

**ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI**

**FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

PLZEŇ, 2015

Ing. Jaroslav Freisleben

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

k získání akademického titulu doktor v oboru  
Elektronika

**Ing. Jaroslav Freisleben**

**Elektroluminiscenční dioda jako iniciátor  
reaktivních forem kyslíku**

*Školitel:* Doc. Ing. Aleš Hamáček, Ph.D.

*Datum státní doktorské zkoušky:* 12. 11. 2013

*Datum odevzdání práce:* 31. 8. 2015

# Anotace

Tato disertační práce se zabývá studiem a využitím tzv. fotodynamického efektu v oblasti lékařství, průmyslu a čištění odpadních vod. Fotodynamický efekt spočívá v ozáření fotodynamicky aktivní látky (fotosenzibilizátoru), která v excitovaném stavu přenáší absorbovanou energii na přítomný molekulární kyslík za vzniku jeho vysoce reaktivních forem. Tento jev se doposud využíval výhradně v lékařství při léčbě nádorových onemocnění. Disertační práce rozšiřuje využití tohoto jevu na další oblasti lékařství a některé průmyslové aplikace (jako je např. inaktivace mikroorganismů v kapalných médiích nebo rozklad obtížně odbouratelných chemických látek v odpadních vodách).

Teoretická část práce se zabývá elementárními vlastnostmi kyslíku v základní i excitované podobě, popisem fotoexcitace molekuly kyslíku včetně vzniku jeho singletové formy a metodami její detekce. Dále je uveden princip fotosenzibilizačních reakcí, mechanismů jejich vzniku a kinetiky. Závěrečné kapitoly teoretické části práce jsou věnovány potenciálně vhodným organickým materiálům splňujícím definované požadavky na fotosenzibilizátor a přehledu používaných světelných zdrojů pro fotoexcitaci.

Náplní experimentální části práce je charakterizace a výběr nejvhodnějšího fotosenzibilizátoru a světelného LED zdroje včetně ověření jejich vzájemné interakce. Poslední část disertační práce je věnována aplikacím a zabývá se návrhem a realizací osvitových jednotek pro využití v průmyslu, zdravotnictví a ochraně životního prostředí včetně ověření jejich funkce.

## Klíčová slova

elektroluminiscenční dioda, reaktivní formy kyslíku, singletový kyslík, fotosenzibilizátor, fotodynamická terapie, dezinfekce, antimikrobiální terapie

# Annotation

This dissertation thesis deals with the study and use of the so-called photodynamic effect in medicine, industry and wastewater treatment. The photodynamic effect is based on the irradiation of a photodynamically active substance (the photosensitizer) to generate highly reactive species. Nowadays, this effect is so far exclusively used in the medical treatment of cancer. This thesis expands the use of this phenomenon to other areas of medicine and some industrial applications (such as the inactivation of microorganisms in liquid media, or the decomposition of hardly degradable chemicals in waste water).

The theoretical part focusses on the fundamental properties of oxygen – in its normal and in its excited form, the photoexcitation of oxygen and singlet oxygen detection. Also mentioned are the mechanism and kinetics of photosensitized reactions. The final chapters of the theoretical part of this thesis represent a review of photosensitizers, their properties and classification, followed by a review of light sources for photoexcitation.

The experimental part is devoted to the selection and characterization of the most suitable photosensitizers and LED light sources including verification of their interaction. The last part of the thesis deals with application areas and concerns itself with the design of irradiation units for use in industry, health and environmental protection.

## Keywords

light emitting diode, reactive oxygen species, singlet oxygen, photosensitizer, photodynamic therapy, disinfection, antimicrobial therapy

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem písemnou práci vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použité literatury.

V Plzni dne 31. srpna 2015

Ing. Jaroslav Freisleben

.....

Podpis

# Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. Ing. Aleši Hamáčkovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce a za cenné rady při jejím zpracování. Dále bych rád poděkoval kolegům z Katedry technologií a měření, kteří svou nezištnou pomocí přispěli ke vzniku této práce. Rovněž děkuji Ing. Romanu Gášpárovi z Katedry energetických strojů a zařízení FST ZČU za pomoc se zpracováním a interpretací výsledků simulace proudění.

V neposlední řadě bych rád poděkoval celé své rodině za podporu a trpělivost po celou dobu mého doktorského studia.

Tato disertační práce vznikla s podporou Evropského fondu regionálního rozvoje (ERDF) EU a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci projektu č. CZ.1.05/2.1.00/03.0094:

Regionální inovační centrum elektrotechniky (RICE),

a dále grantem Studentské grantové soutěže ZČU č. SGS-2015-020:

„Technologické a materiálové systémy v elektrotechnice“.

# Obsah

Seznam obrázků	ix
Seznam tabulek	x
Seznam symbolů a zkratk	xiii
<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
1.1 Současný stav problematiky . . . . .	1
1.2 Aplikace . . . . .	2
1.3 Cíle disertační práce . . . . .	5
<b>2 Kyslík a jeho reaktivní formy</b>	<b>6</b>
<b>3 Fotoexcitace a excitované stavy</b>	<b>12</b>
3.1 Energetické stavy excitované molekuly . . . . .	13
3.1.1 Absorpce . . . . .	14
3.1.2 Vibrační relaxace a vnitřní konverze . . . . .	16
3.1.3 Mezisystémový přechod . . . . .	16
3.1.4 Fluorescence a fosforescence . . . . .	16
3.1.5 Zhášení a senzibilizace . . . . .	17
3.2 Fotosenzibilizační reakce kyslíku . . . . .	19
<b>4 Detekce singletového kyslíku</b>	<b>22</b>
4.1 Chemické metody . . . . .	22
4.2 Fyzikální metody . . . . .	23
<b>5 Organické fotosenzibilizátory</b>	<b>25</b>
5.1 Organická barviva . . . . .	25
5.2 Porfyriny . . . . .	27
5.3 Ftalocyaniny . . . . .	28
5.4 Imobilizované fotosenzibilizátory . . . . .	29
5.5 Fotosenzibilizátory v medicíně . . . . .	29
<b>6 Světelné zdroje</b>	<b>31</b>
6.1 Lasery . . . . .	32
6.2 Výbojky . . . . .	33
6.3 Elektroluminiscenční diody . . . . .	34

<b>7</b>	<b>Experimenty</b>	<b>35</b>
7.1	Organický fotosenzibilizátor . . . . .	39
7.1.1	Absorpční spektra vybraných ftalocyaninů . . . . .	39
7.1.2	Stabilita fotosenzibilizátoru . . . . .	43
7.1.3	Agregace fotosenzibilizátoru . . . . .	46
7.1.4	Toxicita ftalocyaninových derivátů . . . . .	49
7.1.5	Zhodnocení výběru materiálu . . . . .	49
7.2	Světelný LED zdroj . . . . .	50
7.2.1	Parametry zdroje záření . . . . .	50
7.2.2	Výběr zdroje záření . . . . .	51
7.2.3	Charakterizace zvolené LED . . . . .	53
7.2.4	Účinnost světelné absorpce fotosenzibilizátorem . . . . .	62
7.2.5	Návrh optimálního provozního režimu LED . . . . .	63
7.3	Systémy pro ověření fotosenzibilizačních reakcí . . . . .	64
7.3.1	Laboratorní fotoreaktor GSO-1 . . . . .	64
7.3.2	Kruhový fotoreaktor . . . . .	65
7.3.3	Univerzální řídicí jednotka . . . . .	66
7.4	Interakce světelného zdroje a fotosenzibilizátoru . . . . .	68
7.4.1	Závislost produkce $^1\text{O}_2$ na době osvitu . . . . .	68
7.4.2	Stanovení kvantového výtěžku . . . . .	68
7.4.3	Porovnání režimů osvitu . . . . .	69
<b>8</b>	<b>Aplikace</b>	<b>71</b>
8.1	Fotodynamická inaktivace mikroorganismů v procesních kapalinách . . . . .	72
8.1.1	Konvenční biocidní přípravky pro procesní kapaliny . . . . .	73
8.1.2	Určení mikrobiální kontaminace . . . . .	75
8.1.3	Fotoreaktor pro laboratorní testy . . . . .	76
8.1.4	Fotoreaktor pro průmyslové aplikace . . . . .	78
8.1.5	Parametry fotosenzibilizátoru pro procesní kapaliny . . . . .	86
8.2	Rozklad nečistot v odpadních vodách . . . . .	89
8.3	Fotodynamická terapie maligních nádorů . . . . .	90
8.4	Eliminace vadných bílkovin (prionový protein) . . . . .	92
8.5	Fotodynamická inaktivace mikroorganismů ve stomatologii . . . . .	93
<b>9</b>	<b>Závěr</b>	<b>95</b>
	<b>Literatura</b>	<b>98</b>
	<b>Seznam publikací autora</b>	<b>103</b>
	<b>Přílohy</b>	<b>106</b>
	<b>A Průmyslový fotoreaktor</b>	<b>107</b>
	<b>B Užité vzor</b>	<b>113</b>
	<b>C Vyjádření spolupracujících pracovišť</b>	<b>121</b>



