

SINGLETOVÝ KYSLÍK V PRAXI – SOUČASNOST A PERSPEKTIVA

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

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

Došlo 28.1.05, přijato 27.6.05.

Klíčová slova: singletový kyslík, senzitivace, fotosenzitivace, fotodynamický efekt

Obsah

1. Úvod
2. Praktické aplikace
 - 2.1. Organická syntéza
 - 2.2. Fotomedicína
 - 2.3. Dezinfekce
 - 2.4. Úprava a čištění vody
 - 2.5. Pesticidy
 - 2.6. Chemický kyslíko-jodový laser
3. Škodlivé účinky singletového kyslíku
4. Singletový kyslík v atmosféře a v životním prostředí
5. Výhledy

1. Úvod

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$, energeticky bohatší a vysoce reaktivní forma molekulárního kyslíku, hraje významnou roli v mnoha chemických a biologicky relevantních procesech*. Zvláštní význam pro vznik $^1\text{O}_2$ mají fotosenzitizované reakce – světlem iniciované reakce sloučenin obsahujících chromofory, po jejichž excitaci se přenáší absorbovaná energie na kyslík za vzniku $^1\text{O}_2$. Senzitivátory jsou účinné již při velmi nízkých koncentracích, protože jedna molekula senzitivátoru může opakovaným přenosem energie produkovat mnoho molekul $^1\text{O}_2$. Rozvoj experimentálních technik v posledních letech přispěl k objasnění mechanismů jeho vzniku a reakcí a umožnil vzrůstající počet elegantních aplikací.

Předchozí články^{1,2} jsme věnovali základním principům fotosenzitizovaných reakcí produkujících $^1\text{O}_2$, vlastnostem $^1\text{O}_2$ a metodám jeho detekce. Je třeba zdůraznit, že v reálných systémech senzitivátory vstupují do nekovalentních interakcí s okolními molekulami, např. biopolymery, a mohou vytvářet organizované molekulární útvary. Tyto interakce jednak ovlivňují fotofyzikální vlastnosti senzitivátorů, které se pak mohou chovat jinak než v jednoduchém roztoku, jednak určují místo vzniku $^1\text{O}_2$. Vzhledem k vysoké reaktivitě a rychlé deaktivaci $^1\text{O}_2$ v kondenzované fázi je doba jeho života omezená a reakce mohou probíhat pouze v oblasti dané difúzním poloměrem (např. desítky nm v buňce). Lokalizace vzniku spolu s krátkou dobou života mají za následek specifické resp. selektivní působení singletového kyslíku. V tomto referátu chceme přiblížit čtenářům jak praktické využití singletového kyslíku, které již není pouhou teoretickou možností, tak i jeho nežádoucí účinky.

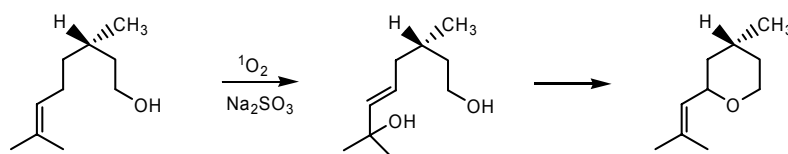
2. Praktické aplikace

2.1. Organická syntéza

Singletový kyslík je používán v organické syntéze jako silné a přitom selektivně působící oxidační činidlo. Základními reakcemi jsou adice na vazbu $\text{C}=\text{C}$ a to en-reakce, 2+2 cykloadice, 4+2 cykloadice, a dále oxidace sulfidů^{3–5}. Současný přístup je zaměřen na obecnější otázky jako je vliv substituentů na regio- a stereoselektivitu, detailní mechanismus reakcí a identifikace krátkoživých meziproduktů⁶. Ze syntetického hlediska jsou en-reakce a 4+2 cykloadiční reakce nejvýznamnější a vedou ke vzniku allylových hydroperoxidů, endoperoxidů a meziproduktů pro syntézu např. allylalkoholů, epoxyalkoholů, diolů a nasycených polyolů. Typickým příkladem je fotooxygenní 4-methylpent-3-en-2-ol na β -hydroperoxyalkohol, který po konverzi poskytuje 1,2,4-trioxan vykazující antimalarickou aktivitu⁷. Průmyslově provozovaná fotooxidace (–)-citronellolu senzitivovaná bengálskou červení poskytuje za redukčních podmínek odpovídající allylalkohol, následně po konverzi v kyselém prostředí cyklický terpenoid, který je významnou komponentou používanou při výrobě parfémů⁸ (obr. 1).

Využití $^1\text{O}_2$ vyžaduje vyřešení technického problému, kterým je dostatečně vydatný zdroj této částice generované většinou *in situ*. Každá z používaných metod má svá omezení. Fotosenzitizovaná generace $^1\text{O}_2$ probíhá obvykle v kapalně fázi. Pokud je senzitivátor ukotven na tuhém

* Není-li uvedeno jinak, je singletovým kyslíkem míněn nejnížší excitovaný stav kyslíku $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.



Obr. 1. Syntéza (–)-rose oxidu fotooxidací (–)-citronellolu

nosiči, lze jej snadno oddělit od produktů reakce a oxidovat i bez použití rozpouštědla⁷. Metody využívající k přípravě $^1\text{O}_2$ disproportionaci H_2O_2 ve vodném prostředí jsou omezeny nerozpustností hydrofobních organických substrátů a existencí nežádoucích vedlejších reakcí dalších reaktivních kyslíkových částic. Totéž platí i o použití rozkladu peroxokyselin, peroxomolybdenanu nebo peroxochromanu. Elegantní metodou je termické uvolňování $^1\text{O}_2$ z peroxidu vápenatého $\text{CaO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_2$, který může být dispergován v organické fázi⁹. Příprava isotopově značeného $^1\text{O}_2$ umožňuje sledování mechanismu kyslíkového přenosu. K těmto studiím lze použít naftalenendoperoxid, připravený fotosenzitizovanou reakcí v atmosféře $^{18}\text{O}_2$ obohaceného na 99 % (cit.¹⁰).

