlišení v acetonitrilu ($v_a = 1300 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) téměř 400 ns. Amplituda akustického signálu H je úměrná energii uvolněné během τ_a („rychlé“ teplo) podle následujícího vztahu

$$H = K \alpha E_o (1 - 10^{-A}) \quad (11)$$

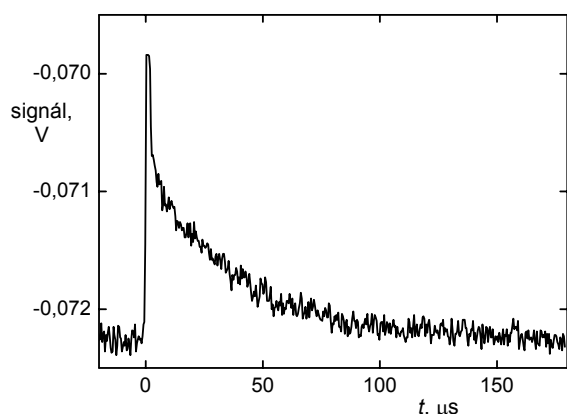
kde E_o je energie dopadajícího pulsu, A absorbance při excitační vlnové délce a K konstanta, která závisí na geometrii experimentu a termoelastických vlastnostech rozpouštědla. Konstanta se určuje pomocí kalorimetrického standardu. Metoda LIOAS se používá ke stanovení Φ_Δ . Dekonvoluce fotoakustických vln umožňuje detekci změn objemu molekuly po excitaci v časovém rozmezí 5 ns až 10 μs .

Při použití metody TRTL se měří změna indexu lomu indukovaná lokálním uvolněním tepla v souvislosti se vznikem a reakcí $^1\text{O}_2$. Všechny procesy proběhlé v čase kratším než je tranzitní čas $\tau_a = R/v_a$ způsobují změnu indexu lomu charakterizovanou dobou života τ_a a všechny pomalejší procesy způsobují změnu danou jejich dobou života. Metodu TRTL lze využít pro stanovení Φ_A a τ_A během jednoduchého experimentu bez potřeby externího standardu.

Měření luminiscence $^1\text{O}_2$. Přímé měření singletového kyslíku jak v prvním $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, tak ve druhém $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ excitovaném stavu je založeno na monitorování odpovídajících radiačních přechodů uvedených na obr. 2 a v tab. I. Nejpoužívanější je časově rozlišená detekce fosforescence $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ při 1 270 nm (obr. 9, cit.⁶²). Vzorek je umístěn v běžné fluorescenční kyvetě a je excitován pulsním laserem, který má vlnovou délku potřebnou k excitaci senzitizeru. Fosforescence $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se nejčastěji měří ve směru kolmém k dopadajícímu pulsu fotodiodou, která je chráněna před celkovou emisí vzorku interferenčním filtrem propouštějícím pouze záření kolem 1270 nm. Kvantový výtěžek fosforescence je velmi malý, pohybuje se v rozmezí $\sim 10^{-4}$ až 10^{-7} v závislosti na rozpouštědle, a proto jsou kladeny vysoké nároky na citlivost detekčního systému. Časový průběh koncentrace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ po pulsní excitaci senzitizeru je dán rovnicí kde N_A je Avogadrova konstanta, h Planckova konstanta, V ozařovaný objem a τ_T je

$$[\text{O}_2(^1\Delta_g)](t) = \Phi_A \frac{E_0 (1 - 10^{-A})}{N_A h \nu V} \frac{\tau_A}{\tau_A - \tau_T} \left(e^{-t/\tau_T} - e^{-t/\tau_A} \right) \quad (12)$$

dobu života tripletových stavů v daném prostředí. Vyhodnocením časové závislosti fosforescenčního signálu, jehož intenzita je úměrná koncentraci $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, se získají údaje Φ_A a τ_A . Metoda je velmi vhodná pro popis senzitizerů v homogenních systémech a je rozvíjena také pro