# Seznam obrázků

1.1	Ukázka přístrojů určených k léčbě nemocí metodou fotodynamické terapie	3
1.2	Fotodynamická dezinfekce v zubním lékařství	4
2.1	Kyslík jako prvek v periodické soustavě prvků	6
2.2	Molekulový orbital dikyslíku	7
2.3	Vybrané reaktivní formy kyslíku	8
2.4	Molekulový orbital singletového kyslíku v obou elektronových uspořádáních	9
3.1	Jablonského diagram	13
3.2	Energetické hladiny molekulových orbitalů	15
3.3	Průchod světelného záření kyvetou	15
3.4	Mechanismy fotosenzibilizačních reakcí kyslíku	19
4.1	Metody detekce singletového kyslíku	24
4.2	EPR spektrometr Bruker EMX Plus	24
5.1	Chemické struktury vybraných organických barviv	26
5.2	Absorpční spektrum vybraných organických barviv	26
5.3	Základní chemická struktura porfyriu	27
5.4	Absorpční spektrum porfyriu s typickými absorpčními pásy	27
5.5	Základní chemická struktura ftalocyaninu	28
5.6	Absorpční spektrum sulfonovaného derivátu ftalocyaninu hliníku	29
6.1	Hloubka optické penetrace tkáně	31
6.2	Laserové zdroje pro PDT	32
6.3	Výbojové zdroje pro PDT	33
6.4	LED zdroje pro PDT	34
7.1	Použité přístroje	36
7.2	Spektrální charakteristika ftalocyaninu v jodidovém činidle v závislosti na počtu světelných pulzů	38
7.3	Absorpční spektra derivátů ftalocyaninů zinku a hliníku ve vodě a v jodidovém činidle	38
7.4	Absorpční spektra vybraných vzorků ftalocyaninů v jodidovém činidle před ozářením	41
7.5	Absorpční spektra vybraných vzorků ftalocyaninů v jodidovém činidle před a po ozářením	42
7.6	Teplotní závislost vzorku FTC02 ve vodě	43
7.7	Teplotní závislost vzorku FTC03 ve vodě	44
7.8	Degradace vzorku FTC02	45

7.9	Degradace vzorku FTC03 . . . . .	45
7.10	Vliv přídavku NaCl na změnu spektra vzorku FTC02 . . . . .	47
7.11	Vliv přídavku KCl na změnu spektra vzorku FTC02 . . . . .	47
7.12	Vliv přídavku EtOH na změnu spektra vzorku FTC02 . . . . .	48
7.13	Vybrané LED . . . . .	51
7.14	Měření spektrální charakteristiky LED pomocí spektrometru QE65 Pro . . . . .	52
7.15	Normalizované emisní spektrum vybraných LED . . . . .	52
7.16	Zvolená LED LZ1-00R200 . . . . .	53
7.17	Volt-ampérová charakteristika LED . . . . .	54
7.18	Uspořádání měření spektrálních charakteristik . . . . .	55
7.19	Spektrální charakteristika LED s charakteristickými vlnovými délkami . . . . .	55
7.20	Závislost zářivého toku na proudu LED . . . . .	56
7.21	Princip goniofotometru a orientace světelného zdroje v soustavě C-rovin . . . . .	57
7.22	Normalizovaná vyzařovací charakteristika diody . . . . .	58
7.23	Normalizovaná vyzařovací charakteristika diody v polárních souřadnicích . . . . .	58
7.24	Spektrální charakteristika LED pro různé teploty pouzdra . . . . .	59
7.25	Závislost relativní intenzity a posunu vlnové délky LED na teplotě pouzdra . . . . .	60
7.26	Posun prahového napětí v závislosti na teplotě pouzdra při konstantním proudu . . . . .	61
7.27	Závislost teploty pouzdra LED na integrálu překryvu spekter $R$ . . . . .	62
7.28	Laboratorní fotoreaktor GSO-1 . . . . .	64
7.29	Kruhový fotoreaktor . . . . .	65
7.30	Blokové schéma řídicí jednotky . . . . .	67
7.31	Univerzální řídicí jednotka . . . . .	67
7.32	Závislost absorpance trijodidového pásu na době osvitu vzorku FTC03 v jodidovém činidle . . . . .	68
7.33	Účinnosti generace singletového kyslíku dle použitého režimu osvitu . . . . .	69
8.1	Lopátkový tester Cult-Dip Combi s ilustračními úrovněmi kultivace . . . . .	76
8.2	Laboratorní fotoreaktor 1. generace . . . . .	76
8.3	Mikrobiální inhibice <i>Escherichia coli</i> pomocí laboratorního fotoreaktoru 1. generace . . . . .	77
8.4	Laboratorní fotoreaktor 2. generace . . . . .	78
8.5	Navržené geometrie aktivního kanálu . . . . .	79
8.6	Sít průtokové části a detail stěny . . . . .	80
8.7	Řezy meandrem . . . . .	80
8.8	Výsledky simulace proudění kapaliny v 50% řezu meandru pro průtok $15 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ . . . . .	81
8.9	Průmyslový fotoreaktor – 3D návrh . . . . .	82
8.10	Ovládací software fotoreaktoru . . . . .	83
8.11	Fotografie průmyslového fotoreaktoru . . . . .	84
8.12	Dlouhodobé testy fotodynamické inhibice mikroorganismů v řezné emulzi . . . . .	85
8.13	Schéma zapojení fotoreaktoru v nezávislém okruhu s vlastním čerpadlem . . . . .	86
8.14	Umístění průmyslového fotoreaktoru u obráběcího stroje . . . . .	86
8.15	Vliv přídavku fotosenzibilizátoru na povrch obráběných materiálů . . . . .	87
8.16	Testování stability fotosenzibilizátoru v řezné emulzi . . . . .	87
8.17	Koncentrát AIOHFTC . . . . .	88

---

8.18	Rozklad polutantu Oranž I prostřednictvím ftalocyaninových fotosenzibilizátorů v kruhovém fotoreaktoru . . . . .	89
8.19	Ukázka světelných katetrů pro PDT . . . . .	90
8.20	Světelný zdroj pro PDT . . . . .	91
8.21	Osvětové jednotky pro Prionovou laboratoř . . . . .	92
8.22	Fotodynamická antimikrobiální terapie ve stomatologii . . . . .	93
8.23	Laboratorní zařízení Stomaset . . . . .	94
8.24	Homogenita osvětlení . . . . .	94
A.1	Schéma zapojení . . . . .	108
A.2	Deska plošného spoje . . . . .	109
A.3	Rozmístění součástí . . . . .	110
A.4	Spodní díl s průtočnou částí . . . . .	111
A.5	Horní díl . . . . .	112

# Seznam tabulek

2.1	Vlastnosti singletových stavů kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$ a $O_2(^1\Sigma_g)$ . . . . .	10
3.1	Rychlostní konstanty procesů spojených s excitací molekuly . . . . .	14
5.1	Kvantové výtěžky vybraných organických barviv . . . . .	25
7.1	Testované druhy ftalocyaninových derivátů . . . . .	40
7.2	Produkce singletového kyslíku u vybraných vzorků ftalocyaninu . . . . .	42
7.3	Koeficient $D_r$ u vzorku FTC02 v závislosti na přídavcích EtOH . . . . .	48
7.4	Vybrané elektro-optické parametry LED . . . . .	51
8.1	Seznam látek povolených k ochraně rezných kapalin před mikrobiální kontaminací . . . . .	73
8.2	Simulace proudění – vypočtené hodnoty . . . . .	80
8.3	Navržené komunikační příkazy . . . . .	83

# Seznam symbolů a zkratek

$\alpha, \beta$ .....	Elektron s daným spinem.
$\eta$ .....	Účinnost (%).
$\lambda$ .....	Vlnová délka světelného záření ( $m$ ).
$\nu$ .....	Frekvence světelného záření ( $Hz$ ).
$\Phi$ .....	Kvantový výtěžek.
$\Phi_e$ .....	Zářivý tok ( $W$ ).
$\Phi_{\Delta}$ .....	Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku.
$\Phi_T$ .....	Kvantový výtěžek tripletových stavů.
$\pi, \sigma$ .....	Vazebný orbital.
$\pi^*, \sigma^*$ .....	Antivazebný orbital.
$\tau$ .....	Doba života daného energetického stavu ( $s$ ).
$\Theta$ .....	Vyzařovací úhel ( $^{\circ}$ ).
$\varepsilon$ .....	Molární absorpční koeficient ( $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ ).
$A$ .....	Absorbance.
$ABS_{PS}$ .....	Absorpce fotosenzibilizátoru.
$c$ .....	Koncentrace vzorku ( $mol.l^{-1}$ ).
$c$ .....	Rychlost světla ve vakuu ( $299\,792\,458\,m.s^{-1}$ ).
$d$ .....	Tloušťka vzorku ( $m$ ).
$E$ .....	Energie záření ( $J$ ).
$e$ .....	Elementární náboj ( $1,6021766208.10^{-19}\,C$ ).
$E_g$ .....	Šířka zakázaného pásu ( $eV$ ).
$E_{LED}$ .....	Emise LED.
$h$ .....	Planckova konstanta ( $6,626068.10^{-34}\,J.s$ ).
$I$ .....	Elektrický proud ( $A$ ).