2.2. Fotomedicína

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT)** je neinvazivní metodou léčby nejrůznějších typů rakoviny kombinovaným užitím viditelného či blízkého infračerveného světla a senzitizeru^{11–14}. Terapeutická strategie je následující: senzitizer je zaveden do krevního řečiště a postupně se akumuluje v neoplastických tkáních. Na retenci senzitizerů v tumorech se podílí vedle jejich zvýšené afinity k rychle rostoucím tkáním řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismu tumorů. Tumorová tkáň s akumulovaným senzitizerem je ozářena světlem s vlnovou délkou 600–900 nm (oblast tzv. terapeutického okna), které prochází tkání do větší hloubky a excituje senzitizer. Světelným zdrojem bývají lasery, ale používají se i jiné zdroje např. LED diody. V případě vnitřních nádorů je nutno vést světlo k tumorové tkáni optickými vlákny. Po ozáření přenáší excitovaný senzitizer absorbovanou energii na volně rozpuštěný kyslík v tkáních za vzniku $^1\text{O}_2$. Senzitizer se přenesením energie vrací do základního stavu a děj se může opakovat, pokud trvá světelná excitace a je přítomen kyslík. Díky krátké době života a tím malého difuzního poloměru singletového kyslíku ($\leq 0,1 \mu\text{m}$) lze PDT považovat za selektivní metodu tumorové léčby, protože zasahuje pouze ozářenou oblast tumoru obsahující senzitizer. Oxidativní atak cytotoxického $^1\text{O}_2$ vede k buněčnému poškození a následně k destrukci rakovinných buněk. Tato přímá buněčná destrukce je doprovázena poškozením tumorových cév, a tím je významně omezena výživa tumoru. Navíc může PDT aktivovat

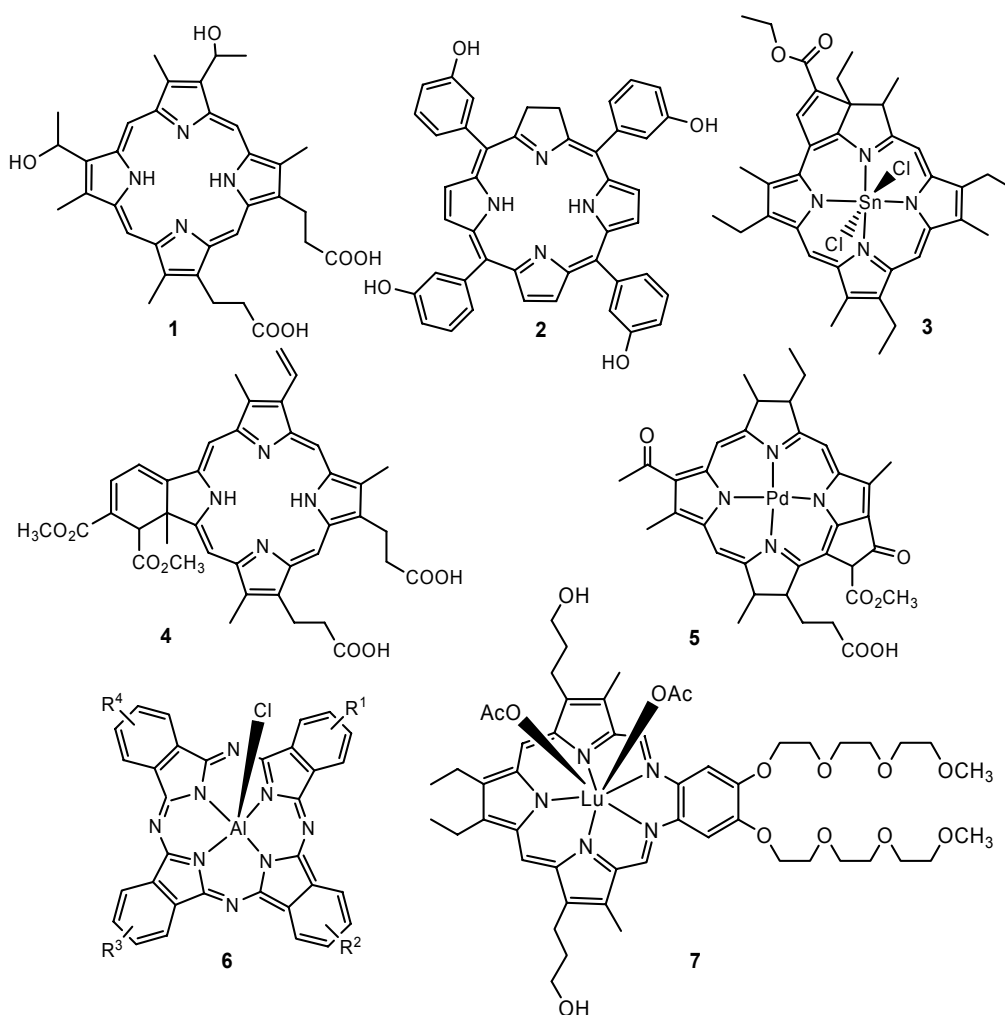
imunitní systém k ataku na tumorové tkáně¹⁵. Dokud se zdravá tkáň nezabaví senzitizeru, což může trvat několik dní, neměl by být pacient vystaven přímému dennímu světlu z důvodu možné fotosenzitizace kůže a jejího následného poškození.

Senzitizer vhodný pro aplikaci v PDT musí splňovat řadu kritérií^{11,12,14}. Nejdůležitější jsou:

- vhodná absorpce senzitizeru. Výhodou je vyšší absorpce v oblasti vlnových délek „terapeutického okna“ a naopak nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm z důvodu možné fotosenzitizace kůže,
- dostatečně selektivní retence senzitizeru v neoplastických tkáních,
- nízká toxicita senzitizeru za nepřítomnosti záření označovaná jako „temná“ toxicita,
- fotostabilita senzitizeru po dobu ozáření tkáně,
- fluorescence senzitizeru, která umožňuje sledování jeho distribuce fluorescenční endoskopií,
- dostatečně vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$,
- důležitou vlastností je rovněž polarita senzitizeru. Polární, hydrofilní senzitizery mohou být aplikovány intravenózně. Hydrofobní senzitizery vyžadují aplikaci na nosičích a vykazují většinou vyšší retenci v tumorových tkáních.