Obr. 9. Fosforescence $^1\text{O}_2$ měřená při 1270 nm; excitace Pd(II)-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinu v 0,02 mol.l⁻¹ fosfátovém pufru-D₂O při 408 nm

heterogenní či mikroheterogenní systémy jako např. pro studium chování senzitizerů *in vivo*. S využitím optického mikroskopu lze monitorovat i prostorovou distribuci $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ s rozlišením až 2,5 μm . Za podmínek, kdy je doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ relativně dlouhá nebo když je koncentrace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ vysoká, interagují dvě molekuly $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ za vzniku emisních pásů při 635 nm a 703 nm. Ty mohou v některých rozpouštědlech také sloužit k detekci $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Dále lze monitorovat fluorescenční přechod z $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ při $\sim 1\,925$ nm ($\sim 5\,200$ cm⁻¹) a fosforescenční přechod při ~ 765 nm ($\sim 13\,100$ cm⁻¹) (cit.^{23,24}). Pro excitaci senzitizeru se využívá nanosekundový pulsní laser a pro detekci spektrometr FTIR.

Měření absorpce $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ v IČ oblasti. Podobně jako fluorescenci přechodu $\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow \text{O}_2(^1\Delta_g)$ lze také měřit opačný proces, odpovídající absorpčnímu pásu $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (cit.^{23,24}). Poloha maxima pásu významně závisí na rozpouštědle.

6. Závěr a výhledy

Charakteristické a v mnohém ohledu neobvyklé vlastnosti singletového kyslíku jsou dány souborem jeho chemických, fotochemických a fotofyzikálních vlastností. V tomto přehledu jsme se pokusili podat základní informace potřebné pro orientaci v problematice týkající se $^1\text{O}_2$ a jeho aplikačních možností. Perspektivní je další rozvoj fotodynamické léčby rakoviny jako neinvazivní léčebné metody, dezinfekce krve pro transfuze, odstraňování mikrobiálního znečištění, sterilita textilního zdravotnického materiálu, a vývoj fotodynamických herbicidů a pesticidů nezatažujících životní prostředí. V posledním desetiletí je patrný značný pokrok ve znalosti mechanismu fotosenzitizovaných reakcí, v designu a syntéze fotosenzitizátorů, v detekčních a časově rozlišených spektroskopických metodách.

Z výčtu praktických aplikací je zřejmé, že jde převážně o aplikace v biologických systémech, v nichž probíhají nekovalentní interakce senzitizerů s biomolekulami. V důsledku interakce se často mění fotofyzikální vlastnosti senzitizerů a mimo to se část generovaného $^1\text{O}_2$ může spotřebovávat vedlejšími reakcemi s molekulami v bezprostředním okolí. Účinnost fotosenzitizátoru dramaticky snižuje vznik dimerů a vyšších agregátů senzitizerů. Cestou k omezení těchto nežádoucích jevů může být použití nosičů jako jsou cyklodextriny, kalixareny nebo liposomy, které zabraňují agregaci a často zvyšují rozpustnost samotného senzitizeru. Dokonalejší nosiče by měly zajišťovat selektivitu působení $^1\text{O}_2$ přesnou lokalizaci senzitizeru, která úzce souvisí s molekulárním rozpoznáváním. Racionální aplikace tohoto přístupu je nepochybně výzvou pro budoucnost. Nicméně byl fotodynamický přístup úspěšně aplikován i na částečně empirickém základě. Podrobnějšímu popisu využití singletového kyslíku bude věnováno další sdělení.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za finanční podporu (granty GA ČR č. 203/02/1483, 203/02/0420 a 203/04/0426).

Seznam symbolů

A	absorbance molekuly při excitační vlnové délce
α	frakce absorbované energie uvolněné jako „rychlé“ teplo
E_a	celková absorbovaná energie
E_f	energie nesená fluorescenčními kvanty
E_{Δ}	energie nesená $O_2(^1\Delta_g)$; $94,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
E_o	energie dopadajícího pulsu
Φ_{Δ}	kvantový výtěžek produkce 1O_2
Φ_T	kvantový výtěžek tripletových stavů
Φ_f	kvantový výtěžek fluorescence
Φ_{-O}	kvantový výtěžek fotooxidace zhašeče Q
H	amplituda akustického signálu
k	rychlostní konstanta
ν	frekvence excitujícího záření
R	poloměr excitujícího pulsu
S_q	podíl tripletových stavů senzitizeru, které interagují s kyslíkem
S_{Δ}	frakce tripletových stavů senzitizeru zhašených kyslíkem a poskytujících 1O_2
τ_{Δ}	doba života $O_2(^1\Delta_g)$
τ_{Σ}	doba života $O_2(^1\Sigma_g)$
τ_r	radiační doba života 1O_2
τ_T	doba života tripletových stavů
τ_a	tranzitní čas
τ_a'	efektivní akustický tranzitní čas
ν_a	rychlost zvuku v rozpouštědle