$I$ .....	Intenzita prošlého záření ze vzorku ( $W.m^{-2}$ ).
$k$ .....	Rychlostní konstanta ( $s^{-1}$ ).
$n_{\alpha}, n_{\beta}$ .....	Počet elektronů s daným spinem.
$P$ .....	Výkon ( $W$ ).
$R$ .....	Integrál překryvu absorpčního a emisního spektra.
$S$ .....	Celkový spin soustavy.
$S_{\Delta}$ .....	Podíl tripletových stavů fotosenzibilizátoru zhaseného kyslíkem a poskytující $^1O_2$ .
$S_q$ .....	Podíl tripletových stavů fotosenzibilizátoru, které interagují s kyslíkem.
$T$ .....	Teplota ( $^{\circ}C, ^{\circ}K$ ).
$T$ .....	Transmitance.
$U$ .....	Elektrické napětí ( $V$ ).
5-ALA .....	5-aminolevulová kyselina.
CFU, KTJ ....	Colony Formy Unit. Kolonie tvořící jednotka.
CJD .....	Creutzfeldt-Jakobova nemoc.
CT .....	Charge Transfer. Přenos náboje.
CW .....	Continuos Wave. Kontinuální osvit.
DC .....	Direct Current. Stejnoseměrný proud.
DNA .....	Deoxyribonukleová kyselina.
EPR .....	Electron Paramagnetic Resonance. Elektronová paramagnetická rezonance.
FEM .....	Finite Elements Method. Metoda konečných prvků.
HPD .....	Hematoporphyrin Derivative. Deriváty hematoporphyrinu.
IIC .....	Inter-Integrated Circuit. Sériová sběrnice.
IMS .....	Insulated Metal Substrate. Hliníkový substrát.
IR .....	Infrared. Infračervená oblast světelného spektra.
LED .....	Light-Emitting Diode. Elektroluminiscenční dioda.
LIOAS .....	Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy. Fotoakustická kalorimetrie.
PACT .....	Photodynamic antimicrobial chemotherapy. Fotodynamická antimikrobiální chemoterapie.

---

PDT	Photodynamic Therapy. Fotodynamická terapie.
PID	Regulátor složený z proporcionální, integrační a derivační části.
PrP	Proteinaceous Infectious Particles. Prionový protein.
PWM	Pulse Width Modulation. Pulzně šířková modulace.
ROS	Reactive Oxygen Species. Reaktivní formy kyslíku.
SOD	Superoxid Dismutase. Superoxid dismutáza.
SST	Shear Stress Transport. Turbulentní model.
TRNIR	Time-Resolved Near Infrared. Přímá metoda detekce $^1\text{O}_2$ v IR oblasti.
TRTL	Time-Resolved Thermal Lensing. Fototermální technika detekce $^1\text{O}_2$ .
TSE	Transmisivní Spongiformní Encefalopatie.
TTA	Triplet-triplet Annihilation. Triplet-tripletová anihilace.
UART	Universal Asynchronous Receiver Transmitter. Sériová sběrnice.
UV	Ultraviolet. Ultrafialová oblast světelného spektra.
VIS	Visible. Viditelná oblast světelného spektra.

# 1 Úvod

Existence částic v elektronově excitovaném stavu, vysoce reaktivních forem podílejících se na fyziologických i patologických dějích v organismu, je známa již více než 100 let, ale skutečný zájem o studium těchto reaktivních molekul vzbudil až předpoklad jejich destruktivních účinků na biomolekuly. Tyto částice mohou vznikat řadou chemických, fotochemických, fyzikálních nebo biologických reakcí. V současné době mají mimořádný význam tzv. fotosenzibilizační reakce. Princip je založen na ozáření fotodynamicky aktivní látky (fotosenzibilizátoru), která v excitovaném stavu přenáší absorbovanou energii na jinou molekulu za vzniku vysoce reaktivních částic. Tento jev je nazýván jako fotodynamický efekt. Mezi nejstudovanější vysoce reaktivní částice patří tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS – z angl. Reactive Oxygen Species) – singletový kyslík, superoxidový anion radikál a další formy. Singletový kyslík (označovaný jako  $^1\text{O}_2$ ), energeticky bohatší forma molekulárního kyslíku, hraje významnou roli v mnoha chemických a biologicky relevantních procesech, neboť velmi snadno reaguje s okolními molekulami a způsobuje tak jejich oxidativní destrukci. [1]

Za nejvýznamnější oblasti využívající fotodynamický efekt lze považovat aplikace v lékařství, kde tzv. fotodynamická terapie dokáže selektivní neinvazivní formou nahradit chemoterapii v léčbě některých typů nádorových onemocnění a antibiotické přípravky používané při léčbě zánětlivých onemocnění. Fotodynamický efekt lze využít dále také pro dezinfekci krve a krevních derivátů. Velkým tématem v průmyslové oblasti je úprava a čištění kapalin, kde množící se mikroorganismy představují velké riziko pro tyto systémy a jejich obsluhu. Jedná se především o chladicí okruhy v elektrárnách, odpadní vody nebo o uzavřené okruhy procesních kapalin. Také v oblasti konvenčních pesticidů je snaha nahradit tyto látky, které často kontaminují povrchové vody a půdu, netoxickými fotodynamickými pesticidy. Velmi lákavou perspektivou jsou materiály s fotodezinfekčními vlastnostmi, které by mohly být přímou součástí fólií nebo nátěrových hmot. [1, 2]

## 1.1 Současný stav problematiky

Fotodynamické reakce generující reaktivní formy kyslíku byly poprvé systematicky studovány na začátku 20. století. Mezi zkoumané fotodynamicky aktivní látky patří z oblasti organické chemie zejména organická barviva, aromatické a heterocyklické sloučeniny a barevné kovové komplexy. K nejznámějším organickým fotosenzibilizátorům lze zařadit: eosin, methylenovou modř, chlorofyl, riboflavin, 5-aminolevulová kyselina, porfyriny, ftalocyaniny a další. K nejdůležitějším vlastnostem fotosenzibilizátorů patří jejich vhodná absorpce, fotostabilita vůči samovolné fotodegradaci, nízká toxicita a vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku. [1, 3, 4]

Pro aktivaci fotosenzibilizátoru je potřeba jeho excitace světlem o vhodné vlnové délce – maximum vyzařovaného spektra světla musí v ideálním případě odpovídat maximu ab-



sorpčního spektra dané fotodynamicky aktivní látky. Pro fotomedicínské aplikace musí vyzařované spektrum světelného zdroje odpovídat tzv. *terapeutickému oknu*, které je charakterizováno intervalem vlnové délky 600 nm až 1070 nm a představuje nejefektivnější penetraci tkáně. S použitím katetrů a optických vláken lze ozařovat postižená místa i uvnitř těla. V oblasti < 600 nm dochází k nežádoucí absorpci energie hemoglobinem a v oblasti > 1000 nm světelné záření absorbuje z větší části voda ve tkáni. [5]

Prvními zdroji záření byly širokospektrální zdroje, halogenové žárovky a výbojky, které nalézají díky velkému plošnému osvitu uplatnění především v dermatologii. K nevýhodám těchto zdrojů záření patří velké ztrátové teplo, značná velikost a obtížná regulace expozičních dávek. Druhým typem světelných zdrojů jsou lasery produkující monochromatické světlo s velmi úzkým vyzařovacím spektrem a velkou energií. Vyzařovaný paprsek lze efektivně navázat do optických vlnodů pro snadné zavedení *in vivo*. Nevýhodami jsou vysoká cena a vysoké nároky na bezpečnost při manipulaci. V současné době je snaha nahradit výše zmíněné typy světelných zdrojů elektroluminiscenčními diodami, které využívají výhod jak širokospektrálních zdrojů, tak i laserů. Elektroluminiscenční diody dokáží emitovat světelné záření dle použitého materiálu od ultrafialové oblasti až po oblast infračervenou. Vynikají dlouhou životností, malým zahříváním, nízkou energetickou náročností, schopností osvitu velkých ploch a přenositelností. Jednotlivé diody lze efektivně kombinovat a vytvořit tak diodové pole, které dokáže najednou excitovat více typů fotosenzibilizátorů. [6, 7, 8]

## 1.2 Aplikace

### a) Fotodynamická terapie

Princip fotodynamické terapie byl poprvé aplikován v roce 1913 německým lékařem Friedrichem Mayer-Betzem, který provedl u člověka první studii s porfyriny. Betz tuto metodu nazval *fotoradiační terapie*. Na jeho práci navázal v osmdesátých letech John Toth, který ve svém článku potvrdil fotodynamický efekt léčby s tehdejší argonovým laserem a pojmenoval ho *fotodynamická terapie* (PDT – z angl. *Photodynamic Therapy*). PDT je v současné době vedle chirurgie, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie další možností léčby nádorových onemocnění. Jedná se o neinvazivní fotochemoterapii představující kombinované použití fotosenzibilizátoru a světla za přítomnosti molekulárního kyslíku. [2, 6, 9]

Princip metody spočívá v zavedení fotosenzibilizátoru do krevního řečiště, kde se postupně akumuluje v neoplastických tkáních. Tumorová tkáň s akumulovaným fotosenzibilizátorem je vystavena světelnému záření o vlnové délce 600–900 nm, které prochází tkání do větší hloubky a excituje fotosenzibilizátor. U vnitřních nádorů je zapotřebí vést světelný paprsek k tumoru optickým vláknem – speciální katetry (obr. 1.1(a)). Reaktivní formy kyslíku způsobují oxidaci membránových lipidů a proteinů, což se projevuje cytólýzou<sup>1</sup> a destrukcí rakovinných buněk. Fotosenzibilizátor se po předání energie vrací do původního (základního) stavu. Děj se tedy může opakovat, ale pouze v případě, že je přítomen kyslík a trvá světelná excitace. Jelikož je zasažena pouze část tumoru, kde je akumulován fotosenzibilizátor, lze fotodynamickou terapii považovat za selektivní metodu tumorové léčby. [2, 9]