Prvním oficiálně schváleným senzitizerem pro PDT byl derivát hematoporphyrinu (HPD) s obchodním názvem Photofrin. Je to nejasně definovaná směs hematoporphyrinu **1**, (1-hydroxyethyl)vinyldeuteroporphyrinu, protoporphyrinu a složité dimerní a oligomerní frakce. V posledních 20 letech byly vyvinuty senzitizery druhé generace, které jsou již dobře definovanými chemickými individui, vykazují vyšší retenci v tumorové tkáni a absorpci světla při delších vlnových délkách než HPD. Většinou jde o sloučeniny odvozené od porfyrinového makrocyklu: 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyfenyl)chlorin (Foscan) **2**, Sn(IV)-etio-purpurin (Purlytin) **3**, derivát benzoporphyrinu (Visudyne) **4**, Pd(II)-bakteriofioforbid (TOOKAD) **5**, disulfonovaný Al(III)-ftalocyanin **6**, Lu(III)-texafyrin (Lutrin, Antrin) **7**, nebo protoporphyrin IX, který vzniká jako endogenní senzitizer přímo v buňkách stimulovanou biosyntézou z jeho metabolického prekurzoru δ -aminolevulové kyseliny (podrobněji v 2.3.) (obr. 2). Tyto sloučeniny byly již

** Termín „fotodynamický“ označuje mechanismus spočívající v oxidativním působení $^1\text{O}_2$ vznikajícího fotosenzitizovanou reakcí *in situ*.



Obr. 2. Senzitizátory používané ve fotodynamické terapii

schváleny pro léčebné účely nebo jsou v různém stupni klinických testů.

PDT se používá při léčbě kožních melanomů, rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, peritoneální dutiny, žaludku, střev, jater, močového měchýře, prostaty a děložního čípku. Fotodynamická metoda našla také využití při léčbě degenerativních změn na sítnici (Visudyne, Purlytin), nemoci koronárních cév, chronického zánětu dásní a mikrobiálních infekcí.

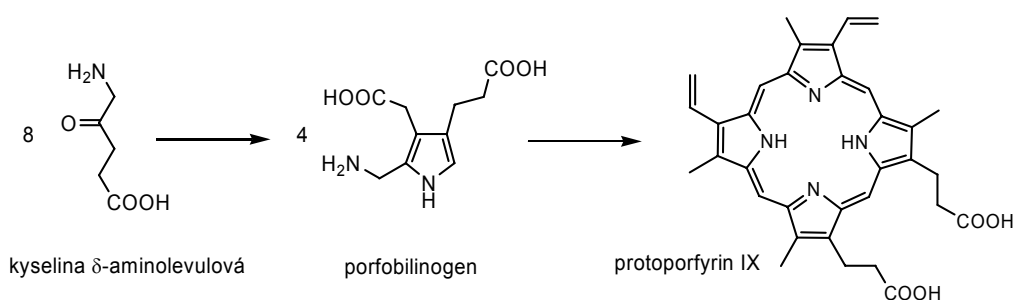
2.3. Dezinfekce

V souvislosti se stále častějším výskytem bakteriálních kmenů resistentních k antibiotikům nabývají na významu sloučeniny působící jiným mechanismem. Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (photodynamic

antimicrobial chemotherapy, PACT) je založena na stejném principu jako PDT (cit.¹⁶). Vlastnost senzitivátorů způsobující fotoinaktivaci *in vitro* i *in vivo* se souhrnně označuje jako fototoxicita nebo fotocytotoxicita. Empiricky je fototoxicita některých barviv vůči mikroorganismům známa již více než sto let. Jako první upozornil na tento jev Raab¹⁷, který pozoroval fototoxicitu akridinu, fenylakridinu a eosinu pro prvoky. Odtud pochází pojem „fotodynamický efekt“^{***}, který zavedl Tappeiner¹⁸ v době, kdy podstata efektu a existence $^1\text{O}_2$ nebyly známy.

Celkový fototoxický efekt je zpravidla způsoben $^1\text{O}_2$, ale mohou k němu přispívat superoxidový anion-radikál O_2^- , hydroxylové radikály $\text{OH}^\bullet$, případně další radikály senzitivátoru nebo jiných přítomných molekul. Zatímco při PDT se používají téměř výhradně porfyrinoidní senzitivá-

*** Název se vžil a začal se používat běžně i pro označení fotosenzitivovaných oxidací nízkomolekulárních látek *in vitro*.



Obr. 3. Biosyntéza endogenního senzitizeru protoporphyrinu IX

tory, pro fotodynamickou dezinfekci se používají i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová barviva a xanthenová barviva (bengálská červen). Fenothiazinová a akridinová barviva nabízejí výhodu dvojího účinku – jako konvenční dezinfekční činidla a jako fotodynamické senzitizery se širokým spektrem antibakteriální a antivirové aktivity^{19–21}.

Výsledný antimikrobiální efekt závisí jak na povaze senzitizeru, tak na druhu mikroorganismu. Gram-negativní[#] bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) obvykle nepodléhají aniontovým a elektricky neutrálním senzitizerům, ale kladně nabitým senzitizerům mají výrazný inaktivační účinek. Gram-pozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*) se inaktivují účinkem aniontových, kationtových i elektricky neutrálních senzitizerů, ale zdá se, že kationtové senzitizery jsou obecně účinnější^{22,23}. Účinnost senzitizeru je zřejmě závislá na povaze buněčné struktury, která určuje lokalizaci senzitizeru, a na jeho interakci s okolními biomolekulami¹⁶.

Elegantní fotodynamická metoda, používaná rovněž u PDT či pesticidů, spočívá ve vytváření endogenního senzitizeru přímo v buňce nebo organismu¹³. Metoda spočívá v podávání velkých dávek kyseliny δ -amino-levulové (ALA, 5-amino-4-oxopentanová kyselina), která je prekurzorem biosyntézy životně důležitých porfyrinů (obr. 3). Vysoká koncentrace ALA vede k enormnímu zvýšení koncentrace protoporphyrinu IX, který je účinným senzitizerem produkujícím $^1\text{O}_2$. Metalace protoporphyrinu IX na nesenzitizující Fe(II)-protoporphyrin IX, katalyzovaná ferrochelatasou, je za těchto podmínek příliš pomalá.