LITERATURA

- Khan A. U., Kasha M.: J. Chem. Phys. 39, 2105 (1963).
- Foote C. S., Wexler S., Ando W., Higgins R.: J. Am. Chem. Soc. 90, 975 (1968).
- Taube H.: J. Gen. Physiol. 49, 29 (1965).
- Wagnerová D. M.: Z. Phys. Chem. 215, 133 (2001).
- George P. v *Oxidases and Related Redox Systems*, (King T. E., Mason H. S., Morrison M., Eds.), J. Wiley, New York 1965. Str. 3.
- Aubry J.-M., Pierot C., Rigaudy J., Schmidt R.: Acc. Chem. Res. 36, 668 (2003).
- Emsenhuber M., Pöchlauer P., Aubry J.-M., Nardello V., Falk H.: Monatsh. Chem. 134, 387 (2003).
- Aubry J. M., Cazin B., Duprat F.: J. Org. Chem. 54, 726 (1989).
- Tarr M., Valenzano D. P.: Photochem. Photobiol. Sci. 2, 355 (2003).
- Slanger T.G., Copeland R.A.: Chem. Rev. 103, 4731 (2003).
- Ogilby P. R., Kristiansen M., Clough R. L.: Macromolecules 23, 2698 (1990).
- Matheson I. B. C., Lee J.: J. Am. Chem. Soc. 94, 3310 (1972).
- Bonnett R.: Chem. Soc. Rev. 24, 19 (1995).
- Phillips D.: Pure Appl. Chem. 67, 117 (1995).
- Ochsner M.: J. Photochem. Photobiol. B 39, 1 (1997).
- Nyman E. S., Hynninen P. H.: J. Photochem. Photobiol. B 73, 1 (2004).
- Mach I., Vepřek-Šiška J.: Chem. Listy 74, 1 (1980).
- Mosinger J., Mička Z.: Chem. Listy 88, 212 (1994).
- Kubát P.: Chem. Listy 90, 515 (1996).
- Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: Coord. Chem. Rev. 248, 321 (2004).
- Bensasson R.V., Land E.J., Truscott T.G.: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford 1993. Str. 101.
- Foote C.S.: Photochem. Photobiol. 54, 659 (1991).
- Weldon D., Poulsen T. D., Mikkelsen K. V., Ogilby P. R.: Photochem. Photobiol. 70, 369 (1999).
- Keszthelyi T., Weldon D., Andersen T. A., Poulsen T. D., Mikkelsen K. V., Ogilby P. R. Photochem. Photobiol. 70, 531 (1999).
- Schweitzer C., Schmidt R.: Chem. Rev. 103, 1685 (2003).
- Nelson M. J., Seitz S. P.: *Active Oxygen in Biochemistry*, Vol. 3, (Valentine J. S., Foote C. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 276. Blackie Academic & Professional, London 1995.
- Clennan E. L.: Tetrahedron 56, 9151 (2000).
- Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B.: J. Phys. Chem. Ref. Data 24, 663 (1995).
- Foote C. S., Clennan E. L.: *Active Oxygen in Chemistry*, Vol. 2, (Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., Eds.), Blackie Academic & Professional, London 1995. Str. 105.
- Davies M. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 761 (2003).
- Ochsner M.: J. Photochem. Photobiol. B 39, 1 (1997).
- Davies M. J.: Photochem. Photobiol. Sci. 3, 17 (2004).
- Kubát P., Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: Z. Phys. Chem. 210, 243 (1999).
- Fiel R. J., Howard J. C., Mark E. H., Datta-Gupta N.: Nucleic Acids Res. 6, 3093 (1979).
- Kochevar I. E., Dunn D. A.: *Bioorganic Photochemistry; Photochemistry and the Nucleic Acids*, Vol. 1 (Morrison H. Ed.) J. Wiley & Sons, New York 1990. Str. 273.
- Kubát P., Lang K., Anzenbacher P., Jursíková K., Král V., Ehrenberg B.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 933 (2000).
- Kubát P., Lang K., Král V., Anzenbacher P.: J. Phys. Chem. B, 106, 6784 (2002).
- Lang K., Anzenbacher P., Kapusta P., Král V., Kubát P., Wagnerová D. M.: J. Photochem. Photobiol. B 57, 51 (2000).
- Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J.: J. Photochem. Photobiol. B 63, 88 (2001).
- Armitage B.: Chem. Rev. 98, 1171 (1998).
- Lang K., Wagnerová D. M., Stopka P., Damerau W.:

- J. Photochem. Photobiol. A 67, 187 (1992).
42. Ali H., van Lier J. E.: Chem. Rev. 99, 2379 (1999).
 43. Boyle R. W., Dolphin D.: Photochem. Photobiol. 64, 469 (1996).
 44. Allen C. M., Sharman W. M., van Lier J. E.: J. Porphyrins Phthalocyanines 5, 161 (2001).
 45. Mody T. D., Sessler J. L.: J. Porphyrins Phthalocyanines 5, 134 (2001).
 46. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B.: J. Phys. Chem. Ref. Data 22, 113 (1993).
 47. Redmond R. W., Gamlin J. N.: Photochem. Photobiol. 70, 391 (1999).
 48. MacDonald I. J., Dougherty T. J.: J. Porphyrins Phthalocyanines 5, 105 (2001).
 49. Jasat A., Dolphin D.: Chem. Rev. 97, 2267 (1997).
 50. Lang K., Wagnerová D. M., Engst P., Kubát P.: Z. Phys. Chem. 187, 213 (1994).
 51. Lang K., Kubát P., Mosinger J., Wagnerová D. M.: J. Photochem. Photobiol. A 119, 47 (1998).
 52. Riccheli F.: J. Photochem. Photobiol. 55, 306 (1995).
 53. Mosinger J., Deumié M., Lang K., Kubát P., Wagnerová D. M.: J. Photochem. Photobiol. A 130, 13 (2000).
 54. Mosinger J., Kliment V., Sejbál J., Kubát P., Lang K.: J. Porphyrins Phthalocyanines 6, 514 (2002).
 55. Reddi E., Valduga G., Rodgers M. A. J., Jori G.: Photochem. Photobiol. 54, 633 (1991).
 56. Kraljic I., El Mohsni S.: Photochem. Photobiol. 28, 577 (1978).
 57. Girotti A. W., Korytowski W.: Methods Enzymol. 319, 85 (2000).
 58. Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T.: J. Am. Chem. Soc. 123, 2530 (2001).
 59. Thompson A., Lever J. R., Canella K. A., Miura K., Posner G. H., Seliger H. H.: J. Am. Chem. Soc. 108, 4498 (1986).
 60. Mosinger J., Mička Z.: J. Photochem. Photobiol. A 107, 77 (1997).
 61. Braslavsky S. E., Heibel G. E.: Chem. Rev. 92, 1381 (1992).
 62. Nonell S., Braslavsky S. E.: Methods Enzymol. 319, 37 (2000).

K. Lang^a, J. Mosinger^{a,b}, and D. M. Wagnerová^a

(^aInstitute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež; ^bDepartment of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Praha): Progress in Photochemistry of Singlet Oxygen

The paper reviews the present state of knowledge in photochemistry of singlet oxygen in view of its possible applications in photobiology and photomedicine. The review elucidates the mechanism and kinetics of photosensitized reactions producing singlet oxygen. Reactions of singlet oxygen involve in particular oxidation of amino acids and amino acid residues in proteins and of nucleobases in nucleic acids. Porphyrinoid sensitizers are classified according to the charge and functional groups (anionic, cationic, amphiphilic, hydrophobic). These characteristics are essential for non-covalent interactions with biopolymers or abiotic carriers, which influence photophysical properties of the sensitizer in particular microenvironment. Finally, detection, determination and spectroscopy of singlet oxygen are surveyed and prospects of its applications briefly outlined.