Nejčastějšími užívanými fotosenzibilizátory pro PDT jsou deriváty hematoporfyrinu (HPD). Prvním oficiálně schváleným byl Photofrin<sup>®</sup>, ale v současné době se již použí-

<sup>1</sup>Rozpad buňky – porušení integrity buněčné membrány.

vají fotosenzibilizátory druhé generace, které vykazují vyšší retenci v tumorové tkáni a absorpci světla o delších vlnových délkách, než je tomu u HPD. [9]



(a) Prototyp katetru společnosti Light Sciences (b) Náplast Ambulight určená k použití v der-  
Oncology. |Zdroj: <http://www.carbondesign.com>| matologii. |Zdroj: <http://www.ambicarehealth.com>|

**Obr. 1.1:** Ukázka přístrojů určených k léčbě nemocí metodou fotodynamické terapie.

Metodu PDT lze nalézt nejen v léčbě rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, žaludku, střev, jater, ale používá se také v léčbě dermatologických problémů (zde se fotosenzibilizátor aplikuje na postižené místo ve formě masti nebo gelu), jako jsou kožní melanomy, ekzémy, akné či lupenka. [9]

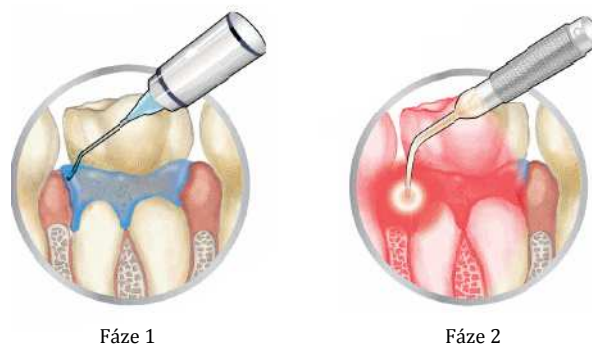
## b) Fotodynamická dezinfekce

Při pohledu na současné bakteriální kmeny, které jsou stále více resistantní k antibiotikům, je velmi důležitý výzkum sloučenin působící odlišným mechanismem. Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (PACT – z angl. *Photodynamic antimicrobial chemotherapy*) pracuje na stejném principu jako PDT. Vlastnost fotosenzibilizátorů způsobující fotoinaktivaci<sup>2</sup> se označuje jako fototoxická či fotocytotoxická. Celkový fototoxický efekt je většinou způsoben  $^1\text{O}_2$ , ale mohou k němu přispívat superoxidový anion radikál  $\text{O}_2^-$ , hydroxylové radikály  $\text{OH}^\cdot$ , případně další radikály fotosenzibilizátoru. [9]

Pro účely fotodynamické dezinfekce se používají fenothiazinová barviva (methylenová modř), xanthenová barviva (bengálská červeň) a aminoakridinová barviva. První dvě jmenovaná barviva disponují nejen vlastností fotosenzibilizátoru se širokým spektrem antimikrobiální a antivirové aktivity, ale také je lze zařadit mezi konvenční dezinfekční činidla. Výsledný antimikrobiální efekt závisí jak na povaze fotosenzibilizátoru, tak na druhu mikroorganismu. [9] Velmi zajímavou aplikací spojenou s produkcí  $^1\text{O}_2$  se jeví také oblast dezinfekce krve a krevních derivátů pro transfuze. Dezinfekční proces v oblasti transfuze musí s ohledem na nebezpečí infekce splňovat náročné standardy. Na jedné straně je nutné cíleně zasáhnout nebezpečné typy patogenů (viry, bakterie, kvasinky) a na straně druhé nepoškodit důležité krevní komponenty (jako jsou např. červené krvinky). Krevní plazma a červené krvinky neobsahují nukleonové kyseliny na rozdíl od bílých krvinek a infikujících organismů. Toho se využívá v případě fotodynamické metody se selektivně působícími kationtovými fotosenzibilizátory (ftalocyaniny Si nebo Zn a fenothiazinová barviva), které se interkalují do DNA mezi páry bází. [4, 9]

<sup>2</sup>Účinná destrukce mikroorganismů.

Fotodynamická dezinfekce nalézá v poslední době uplatnění také v zubním lékařství, kde se používá např. pro léčbu zánětu dásní.



**Obr. 1.2:** Fotodynamická dezinfekce v zubním lékařství. Fáze 1 – aplikace fotosenzibilizátoru, který se následně naváže na bakterie. Fáze 2 – ozáření diodovým laserem, vzniklá chemická reakce po 60 vteřinách ničí bakterie.) [Převzato s úpravami z: Periowave™, <http://www.periowave.com>]

### c) Úprava a čištění kapalin

V současné době je velkým tématem nejen úprava a čištění odpadních vod, které obsahují velké množství mikroorganismů a mohou být současně chemicky znečištěny organickými polutanty, ale také vhodná dezinfekce chladicích řezných kapalin používaných při obrábění kovů. Tyto emulze většinou cirkulují v uzavřeném koloběhu a dávají tak prostor pro vznik a množení různých druhů mikroorganismů. Chladicí okruhy v jaderných a tepelných elektrárnách obsahují také řadu nežádoucích mikroorganismů ve formě zelených řas či sinic, které rostou v těchto systémech. Současné biocidní přípravky mohou obsahovat aditiva, která vykazují nežádoucí stimulační účinky na mikroorganismy a podporují tak jejich růst. Z těchto důvodů je snaha nahradit současné biocidní preparáty vhodnějšími substancemi. [9, 10]

Aplikace singletového kyslíku v této oblasti umožňuje oxidativní destrukci mikrobiálních látek a tedy zastavení šíření infekcí. Stejně tak  $^1\text{O}_2$  způsobuje oxidativní degradaci přítomných barviv nebo fenolických látek. Nejvhodnějšími fotosenzibilizátory se ukázaly být kationtové porfyryny nebo ftalocyaniny. Pro větší množství upravované vody jsou z důvodu snadnější regenerace výhodnější imobilizované fotosenzibilizátory na tuhém substrátu (nosiči). [9]

## 1.3 Cíle disertační práce

Téma disertační práce vzniklo na základě úzké spolupráce s výzkumným týmem Centra organické chemie (COC) v Rybitví, který se dlouhodobě zabývá syntézou fotodynamicky aktivních látek a studiem jejich vlastností. Pro zkoumání a optimalizaci parametrů těchto látek z pohledu fotosenzibilizačních reakcí je mezioborová kooperace ZČU a COC nezbytným předpokladem. Díky této spolupráci je možné efektivně řešit návrh a optimalizaci světelných zdrojů na bázi elektroluminiscenčních diod pro nově syntetizované typy fotosenzibilizátorů a naopak. Z výše zmíněného současného stavu problematiky fotodynamického efektu a jeho využití v potenciálních aplikacích byly stanoveny cíle této disertační práce:

**1) Charakterizace a výběr organického materiálu schopného generovat reaktivní formy kyslíku.**

Organický materiál pro potřeby efektivní generace singletového kyslíku musí vykazovat několik důležitých parametrů: (a) efektivní absorpce světla v rozsahu požadovaných vlnových délek; (b) značná teplotní stabilita; (c) odolnost vůči fotodegradaci; (d) vysoký kvantový výtěžek; (e) chemická čistota a (f) nízká toxicita. Smyslem tohoto cíle je nalezení a podrobná charakterizace vhodného organického materiálu splňujícího výše zmíněné parametry.

**2) Návrh vhodného světelného LED zdroje a optimalizace režimu fotoiniciace.**

Emisní spektrum světelného LED zdroje musí co nejefektivněji využívat absorpční maximum zvoleného organického fotosenzibilizátoru. Dalšími důležitými parametry jsou vysoký zářivý tok a vysoká účinnost přeměny energie. Pro splnění cíle je nutné vhodně zvolit a podrobně charakterizovat světelný LED zdroj, což zahrnuje stanovení elektrických a radiometrických parametrů včetně jejich teplotních závislostí. S tím souvisí i návrh a optimalizace vhodného režimu světelné iniciace fotosenzibilizátoru.

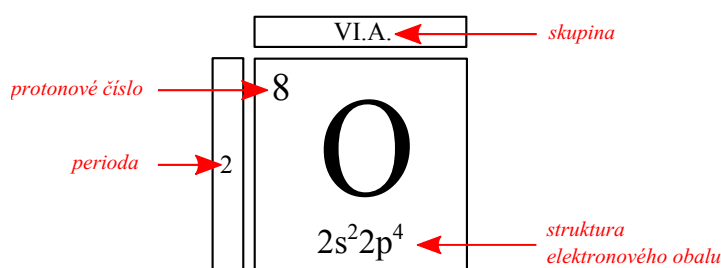
**3) Realizace a zhodnocení osvitových jednotek pro vybrané aplikace.**

Pro prvotní ověření schopnosti zvoleného organického fotosenzibilizátoru a světelného LED zdroje generovat reaktivní formy kyslíku bude nutné nejprve navrhnout a zkonstruovat laboratorní osvitové jednotky (fotoreaktory), které by měly disponovat konstrukční variabilitou a univerzálností. V případě prokázání efektivní generace reaktivních forem kyslíku by získané zkušenosti a navržené postupy umožnily realizaci osvitových jednotek pro potřeby vybraných aplikačních oblastí.