Perspektivní využití $^1\text{O}_2$ se objevuje v oblasti dezinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze²⁴. Při současné potřebě transfuzí a nebezpečí infekce musí dezinfekční proces splňovat náročné standardy. Především je třeba, aby byly cíleně zasaženy patogeny různé povahy – viry (HIV), bakterie, kvasinky, prvoci (*Plasmodium malariae*) a přitom nebyly ohroženy krevní komponenty jako např. červené krvinky. Fotodynamická metoda je založena na skutečnosti, že krevní plasma a červené krvinky neobsahují

nukleové kyseliny, kdežto bílé krvinky a infikující mikroorganismy nukleové kyseliny obsahují. Lze proto použít selektivně působící kationtové senzitizery s planární strukturou, které se interkalují do DNA mezi páry bází. Dalším požadavkem je, aby senzitizery absorbovaly záření v oblasti mimo absorpci hemových pigmentů, tedy vlnové délky větší než 600 nm. Tomu vyhovují modrá barviva jako jsou kationtové ftalocyaniny Zn nebo Si a fenothiazinová barviva²⁴. Ze čtyř nukleobází singletový kyslík oxiduje hlavně guanin a způsobuje nevratné poškození DNA²⁵, mimo to oxidativně degraduje buněčné membrány. Zatím je nejvíce používána methylenová modř, která má delší tradici různých lékařských aplikací. Nové senzitizery odvozené od fenothiazinového skeletu vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu, avšak dosud nebyly testovány *in vivo*²⁰.

2.4. Úprava a čištění vody

Úprava a čištění velkých objemů odpadních vod na úroveň pitné vody nebo alespoň na použití k zavlažování bez nebezpečí šíření infekcí, se stává aktuální potřebou pro řadu zemí. Použití $^1\text{O}_2$ k tomuto účelu umožňuje odstranění mikrobiálního znečištění i oxidativní degradaci organických polutantů např. barviv nebo fenolických látek. Optimálního výsledku při inaktivaci Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií bylo dosaženo při použití kationtových porfyrinů nebo kationtových ftalocyaninů. Je zajímavé, že pořadí citlivosti jednotlivých mikroorganismů k fotodynamickému efektu je opačné než pořadí citlivosti k ionizujícímu záření. Příkladem může být *Deinococcus radiodurans*, který je, jak naznačuje název, mimořádně odolný vůči ionizujícímu záření, ale vysoce citlivý na fotodynamický proces²³. K odstraňování koliformních bakterií z fekálních vod určených k recyklaci byla použita kombinace kationtového porfyrinu, bengálské červeně a methylenové modři²⁶. Pro velké objemy čištěné vody jsou z důvodu snadnější regenerace výhodnější imobilizované senzitizery zakotvené na tuhém nosiči. K detoxifikaci (také od chemických pesticidů) a k dezinfekci vody byly použity

[#] Gramovo rozdělení bakterií je založeno na barvení bakterií krystalovou violetí. Gram-pozitivní bakterie se barví trvale, Gram-negativní se po čase odbarvují. Rozdíl je dán různým složením buněčné stěny.

porfyrinové senzitizery zakotvené na poly(methylmetakrylátu)²⁷.

Úprava vody fotokatalytickým působením TiO_2 ve vodných suspenzích nebo v tuhé fázi nalézá v poslední době stále širší uplatnění, mj. také pro láčavou možnost využití slunečního záření²⁸. Na konečném čistícím účinku se podílí vedle radikálů $\text{OH}^\bullet$ zřejmě i $^1\text{O}_2$, jehož vzniku při fotokatalýze TiO_2 byla zatím věnována jen okrajová pozornost. Nedávno byl vznik $^1\text{O}_2$ doložen spektroskopicky²⁹.

2.5. Pesticidy

Pesticidy je souhrnný název pro látky hubící rostliny a živočichy, škodlivě nebo zhoubně působící proti zájmům lidstva. Narozdíl od konvenčních chemických pesticidů, jejichž vedlejším účinkem je kontaminace půdy a povrchových vod, jsou fotodynamické pesticidy netoxické a nezatěžují životní prostředí, protože jsou účinné v mnohonásobně nižší koncentraci a vlivem slunečního záření se rozkládají většinou během několika hodin. Jako fotodynamické pesticidy se používají xanthenová barviva (floxin B, bengálská červeň, uranin), furokumariny (psoraleny) (obr. 4) a porfyriny, zejména endogenní, akumulované v tkáni v důsledku vysokých dávek ALA (obr. 3)^{30–32}. Tyto pesticidy mohou zároveň působit jako detoxifikační činidla při odstraňování zamoření chemickými pesticidy. Za přírodní fotodynamické pesticidy lze označit některé sloučeniny izolované z vyšších rostlin (např. α -terthienyl, furokumarin, chinoidní sloučeniny) sloužící jako přirozená ochrana proti škůdcům, rostlinným patogenům a konkurujícím druhům rostlin – plevelům³³.

Fotodynamické insekticidy byly intenzivně zkoumány během 90. let, zejména v souvislosti s hmyzem napadajícím citrusové a olivovníkové plantáže. Fotoinsekticidní aktivitu vykazují xanthenová, fenothiazinová, akridinová barviva, furokumariny, porfyriny a některé další látky. Dobré výsledky byly získány s halogenovaným xanthenovým barvivem floxin B, které bylo prvním polním fotoinsekticidem schváleným v USA. Narozdíl od většiny používaných senzitizerů je floxin B mírně toxický³¹.

Použití porfyrinů jako fotodynamických insekticidů je výhodné pro jejich příbuznost s biologicky aktivními látkami, pro kterou jsou dobře přijímány organismy, vysoké kvantové výtěžky $^1\text{O}_2$ a absorpci světla v širokém pásmu

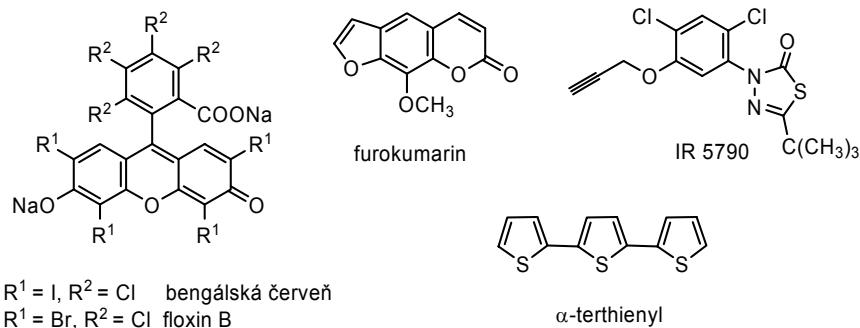
blízkého UV a Vis záření, tedy v pásmu slunečního záření. Mimo to jsou porfyriny účinné proti různým druhům hmyzu a larev, mohou se rozkládat účinkem světla a jsou cenově přístupné. Při aplikaci porfyrinů je možno postupovat dvojím způsobem:

- vytvářením endogenních porfyrinů v organismu obohacením potravy ALA, jak bylo popsáno v 2.3.,
- přímým podáváním porfyrinu např. Zn(II)-5,10,15,20 -tetrafenylporfyrinu, hematoporfyrinu IX v návnadě nebo postřikem. Optimální účinnost byla pozorována u amfifilních porfyrinů. Insekticidní mechanismus spočívá především v oxidačním napadání lipofilních buněčných membrán trávicího traktu. U kmenů hmyzu, jejichž populace byla opakovaně redukována fotodynamickým mechanismem, nebyla pozorována získaná fotorezistence^{30,34}.

Endogenní fotodynamické herbicidy jsou porfyriny, které jsou metabolickými meziprodukty biosyntézy chlorofylu, zejména Mg-protoporfyrin IX. Jejich akumulace v zelených rostlinách je výsledkem vysokých koncentrací ALA. Jde v zásadě o stejnou metodu využití endogenního senzitizeru jako u jiných pesticidů, s tím rozdílem, že konečným produktem není jen protoporfyrin IX, ale i další senzitizerující porfyrinové metabolity obsahující hořčík³². Singletový kyslík vznikající při ozáření rostliny slunečním světlem blokuje syntézu chlorofylu a destruuje membrány chloroplastů. Na listech se objevují odbarvené skvrny, u některých herbicidů již po 20 minutách po aplikaci. Dostupný je arylthiadiazolonový herbicid IR 5790 se širokým spektrem účinnosti proti plevelům, který také způsobuje akumulaci fotodynamického prekursoru chlorofylu³⁵ (obr. 4).

2.6. Chemický kyslíko-jodový laser

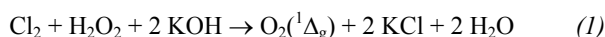
Kyslíko-jodový laser je chemickým laserem (chemical oxygen-iodine laser, COIL), který převádí energii chemické reakce na fotony. Je založen na elektronickém přechodu mezi prvním elektronovým a základním stavem atomárního jodu $\text{I}(^2P_{1/2}) \rightarrow \text{I}(^2P_{3/2})$ a protože kontinuální laserová oscilace probíhá v blízké infračervené oblasti na vlnové délce 1,315 μm , je COIL chemickým laserem s nejkratší vlnovou délkou. Díky vhodné vlnové délce pro vláknovou optiku, dostupnosti základních chemi-



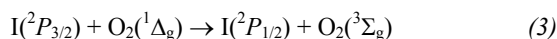
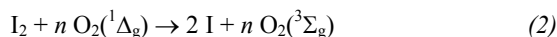
Obr. 4. Fotodynamické pesticidy

kálií a možnosti získat vysokoenergetické svazky byla vývoji technologie COIL věnována velká pozornost. První zařízení bylo uvedeno do provozu v roce 1977 a mělo výkon 4 mW (cit.³⁶). Nejvyšší publikovaný výkon v současné době je přibližně 40 kW. Uvádí se, že COIL je vhodný pro průmyslové aplikace jako je vysokorychlostní řezání nebo vrtání. Hlavním směrem výzkumu v USA jsou obranné systémy určené pro ničení taktických balistických střel, kdy COIL o výkonu řádu MW má být umístěn na palubě monitorujícího letadla.

V klasickém uspořádání je čerpání laseru dosaženo přenosem energie mezi $^1\text{O}_2$ a atomem jodu v základním stavu. Singletový kyslík vzniká reakcí plynného chloru a silně alkalického vodného roztoku H_2O_2 .



Výtěžky $^1\text{O}_2$ v reakci (1) vysoce převyšují prahovou hodnotu 15 % singletového kyslíku při 300 K nutných pro dosažení inverze populace na elektronovém přechodu atomu jodu. Po smíšení $^1\text{O}_2$ s molekulárním jodem se menší část energie spotřebuje na disociaci I_2 (2) a druhá větší část na excitaci I (3).



Reakce (2), která snižuje koncentraci $^1\text{O}_2$, může být eliminována disociací I_2 mikrovlnným výbojem, výbojem v plynném alkyljodidu či chemickou reakcí (např. HI s Cl, cit.³⁷). Protože použití nestabilních alkalických roztoků obsahujících H_2O_2 ve velkém měřítku přináší řadu komplikací, jsou také vyvíjeny generátory $^1\text{O}_2$ na jiném principu jako jsou elektrický výboj v atmosféře O_2 , excitace kapalného O_2 , reakce $\text{Na}_2\text{O}_2(\text{s})$ s $\text{HCl}(\text{g})$, nebo je $\text{I}(^2P_{1/2})$ produkován reakcí atomárního jodu s NCl.

3. Škodlivé účinky singletového kyslíku

V předchozích kapitolách jsme uvedli různá využití $^1\text{O}_2$ související s vysokým obsahem energie této částice. Reaktivita $^1\text{O}_2$ však může působit nežádoucí efekty a znamenat i zdravotní riziko. Jde např. o degradaci proteinů, mutagenicitu a efekty stárnutí. Reakce biologicky relevantních molekul s $^1\text{O}_2$ se vyznačují značným počtem meziproductů a konečných produktů a jejich mechanismus doposud není plně objasněn.

V biologických systémech vzniká $^1\text{O}_2$ jako meziproduct některých enzymatických procesů, avšak daleko důležitějším zdrojem je jeho fotosenzitizovaná produkce. U proteinů je vznik $^1\text{O}_2$ přímou excitací zanedbatelný z důvodu velmi nízkých kvantových výtěžků a nízké absorpce světla v oblasti vlnových délek nad 290 nm, které dopadají na zemský povrch. Nejvýznamnějším zdrojem $^1\text{O}_2$, jehož vlivu jsou proteiny vystaveny, je fotochemické působení jiných chromoforů. Jde hlavně o endogenní senzitizery, často neznámé struktury, nebo léčiva. Oxidaci singletovým kyslíkem podléhají hlavně histidin, tyrosin, methionin, cystein a tryptofan^{38,39}. Vznikající peroxidy

a peroxyradikály jsou nositeli dalšího oxidativního útoku, způsobujícího fragmentaci proteinu, síťování a agregaci. Tyto změny jsou ireverzibilní, negativně postihují funkce proteinů a zdá se, že nepřímě poškozují i DNA⁴⁰.