## 2 Kyslík a jeho reaktivní formy

Kyslík je bezbarvý plyn bez chuti a zápachu, který ve zkapalněném stavu má namodralou barvu. Jedná se o druhý nejrozšířenější prvek na Zemi, vzniká v atmosféře (20,95 %) v průběhu fotosyntézy kyanobakteriemi a rostlinami. [11]

Kyslík představuje tzv. *biogenní prvek*<sup>1</sup> a jeho přítomnost je nezbytná pro existenci většiny živých organismů na této planetě. Kyslík se nejčastěji vyrábí frakční destilací zkapalněného vzduchu a uchovává se ve speciálních nádobách z důvodu jeho vysoké reaktivity.



**Obr. 2.1:** Kyslík jako prvek v periodické soustavě prvků.

Atom kyslíku obsahuje 6 valenčních elektronů (skupina VI.A.) s elektronovou konfigurací  $1s^22s^22p^4$ . Tyto atomy jsou nestálé a slučují se s dalšími atomy kyslíku dvojnou vazbou na molekuly. Jedná se o tzv. molekulární kyslík, který je někdy označován jako dikyslík. Molekula kyslíku  $O_2$ , která představuje nejjednodušší formu výskytu kyslíku, má v nejvyšším antivazebném orbitalu dva nepárové elektrony (biradikál) s paralelními spiny (multiplicita spinu = 3, jedná se o tzv. *tripletový stav*). Tyto elektrony, v souladu s Hundovým pravidlem<sup>2</sup>, obsazují po jednom antivazebné orbitály  $\pi$  (tato konfigurace má za následek paramagnetismus dikyslíku).

Při popisu elektronové struktury se elektronům přiřazují dvě odlišné hodnoty spinu,  $+\frac{1}{2}$  a  $-\frac{1}{2}$ . Takto můžeme rozdělit elektrony podle spinu na elektrony  $\alpha$  a  $\beta$ . Celkový spin soustavy ( $S$ ) je poté definován jako:

$$S = \frac{1}{2}(n_\alpha - n_\beta) \quad (2.1)$$

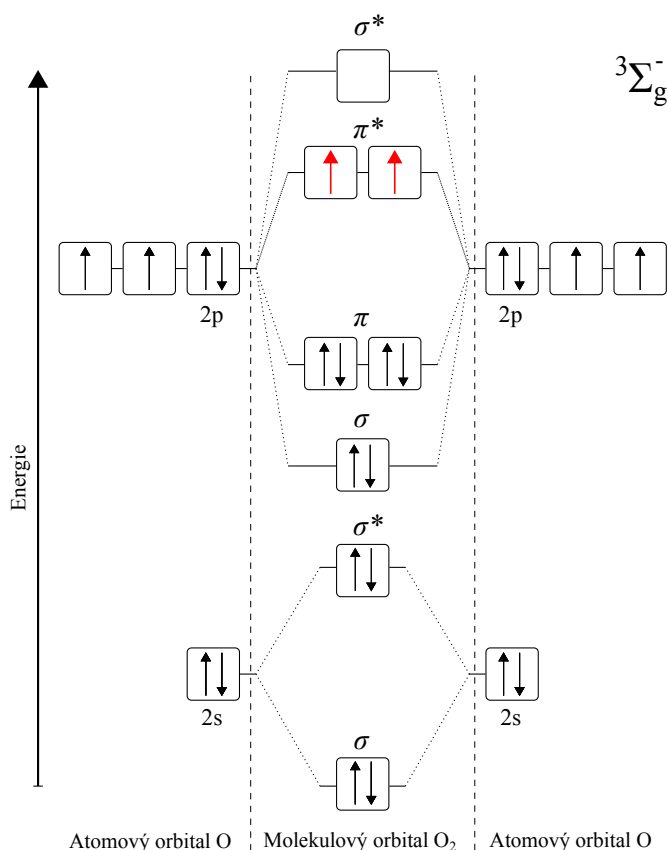
Kde  $n_x$  představuje počet elektronů s daným spinem. Multiplicitu spinu lze poté již snadno vyjádřit jako:

$$2S + 1 \quad (2.2)$$

Podle hodnoty multiplicity spinu nazýváme stav, ve kterém se atom či molekula nachází, jako singletový (1), dubletový (2), tripletový (3), kvartetový (4) atd.

<sup>1</sup>Biogenní = „životatvorný“ prvek.

<sup>2</sup>Orbitaly se stejnou energií (degenerované) se obsazují nejprve všechny po jednom elektronu se stejným spinem, a teprve pak druhým elektronem s opačným spinovým číslem.



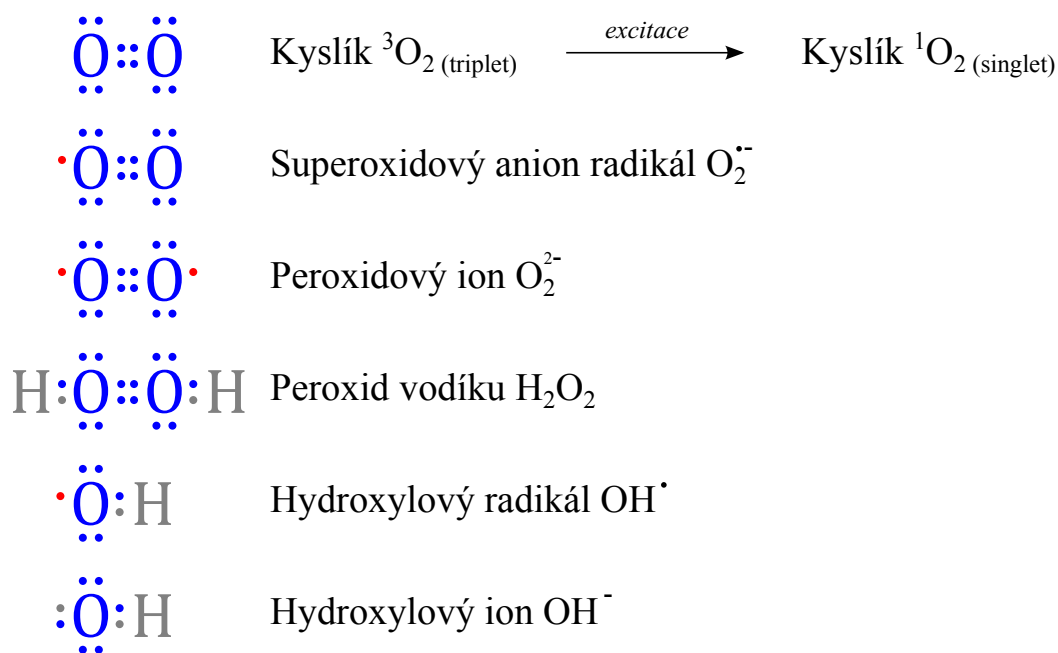
**Obr. 2.2:** Molekulový orbital dikyslíku.

Z diagramu molekulového orbitalu (obr. 2.2) je zřejmé, že s ohledem na způsob obsazení antivazebných orbitalů existují ještě dva excitované stavy kyslíku ( ${}^1\Delta_g$  a  ${}^1\Sigma_g$ ).

Na tomto místě je nutné zdůraznit, že elektronová konfigurace atmosférického kyslíku v základním stavu je odlišná od ostatních organických a biologických molekul mající všechny elektrony spárovány (jsou tedy v singletovém stavu). Proto veškeré reakce kyslíku v základním tripletovém stavu s ostatními molekulami v základním singletovém stavu jsou vysoce energeticky náročné (mají vysokou aktivační energii) a probíhají pouze tehdy, podaří-li se překonat tzv. *spinový zákaz*. V případě neexistence tohoto pravidla by všechna organická hmota zoxidovala v přítomnosti vzdušného kyslíku na oxid uhličitý a vodu. Termodynamicky jsou ale tyto reakce možné a jsou silně exotermní. [1, 12, 13]

## Vybrané reaktivní formy kyslíku

Běžnou součástí života v aerobních podmínkách jsou tzv. *reaktivní formy kyslíku*, které jsou zkráceně nazývány ROS (Reactive Oxygen Species). Tyto formy představují částečně redukované nebo oxidované sloučeniny odvozené od molekulárního kyslíku, které vznikají ve všech typech organismů, kde mají značný patogenický a fyziologický význam. Jak název napovídá, ROS vykazují značnou reaktivitu ve srovnání s molekulárním kyslíkem, a proto velmi pohotově reagují s mastnými kyselinami, lipidy, aminokyselinami, proteiny a nukleonovými kyselinami. Představují také faktory imunitní ochrany a jsou významnými prostředníky pro přenos energie. Na druhou stranu ale za určitých okolností působí jako toxické látky a mohou organismus poškodit či dokonce usmrtit. Reaktivní formy kyslíku lze odvodit od meziproductů redukce kyslíku na vodu (obr. 2.3). [14, 15, 16]



**Obr. 2.3:** Vybrané reaktivní formy kyslíku.

Reaktivní formy kyslíku mohou být částice dvojího typu. Jedny představují tzv. *volné radikály*,<sup>3</sup> ke kterým lze zařadit superoxidový anion radikál ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) a hydroxylový radikál ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Vlivem elektronového deficitu se tyto částice snaží přijmout další elektron a doplnit si pár do stabilní konfigurace, což je důvodem jejich velké reaktivity a krátké doby života. Další přeměnou volných radikálů mohou vznikat jiné reaktivní látky (druhý typ ROS), které již nevykazují radikálový charakter. Jsou to singletový kyslík ( ${}^1\text{O}_2$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ale také ozon ( $\text{O}_3$ ). [14]