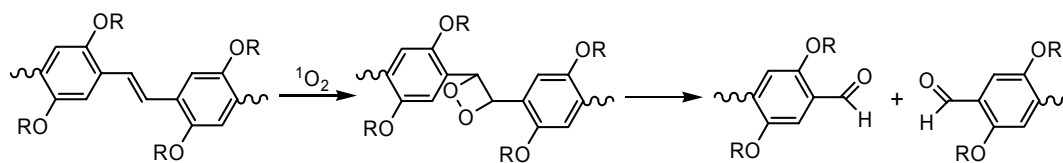
Energeticky nejbohatší komponentou slunečního záření dopadajícího na zemský povrch je záření označované jako UVB (280–320 nm), které může přímo excitovat jednotlivé báze v DNA, a tím iniciovat další reakce jako jsou tvorba dimerů a fotoadice. Senzitizedá produkce singletového kyslíku probíhá s velmi nízkými kvantovými výtěžky (např. u adenosinu 0,03). Sluneční záření v oblasti UVA (320–400 nm) působí převážně nepřímě prostřednictvím fotosenzitizovaných reakcí, kdy zdrojem $^1\text{O}_2$ mohou být také endogenní senzitizery. Singletový kyslík může být produkován kationtovými senzitizery, které se interkalují mezi páry bází nebo vážou do žlábků DNA. Nejvýznamnější je reakce singletového kyslíku s guaninem za vzniku řady produktů, dosud jen částečně identifikovaných²⁵. Reakcí dochází ke vzniku jednoduchých zlomů a štěpení DNA^{41,42}. Ostatní báze jsou k $^1\text{O}_2$ odolnější.

Typickou reakcí $^1\text{O}_2$ s lipidy je adice na dvojnou vazbu nenasycených mastných kyselin za vzniku řady peroxidových a radikálových produktů⁴³. Sulfidy a obecně sloučeniny dvojvazné síry ochotně reagují přímo s $^1\text{O}_2$. Primárním produktem reakce je nestabilní persulfoxid ($\text{R}_2\text{S}^+-\text{OO}^+$), který má také významnou roli při oxidaci biopolymerů obsahujících methionin⁴⁴. Pro svou reaktivitu byly sulfidy studovány hlavně jako ochranné antioxidanty v živých organismech⁴⁵.

Uvádí se, že $^1\text{O}_2$ spolupůsobí nebo je původcem některých chorob, jako např. porfyrie a očního šedého zákalu. Porfyrie označuje skupinu dědičných metabolických chorob, spočívajících v poruše biosyntézy krevního barviva, místo něhož vznikají fotosenzitizující porfyriny. U některých typů porfyrie se porfyriny ukládají v pokožce a vlivem slunečního záření produkují $^1\text{O}_2$, který způsobuje rozsáhlé poškození kůže⁴⁶. Šedý zákal (katarakta) případně další poškození oka intenzivním světlem souvisí s přítomností endogenních senzitizerů produkujících $^1\text{O}_2$ a další reaktivní kyslíkové částice (např. O_2^- , $\text{OH}^\cdot$). Oko je chráněno složitým systémem účinných antioxidantů, ale s věkem a vlivem některých léčiv produkce antioxidantů klesá⁴⁷.

Obranné látky, jimiž se organismus chrání proti vlivu $^1\text{O}_2$, jsou chemické zhášeče, které přímo reagují s $^1\text{O}_2$, nebo látky reagující s peroxidy a peroxidovými radikály, které jsou produkty primárních reakcí – oxidací mastných kyselin, peptidů a proteinů. K první skupině patří karotenoidy (β -karoten, lykopen), vitamin E (α -tokoferol), kyselina močová, ergothionein a melatonin^{45,46,48}. Antioxidanty druhé skupiny reagující s peroxysloučeninami jsou nízkomolekulární thiohy⁴⁹, glutathion, kyselina askorbová a některé karotenoidy⁴. Enzymatické antioxidanty katalasa, superoxiddismutasa a křenová peroxidasa jsou u peroxidových meziproductů neúčinné⁵⁰.

Odbarvování barviv vlivem slunečního záření tj. vlivem záření o vlnových délkách $\lambda > 290$ nm probíhá reduktivními nebo oxidativními mechanismy. Mechanismus



Obr. 5. Mechanismus degradace fenylenvinylénového oligomeru singletovým kyslíkem (2+2 cykloadice)

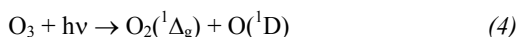
odbarvování záleží především na typu a fotochemických vlastnostech barviva, na materiálu nosiče (vlákna, filmu, folie), přístupu kyslíku a přítomnosti zhášečů excitovaných stavů. Singletový kyslík hraje dominantní roli při odbarvování trifenylmethanových barviv a sulfonovaných ftalocyaninů zinku. Odbarvování zabraňují některé nikelnaté komplexy reagující přímo s $^1\text{O}_2$ nebo lapáče peroxyradikálů, které jsou meziproducty oxidace barviva nebo materiálu nosiče^{51,52}. Žloutnutí celulosy způsobuje příměs ligninu, který působí jako senzitizer produkující $^1\text{O}_2$ (cit.⁵³). Fotoiniciované žloutnutí vlny je způsobeno oxidativní degradací keratinu, zejména tryptofanových skupin vlivem $^1\text{O}_2$ a reaktivních kyslíkových částic⁵⁴.

Polymery degradují vlivem singletového kyslíku, pokud obsahují fotosenzitizující barviva nebo je některá z komponent polymeru fotosenzitizujícím chromoforem. Nebarvené plasty skládající se z alifatických řetězců (PET, PVC) centra pro vznik $^1\text{O}_2$ neobsahují. Nejpodrobněji byl vliv $^1\text{O}_2$ studován u fenylenvinylénových polymerů a oligomerů, které mají elektroluminiscenční vlastnosti a používají se jako materiály pro LED diody. Fotosenzitizující fenylénové skupiny jsou zdrojem singletového kyslíku, který způsobuje oxidativní degradaci materiálu a je rozhodujícím faktorem pro životnost diod (obr. 5). Degradaci je možno potlačit zavedením vhodných substituentů, např. CN, nebo omezením kontaminace materiálu kyslíkem během výroby^{55–57}.

4. Singletový kyslík v atmosféře a v životním prostředí

Hlavním zdrojem $^1\text{O}_2$ v atmosféře je fotolýza ozonu UV zářením probíhající hlavně ve vysokých vrstvách atmosféry. Z hlediska vlivu na životní prostředí může mít význam výskyt singletového kyslíku i v nižších a zejména přízemních vrstvách atmosféry.

Fotolýza ozonu na $^1\text{O}_2$ je spinově dovolenou reakcí



Kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ se pro vlnové délky menší než 305 nm blíží jedné, pro záření s delší vlnovou délkou výtěžky rychle klesají a nad 355 nm jsou téměř zanedbatelné^{58,59}. Vzhledem k tomu, že na zemský povrch dopadá záření s vlnovými délkami většími než asi 290 nm, je zřejmé, že fotolýza může probíhat v celé atmosféře. Dalším produktem fotolýzy je vysoce reaktivní atomární kyslík v excitovaném singletovém stavu, který s atmosférickou

vodou reaguje na radikál $\text{OH}^\bullet$. Singletový kyslík může vznikat v atmosféře rovněž fotosenzitizovanou reakcí. Možným senzitizerem je NO_2 (excitace při $\lambda \sim 398 \text{ nm}$), který generuje oba excitované stavy kyslíku, tj. $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$.

Městský vzduch a smog obsahují $^1\text{O}_2$, jehož množství kolísá během dne v závislosti na intenzitě slunečního záření a na míře znečištění. Během slunečního dne byla naměřena koncentrace $^1\text{O}_2$ až 22 ppb ($\sim 5 \times 10^{11} \text{ molekul cm}^{-3}$). Singletový kyslík iniciuje chemické reakce převážně ve styku s kapalnou fází – v kapkách vody, mracích a mlhách. Reaguje s nenasycenými organickými sloučeninami na peroxyacyl radikály, které jednak oxidují NO na NO_2 , jednak dále reagují s NO_2 na dráždivý peroxyacyl-nitrát RC(O)-O-O-NO_2 . „Přízemní“ $^1\text{O}_2$ vznikající ve znečištěné atmosféře je faktorem ohrožujícím životní prostředí a může hrát roli v patologii člověka, zvířat i rostlin.

Singletový kyslík je jednou z reaktivních kyslíkových částic, vznikajících v povrchových vodách působením slunečního záření reakcemi senzitizerovanými různými organickými chromofory, zejména huminovými látkami. Na vzniku reaktivních kyslíkových částic závisí abiotický samočisticí proces včetně fotooxidativní degradace antropogenních látek. Jelikož však doba života $^1\text{O}_2$ ve vodě je v řádu mikrosekund a jeho maximální koncentrace se pohybuje od $1 \cdot 10^{-12}$ do $1 \cdot 10^{-15} \text{ M}$, zdá se, že příspěvek singletového kyslíku není podstatný^{60,61}.

5. Výhledy

V předchozích odstavcích jsme ukázali možnosti využití singletového kyslíku stejně jako jeho potenciální škodlivé účinky. V budoucnu se dá očekávat metodický pokrok a další rozšíření v následujících oblastech. Jde hlavně o léčbu rakoviny a dalších nemocí jako makulární degenerace sítnice a ateroskleróza, a léčbu lokalizovaných infekcí. Vývoj metody PDT nemusí být výrazně závislý na syntéze nových senzitizerů s odpovídajícími vlastnostmi. Rozhodujícím krokem je spíše zdoluhavé testování jejich účinnosti v biologickém materiálu *in vivo*. Dalším přínosem může být pokrok v molekulárním rozpoznávání a na základě toho cílená volba nosiče senzitizeru např. typu monoklonálních protilátek. Nové možnosti přináší dvoufotonová fotosenzitizovaná produkce singletového kyslíku. K excitaci vhodných senzitizerů je možno použít fotony s menší energií než při jednofotonové excitaci, tj. blízké infračervené záření, které v tkáni proniká do větší hloubky^{62,63}.

Emisní mikroskopie singletového kyslíku je založena na měření jeho luminiscence poté, co byl vzorek excitován laserem⁶⁴. Vyvinené metody využívající jednofotonové i nelineární dvoufotonové excitace umožňují zobrazovat mikroskopické heterogenity a fázové domény v polymerních materiálech; v biologických systémech lze rozlišit jednotlivé buňky. Rozlišení je dáno skutečností, že singletový kyslík je lokalizován v místě jeho vzniku. Tato metoda umožní nový pohled na řadu procesů, které závisí na kyslíku jako např. fotoiniciovaná smrt buněk.

Lákavou perspektivou je technologické zvládnutí vazby senzitizerů na vhodné minerální, polymerní nebo textilní nosiče, které by umožnilo výrobu materiálů se zabudovanou automatickou dezinfekcí iniciovanou světlem. Materiály mající fotodezinfekční vlastnosti mohou být přímo součástí folií či nátěrůvých hmot.