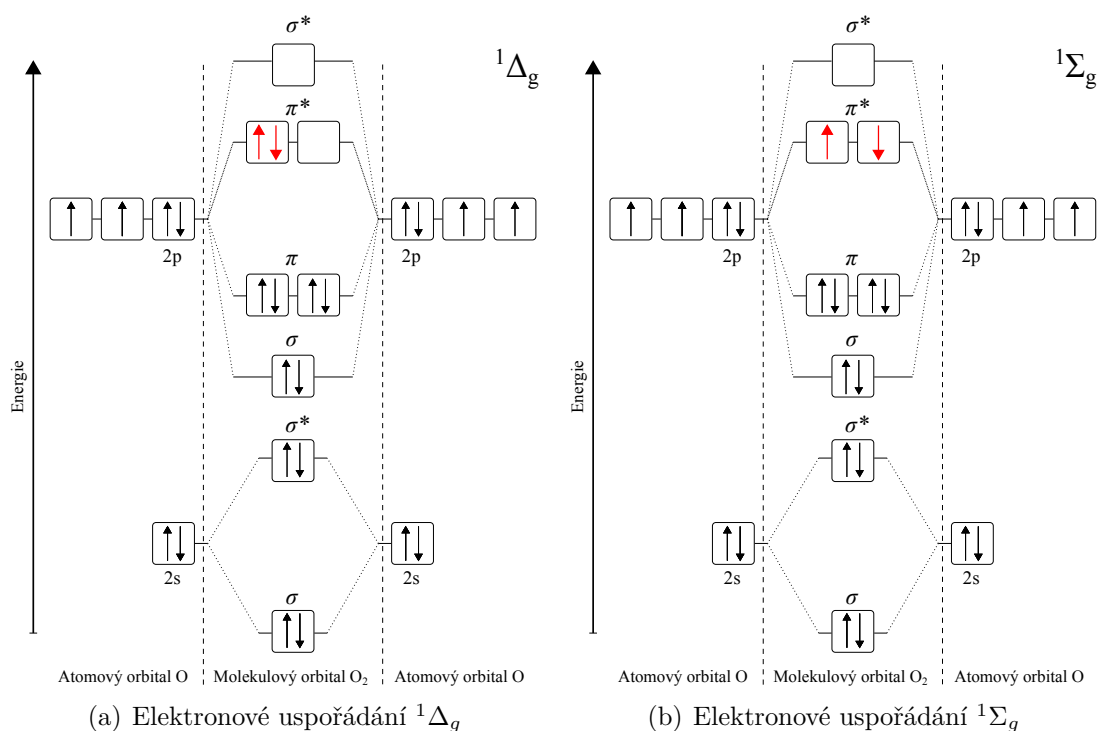
<sup>3</sup>Molekula, atom nebo ion schopný samostatné existence, který obsahuje alespoň jeden nepárový elektron.

## Singletový kyslík $^1\text{O}_2$

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, požadavky na zachování multiplicity spinu jsou příčinou relativně malé reaktivity molekulárního kyslíku v základním tripletovém stavu ( $^3\text{O}_2$ ). Po absorpci dostatečně velké energie je možné spin jednoho z nepárových elektronů otočit a molekula kyslíku přejde do své energeticky bohatší konfigurace – hovoříme o singletovém kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ).

Singletový kyslík  $^1\text{O}_2$  je ve srovnání s molekulárním kyslíkem v základním stavu velmi reaktivní a v dnešní době patří mezi nejstudovanější formy ROS. Podstatou vysoké reaktivity  $^1\text{O}_2$  je fakt, že reakce singletového kyslíku s většinou chemických látek jsou spinově dovolené. Z názvu „singletový“ lze odvodit, že multiplicita spinu se rovná 1, z čehož vyplývá, že v tomto stavu má kyslík všechny elektrony spárovány. V základním stavu je kyslík látka paramagnetická, ale v excitovaném singletovém stavu po spárování valenčních elektronů vykazuje tato forma kyslíku diamagnetický charakter. [1, 11]

Excitovaný singletový stav kyslíku může existovat ve dvojím elektronovém uspořádání lišící se od sebe excitační energií:  $E(^1\Delta_g) = 94,1 \text{ kJ/mol}$  a  $E(^1\Sigma_g) = 158 \text{ kJ/mol}$ , která odpovídá míře absorpce energie potřebné k obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů. [1, 13]



**Obr. 2.4:** Molekulový orbital singletového kyslíku v obou elektronových uspořádáních.

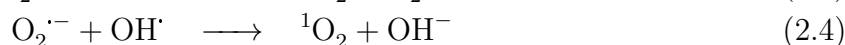
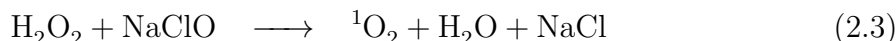
Ve většině literatury je pod pojmem singletový kyslík označována forma  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ . V poslední době ovšem znatelně vzrostl zájem o generaci a reakce energeticky bohatší, ale méně stabilní formy  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$  jak v roztoku, tak i v plynné fázi. [1]

Doba života singletového kyslíku ( $^1\Delta_g$ ) je značně závislá na rozpouštědle a může nabývat hodnot  $4 \mu\text{s}$  ve vodném prostředí až  $100 \text{ ms}$  v některých slabě interagujících halogenovaných uhlovodících (viz tab. 2.1). Díky omezené době života  $^1\text{O}_2$  je oblast působení v živých organismech omezena na relativně malé vzdálenosti ( $10$  až  $400 \text{ nm}$ ). [1, 12, 13]



**Tab. 2.1:** Vlastnosti singletových stavů kyslíku  $O_2(^1\Delta_g)$  a  $O_2(^1\Sigma_g)$ . [Zdroj: [1]]

Parametr	$O_2(^1\Delta_g)$	$O_2(^1\Sigma_g)$	
Energie [kJ.mol <sup>-1</sup> ]	94,1	156,9	
Typ přechodu	$O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g)$	$O_2(^1\Sigma_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g)$	$O_2(^1\Sigma_g) \rightarrow O_2(^1\Delta_g)$
Vlnová délka [nm]	1269–1282	765	1914–1936
<i>Radiační doba života</i>			
Plyn	64,6 min	11,8 s	6,7 min
Roztok	0,25–10 s	1 s	0,33–1,4 ms
<i>Doba života v rozpouštědle</i>			
H <sub>2</sub> O	3,8 $\mu$ s	8,2 ps	
D <sub>2</sub> O	62 $\mu$ s	42 ps	
CH <sub>3</sub> OH	10 $\mu$ s	8,2 ps	
CD <sub>3</sub> OD	240 $\mu$ s	94 ps	
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	50 $\mu$ s	123 ps	
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	723 $\mu$ s	294 ps	
CHCl <sub>3</sub>	264 $\mu$ s	1,18 ns	
CDCl <sub>3</sub>	740 $\mu$ s	2,22 ns	
CCl <sub>4</sub>	28 ms	105–132 ns	



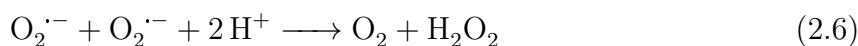
Singletový kyslík může vznikat řadou chemických, fotochemických, fyzikálních nebo biologických reakcí. Příkladem vzniku  ${}^1O_2$  fyzikálním procesem je např. mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je klasická reakce chlornanu s peroxidem vodíku (2.3), superoxidového anion radikálu s hydroxylovým radikálem (2.4), peroxonitritu s peroxidem vodíku (2.5), dále tepelný rozklad endoperoxidů a také reakce ozonu či ozonidů s různými látkami. V biologických systémech produkují singletový kyslík některé enzymy (např. peroxidázy<sup>4</sup>). K přímým fotochemickým reakcím patří fotolýza ozonu nebo fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula. V současné době mají mimořádný význam tzv. *fotosenzibilizační reakce*<sup>5</sup>, které jsou důkladněji vysvětleny v kapitole 3.2. [1, 9, 14]

<sup>4</sup>Enzymy, které pomocí peroxidu vodíku oxidují různé substráty v podobě:  
 redukovaný substrát + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  oxidovaný substrát + 2H<sub>2</sub>O

<sup>5</sup>Světlem iniciované reakce sloučenin obsahující chromofory, po jejichž excitaci se přenáší absorbovaná energie na kyslík za vzniku  ${}^1O_2$ .

## Superoxidový anion radikál $O_2^{\cdot-}$

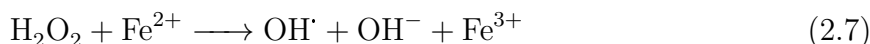
Superoxid má jeden nepárový elektron a je vytvářen redukcí kyslíku.  $O_2^{\cdot-}$  není příliš reaktivní a v živých organismech podléhá dismutaci<sup>6</sup> (SOD – Superoxid Dismutaze). SOD představuje důležitý antioxidant, který účinně zhasí superoxidový radikál a přeměňuje ho na méně toxický peroxid vodíku (2.6). Při neutrálním pH se superoxidový anion radikál chová jako slabý primární oxidant. Tento radikál není schopen difundovat skrz biologické membrány, ale dokáže omezit transport elektronů v enzymech dýchacího řetězce. [10, 14]



## Peroxid vodíku $H_2O_2$

Peroxid vodíku není sice radikálem, neboť jeho reakce s biomolekulami jsou poměrně pomalé, ale velmi těsně se účastní tvorby volných radikálů. Má schopnost difundovat do relativně velké vzdálenosti a vázat se s přítomnými bílkoviny. [10, 14]

V přítomnosti tranzitních kovů se peroxid vodíku pohotově redukuje:



Rovnice (2.7) je známá pod názvem *Fentonova reakce*.

## Hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$

Hydroxylový radikál je vysoce toxický a extrémně reaktivní. Volná částice  $OH^{\cdot}$  je nejjedovatější známou látkou. Ve tkáni se okamžitě slučuje s jakoukoliv molekulou, nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji. Cytotoxický účinek  $OH^{\cdot}$  spočívá v jeho schopnosti odtrhnout vodík z biomolekul nebo v jeho adici<sup>7</sup> na dvojné vazby.  $OH^{\cdot}$  vzniká dismutací se superoxidem nebo Fentonovou reakcí. [10, 13, 14, 15]

<sup>6</sup>Reakce, ve které látka současně redukuje a oxiduje – tvoří dva různé produkty. Jiný název pro dismutaci je disproportionace.

<sup>7</sup>Reakce, při které dochází k zániku vícenásobných vazeb na vazby jednodušší (např. z jedné dvojné vazby vznikají dvě jednoduché).

## 3 Fotoexcitace a excitované stavy

Dle fyzikální definice představuje světlo formu energie, která je jak vlnového, tak částicového charakteru. Ve vakuu se šíří rychlostí přibližně  $c = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ . Barvu světelného záření charakterizuje jeho vlnová délka  $\lambda$  nebo frekvence  $\nu$ . Vztah mezi těmito veličinami vyjadřuje rovnice (3.1). Max Planck v souvislosti s *kvantovou teorií* zavádí pojem *světelné kvantum*  $h\nu$ , kde  $h$  je Planckova konstanta.

$$c = \lambda\nu \quad (3.1)$$

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.2)$$

Částice mohou existovat pouze v určitých diskrétních energetických stavech – energetických hladinách. *Excitace* (vybuzení) představuje fyzikální proces, při kterém dochází k přechodu energetického stavu atomu či molekuly na vyšší energetickou hladinu. Přejít mezi těmito hladinami tedy musí být spojen se ziskem nebo ztrátou určitého množství energie  $E$ . V případě, že k přechodu mezi energetickými hladinami došlo absorpcí fotonu, hovoříme o *fotoexcitaci*.

Při *absorpci*<sup>1</sup> energie fotonu molekulou může dojít ke třem typům fotoexcitace: rotační, vibrační a elektronové. Vše souvisí s vlnovou délkou absorbovaného záření. V případě absorpce nízkoenergetické infračervené záření (IR) dochází k rotační nebo vibrační excitaci, zatímco ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) záření způsobuje excitaci elektronovou. [17, 18]

V okamžiku excitace jsou vlivem velké rychlosti absorpčního procesu ( $10^{-15} \text{ s}$ ) rekonfigurovány pouze elektrony, zatímco těžší nukleony zůstávají v geometrii základního stavu (*Franckův-Condonův princip*). Po absorpci světla organickou molekulou v základním stavu ( $S_0$ ) přeskočí elektron z nízko položeného orbitalu do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Nyní může dojít k vytvoření jednoho ze dvou elektronově odlišných excitovaných stavů: (a) *singletový stav* ( $S_1$ ) s antiparalelními spiny obou elektronů nebo (b) *tripletový stav* ( $T_1$ ) s paralelními spiny obou elektronů. Díky kvantově-mechanickým pravidlům, které vyžadují zachování spinu v průběhu excitačního procesu, neprobíhá otočení spinu elektronů okamžitě. Vznik singletového stavu je tedy pravděpodobnější. [17, 18]

Fotochemické procesy organických molekul se nejčastěji ilustrují prostřednictvím tzv. *Jablonského diagramu* (obr. 3.1). [18]

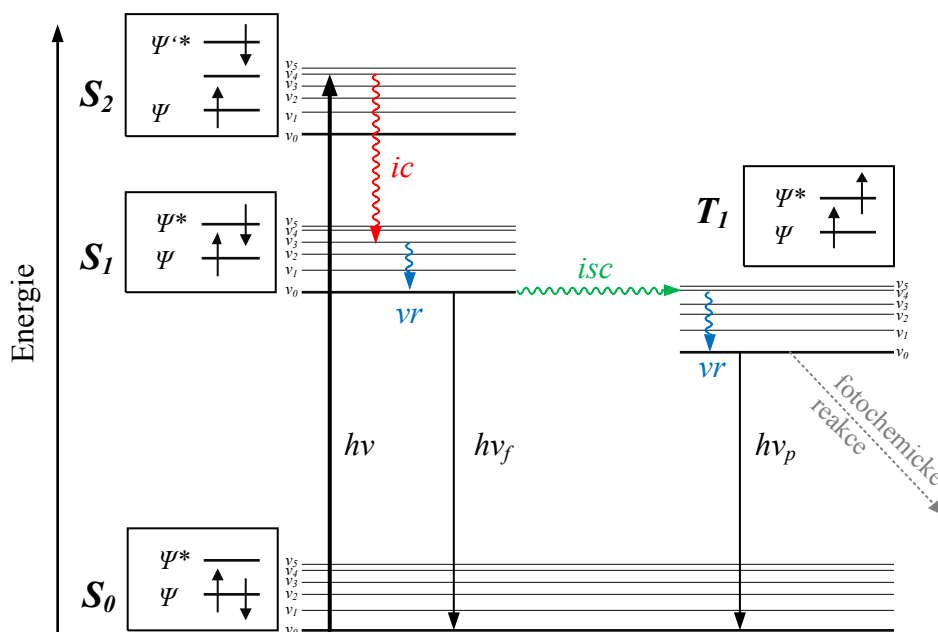
---

<sup>1</sup>Fyzikální proces, při kterém je energie fotonu pohlcena látkou.

### 3.1 Energetické stavy excitované molekuly

Jablonského diagram ilustruje relativní energie molekuly jak v základním stavu, tak i ve stavech excitovaných pro danou nukleární geometrii. Obrázek 3.1 zobrazuje základní elektronové stavy a nejčastější fotochemické procesy (přechody).

Nezářivé procesy se uskutečňují mezi vibračně-rotačními hladinami různých energetických stavů a jsou zobrazeny v diagramu vlnovkou. Vzhledem k tomu, že se při těchto procesech nemění celková energie systému, nedochází k emisi záření. Zářivé přechody jsou označeny v diagramu přímou šipkou a jsou spojeny s vyzářením světelného kvanta. V diagramu je také naznačen vznik fotochemických reakcí, za které se považuje chemická změna zahrnující fotodisociaci excitované molekuly na fragmenty, její spontánní izomeraci nebo reakci s další molekulou. [18]



**Obr. 3.1:** Jablonského diagram.  $h\nu$  = absorpce;  $h\nu_f$  = fluorescence;  $h\nu_p$  = fosforescence;  $ic$  = vnitřní konverze;  $isc$  = mezisystémový přechod;  $vr$  = vibrační relaxace;  $\psi$  = základní stav;  $\psi^*$  = excitovaný stav;  $\psi'^*$  = excitovaný stav s vyšší energií;  $v_0 - v_5$  = vibrační hladiny daného stavu. [Převzato s úpravami z: [18]]

K fotofyzikálním *zářivým* procesům patří [20]:

- „Povolená“ singlet-singlet absorpce  $S_0 + h\nu \rightarrow S_n$ , která je experimentálně charakterizována molárním absorpčním koeficientem<sup>2</sup>  $\varepsilon(S_0 - S_n)$ .
- „Zakázaná“ singlet-triplet absorpce  $S_0 + h\nu \rightarrow T_n$ , která je charakterizována molárním absorpčním koeficientem  $\varepsilon(S_0 - T_n)$ .
- „Povolená“ singlet-singlet emise  $S_n$  nebo  $S_1 \rightarrow h\nu + S_0$ , která je nazývána *fluorescence* a je charakterizována rychlostní konstantou  $k_f$ .

<sup>2</sup>Označován také jako exktinkční koeficient. Vyjadřuje celkový útlum (součet koeficientu absorpce a koeficientu rozptylu) světla při průchodu vrstvou prostředí.

- „Zakázaná“ triplet-singlet emise  $T_n$  nebo  $T_1 \rightarrow h\nu + S_0$ , která je nazývána *fosforescence* a je charakterizována rychlostní konstantou  $k_p$ .

K fotofyzikálním *nezářivým* procesům patří [18, 20]:

- „Povolený“ přechod mezi stavy se stejnou spinovou multiplicitou  $S_2 \rightarrow S_1$  nebo  $T_2 \rightarrow T_1$ , tzv. *vnitřní konverze*, označován jako *ic* (internal conversion). Vnitřní konverze je charakterizována rychlostní konstantou  $k_{ic}$ .
- „Zakázaný“ přechod mezi excitovanými stavy s odlišnou spinovou multiplicitou  $S_n \rightarrow T_n$ , tzv. *mezisystémový přechod*, označován *isc* (intersystem crossing). Mezisystémový přechod charakterizuje rychlostní konstanta  $k_{isc}$ .
- Přechod z vyšších vibračních stavů do stavu základního za současného uvolnění tepla, tzv. *vibrační relaxace*, označována jako *vr* (vibrational relaxation).