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

LITERATURA

- Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Coord. Chem. Rev.* 248, 321 (2004).
- Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 99, 211 (2005).
- Frimer A. A. (ed.): *Singlet O₂*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton 1985.
- Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 101. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Foot C. S., Clennan E. L., v knize: *Active Oxygen in Chemistry*, SEARCH Series, Vol. 2, (Foot C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 105. Blackie Academic & Professional, London 1995.
- Clennan E. L.: *Tetrahedron* 56, 9151 (2000).
- Griesbeck A. G., El-Idreesy T. T., Fiege M., Brun R.: *Org. Lett.* 4, 4193 (2002).
- Braun A. M., Maurette M. T., Oliveros E.: *Photochemical Technology*. Wiley, Chichester 1991.
- Pierlot C., Nardello V., Schrive J., Mabillet C., Barbillat J., Sombret B., Aubry J.-M.: *J. Org. Chem.* 67, 2418 (2002).
- Martinez G. R., Ravanat J.-L., Medeiros M. H. G., Cadet J., Di Mascio P.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10212 (2000).
- Boyle R. W., Dolphin D.: *Photochem. Photobiol.* 64, 469 (1996).
- Ochsner M.: *J. Photochem. Photobiol., B* 39, 1 (1997).
- MacDonald I. J., Dougherty T. J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* 5, 105 (2001).
- Nyman E. S., Hynninen P. H.: *J. Photochem. Photobiol., B* 73, 1 (2004).
- Wilson B. C.: *Can. J. Gastroenterol.* 16, 393 (2002).
- Hamblin M. R., Hasan T.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 436 (2004).
- Raab O.: *Z. Biol.* 39, 524 (1900).
- Tappeiner H.: *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 86, 479 (1906).
- Wainwright M., Crossley K. B.: *J. Chemother.* 14, 431 (2002).
- Phoenix D. A., Harris F.: *Trends Mol. Med.* 9, 283 (2003).
- Jori G., Brown S. B.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 403 (2004).
- Minnock A., Vernon D. I., Schofield J., Griffiths J., Parish J. H., Brown S. B.: *J. Photochem. Photobiol., B* 32, 159 (1996).
- Schäfer M., Schmitz C., Facius R., Horneck G., Milow B., Funken K.-H., Ortner J.: *Photochem. Photobiol.* 71, 514 (2000).
- Wainwright M.: *Chem. Soc. Rev.* 31, 128 (2002).
- Armitage B.: *Chem. Rev.* 98, 1171 (1998).
- Jemli M., Alouini Z., Sabbahi S., Gueddari M.: *J. Environ. Monitor.* 4, 511 (2002).
- Faust D., Funken K. H., Horneck G., Milow B., Ortner J., Sattlegger M., Schäfer M., Schmitz C.: *Sol. Energy* 65, 71 (1999).
- Legrini O., Oliveros E., Braun A. M.: *Chem. Rev.* 93, 671 (1993).
- Nosaka Y., Daimon T., Nosaka A. Y., Murakami Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 2917 (2004).
- Ben Amor T., Jori G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 915 (2000).
- Heitz J. R.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 1 (1995).
- Amindari S., Splittstoesser W. E., Rebeiz C. A.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 217 (1995).
- Downum K. R., Wen J.: *Light-Activated Pest Control* (Heitz J. R., Downum K. R., ed.) ACS Symp. Ser. 616, 135 (1995).
- Ben Amor T., Bortolotto L., Jori G.: *Photochem. Photobiol.* 71, 124 (2000).
- Dayan F. E., Meazza G., Bettarini F., Signorini E., Piccardi P., Romagnì J. G., Duke S. O.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2302 (2001).
- McDermott W. E., Pchelkin N. R., Benard D. J., Bousek R. R.: *Appl. Phys. Lett.* 32, 469 (1978).
- Špalek O., Čenský M., Jirásek V., Kodymová J., Jakubec I., Hager G. D.: *IEEE J. Quantum Electron.* 40, 564 (2004).
- Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 173. Oxford University Press, Oxford 1993.
- Lang K., Wagnerová D. M., Engst P., Kubát P.: *Z. Phys. Chem.* 187, 213 (1994).
- Davies M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761 (2003).
- Kochevar I. E., Dunn D. A., v knize: *Bioorganic Photochemistry; Photochemistry and the Nucleic Acids*, Vol. 1 (Morrison H., ed.), str. 273. J. Wiley & Sons, New York 1990.

42. Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J.: *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 88 (2001).
43. Nelson M. J., Seitz S. P., v knize: *Active Oxygen in Biochemistry*, SEARCH Series, Vol. 3, (Valentine J. S., Foote C. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 276. Blackie Academic & Professional, London 1995.
44. Clennan E. L.: *Acc. Chem. Res.* 34, 875 (2001).
45. Rougee M., Bensasson R. V., Land E. J., Pariente R.: *Photochem. Photobiol.* 47, 485 (1988).
46. Bohm F., Edge R., Foley S., Lange L., Truscott T. G.: *J. Photochem. Photobiol. B* 65, 177 (2001).
47. Roberts J. E.: *Int. J. Toxicol.* 21, 491 (2002).
48. Bensasson R. V., Land E. J., Truscott T. G., v knize: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, str. 201. Oxford University Press, Oxford 1993.
49. Davies M. J.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 17 (2004).
50. Morgan P. E., Dean R. T., Davies M. J.: *Free Radical Biol. Med.* 36, 484 (2004).
51. Oda H.: *Dyes Pigments* 48, 233 (2001).
52. Thomas J. L., Allen N. S.: *Dyes Pigments* 53, 195 (2002).
53. Barclay L. R. C., Basque M. C., Vinqvist M. R.: *Can. J. Chem.* 81, 457 (2003).
54. Davidson R. S.: *J. Photochem. Photobiol. B* 33, 3 (1996).
55. Scurlock R. D., Wang B., Ogilby P. R., Sheats J. R., Clough R. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10194 (1995).
56. Dam N., Scurlock R. D., Wang B., Ma L., Sundahl M., Ogilby P. R.: *Chem. Mater.* 11, 1302 (1999).
57. Cumpston B. H., Parker I. D., Jensen K. F.: *J. Appl. Phys.* 81, 3716 (1997).
58. Armerding W., Comes F. J., Schülke B.: *J. Phys. Chem.* 99, 3137 (1995).
59. Wayne R. P.: *Res. Chem. Intermed.* 20, 395 (1994).
60. Blough N. V., Zepp R. G.: *Active Oxygen in Chemistry*, SEARCH Series, Vol. 2, (Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., ed.), str. 280. Blackie Academic & Professional, London 1995.
61. Klementová Š., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 84, 1134 (1990).
62. Paul A., Molich A., Oeckers S., Seifert M., Roder B.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* 6, 340 (2002).
63. Fournier M., Pépin C., Houde D., Ouellet R., van Lier J. E.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 120 (2004).
64. Snyder J. W., Zebger I., Gao Z., Poulsen L., Frederiksen P. K., Skovsen E., McIlroy S. P., Klinger M., Andersen L. K., Ogilby P. R.: *Acc. Chem. Res.* 37, 894 (2004).

K. Lang^a, J. Mosinger^{a,b}, and D. M. Wagnerová^a
^a*Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež;* ^b*Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Praha):*
Singlet Oxygen in Practice – Present State and Prospects

The chemistry of singlet oxygen has been rapidly developing ever since its discovery in the sixties. Nevertheless, the progress in utilization of singlet oxygen is relatively recent. In organic synthesis, singlet oxygen has been used in preparation of novel compounds. Photodynamic therapy of cancer and of some other diseases advanced due to novel specifically acting porphyrinoid sensitizers approved for clinical use. The sensitizers producing singlet oxygen are a promising alternative to inactivation of microorganisms resistant to antibiotics and can also be employed in blood disinfection or water treatment. Photodynamic pesticides are environment-friendly due to the absence of side effects. The use of the chemical oxygen-iodine laser based on singlet oxygen is envisaged in defence systems against ballistic missiles. The harmful effects of singlet oxygen on biological materials, polymers, dyes and textile fibres are briefly discussed.