**Tab. 3.1:** Rychlostní konstanty procesů spojených s excitací molekuly. [Převzato z: [18]]

Název procesu	Rychlostní konstanta ( $s^{-1}$ )
Absorpce	$10^{15}$
Fluorescence	$10^6 - 10^9$
Fosforescence	$10^{-2} - 10^3$
Mezisystémový přechod	$10^6 - 10^{11}$
Vnitřní konverze	$10^{11} - 10^{14}$
Vibrační relaxace	$10^{10} - 10^{12}$

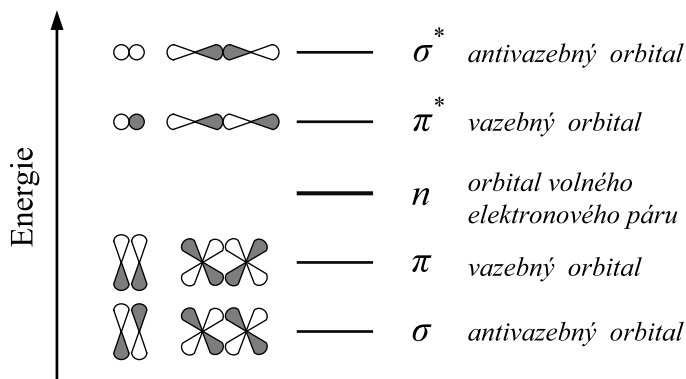
Hodnoty rychlostních konstant jednotlivých přechodů jsou uvedeny v tab. 3.1. Součet rychlostních konstant daného vibronového (vibračně-elektronového) stavu určuje jeho *dobu života*  $\tau = 1/k$ . [18]

### 3.1.1 Absorpce

Absorpce záření molekulou probíhá ze všech procesů nejrychleji ( $10^{-15}$  sekundy) a představuje základní podmínku jakéhokoliv fotofyzikálního nebo fotochemického experimentu. Podle prvního fotochemického zákona<sup>3</sup> vyvolává fotochemickou reakci pouze světelné kvantum, které molekula sama absorbuje. Nasycené organické molekuly jsou většinou bezbarvé a neposkytují absorpci v blízké UV ani VIS oblasti spektra, zatímco nenasyčené molekuly v těchto oblastech velmi dobře absorbují. Absorpce je zpravidla způsobena přechody vazebných ( $\pi$ ) nebo nevazebných ( $n$ ) elektronů v molekule do antivazebných ( $\pi^*$ ) molekulových orbitalů. U složitějších molekul se většinou jedná o kombinaci několika přechodů. Na obr. 3.2 jsou zobrazeny energetické hladiny molekulových orbitalů. [18, 22]

Aby absorbující látka (označována jako *chromogen*) byla schopna absorpce, musí obsahovat tzv. *chromofor*, který představuje atom nebo skupinu atomů odpovědných za absorpci v UV-VIS oblasti spektra. Chromofory obsahují uhlíkový řetězec obsahující konjugovaný  $\pi$ -systém dvojných vazeb (pravidelné střídání dvojných a jednoduchých vazeb), ale také azo skupiny, thio skupiny a další. Ke chromoforům bývají připojeny pomocné skupiny nazývané *auxochromy*, které jsou zodpovědné za barevnost látky. [18, 21, 22]

<sup>3</sup>Zákon byl formulován na počátku 19. století T. Grothussem a J. W. Draperem.



**Obr. 3.2:** Energetické hladiny molekulových orbitalů. [Převzato s úpravami z: [22]]

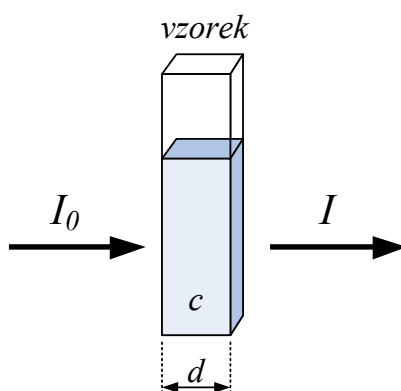
Prochází-li světelný paprsek prostředím schopným absorbovat, je intenzita paprsku vstupujícího vyšší než intenzita paprsku prošlého tímto prostředím. Tento jev je nazýván *Lambert-Beerův zákon* a nejčastěji má podobu:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cd} \quad (3.3)$$

kde  $I_0$  je intenzita vstupujícího záření,  $I$  intenzita prošlého záření,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient,  $d$  tloušťka měřeného vzorku a  $c$  je koncentrace vzorku.

Lambert-Beerova zákona se využívá v UV-VIS spektroskopii zejména pro stanovení neznámé koncentrace roztoku. Pro vyjádření závislosti absorpce záření na koncentraci vzorku je vhodné vztah pomocí logaritmu linearizovat. Zavádí se bezrozměrné veličiny *absorbance* ( $A$ ) a *transmittance* ( $T$ ):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T = \varepsilon cd \quad (3.4)$$



**Obr. 3.3:** Průchod světelného záření květou.

### 3.1.2 Vibrační relaxace a vnitřní konverze

Po excitaci na jednu z vibračních hladin  $v_n$  excitovaného stavu  $S_n$ , dochází obvykle k relaxaci na nejnižší vibrační hladinu  $v_0$  téhož excitovaného stavu spojenou s vyzářením energie ve formě tepla. Proces je velmi rychlý (mezi  $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  sekundy) a nastává s největší pravděpodobností okamžitě po absorpci. Relaxace probíhá pouze mezi vibračními hladinami, takže nedochází ke změně elektronového stavu. [18]

V případě, že vibrační energie je dostatečně vysoká, může dojít k přeskoku elektronu z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu  $S_1$  na nejvyšší vibrační hladinu energetického stavu  $S_0$ . Tento proces se nazývá vnitřní konverze a je mechanisticky stejný jako vibrační relaxace. Vibrační hladiny stavu  $S_0$  se mohou překrývat s vibračními hladinami stavu  $S_1$ , elektron tak může přeskočit mezi těmito stavy bez výrazné změny energie. Pokud se hladiny nepřekrývají a jsou v dostatečné blízkosti, může dojít k přeskoku elektronu prostřednictvím tunelového efektu. Pravděpodobnost vnitřní konverze se zvyšuje se zmenšováním vzdálenosti mezi danými vibračními hladinami. [18, 22]

### 3.1.3 Mezisystémový přechod

Mezisystémový přechod zahrnuje změnu spinu elektronu, probíhá tedy mezi energetickými hladinami *singlet*  $\rightarrow$  *triplet*. Tripletová hladina  $T_1$  leží níže než hladina singletová  $S_1$ . Nejdůležitějšími přechody ve fotochemii jsou  $S_1 \rightarrow T_1$  a  $T_1 \rightarrow S_0$ , které jsou charakterizovány rychlostními konstantami  $k_{ST}$  a  $k_{TS}$  (nebo obecně  $k_{isc}$ ). Přechod se může uskutečnit buď přímou spin-orbitální interakcí stavu  $S_1$  do vyšší vibrační hladiny  $T_1$  nebo spin-orbitální interakcí  $S_1$  do vyššího tripletového stavu  $T_n$ , která je ihned následována vnitřní konverzí  $T_n \rightarrow T_1$ . Mezisystémový přechod je vlivem „zakázané“ inverze spinu poměrně pomalý proces (mezi  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  sekundy). Mezisystémový přechod je běžný u molekul obsahující tzv. „těžký atom“. [18, 22]

### 3.1.4 Fluorescence a fosforescence

Luminiscenční zářivé přechody – *fluorescence* a *fosforescence* – jsou definovány dle povahy excitovaného stavu. Po absorpci záření přechází elektron na jednu z vibračních hladin excitovaného singletového stavu ( $S_0 \rightarrow S_n$ ). Následuje přechod prostřednictvím vnitřní konverze a vibrační relaxace na nejnižší vibrační hladinu excitovaného singletového stavu  $S_1$ , ze kterého elektron přechází na jednu z vibračních hladin základního stavu  $S_0$  společně s vyzářením fotonu, jedná se o fluorescenci. [18, 22]

V případě, že elektron přechází prostřednictvím mezisystémového přechodu z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu na vibrační hladinu tripletového stavu ( $S_1 \rightarrow T_1$ ), kde následně vibračními relaxacemi přechází na nejnižší hladinu tripletového stavu  $T_1$ , odkud dojde k zářivému přechodu na jednu z vibračních hladin základního stavu ( $S_0$ ), hovoříme o fosforescenci. Proces fosforescence je velmi pomalý (mezi  $10^{-3}$  a  $10^2$  sekundy), neboť se jedná o „zakázaný“ přechod (musí dojít ke změně spinu elektronu). Z tohoto důvodu je pravděpodobnost přechodu nízká a s tím souvisí delší čas „vyhasínání“. Vzhledem k dlouhým dobám života fosforeskujících stavů (jednotky milisekund až sekundy) je srážka s jinou molekulou nejčastější příčinou jejich deaktivace a tudíž fosforescence viditelná pouhým okem je málo častá. Potlačení srážek s jinými molekulami lze dosáhnout v tuhých (rigidních) médiích, kde nejsou molekuly schopné difuze. Fosforescence je oproti fluorescenci méně častým jevem. Vzhledem k tomu, že tripletový stav  $T_1$  je energeticky

níže než singletový stav  $S_1$ , je vlnová délka u fosforescence delší ve srovnání s fluorescencí. [18, 22]

Speciálním případem luminiscence je tzv. *zpožděná fluorescence*, která představuje *termální excitaci* molekuly z nejnižší vibrační hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší vibrační hladinu excitovaného singletového stavu ( $T_1 \rightarrow S_1$ ) – tento jev je označován jako *reverzibilní mezisystémový přechod* (reverse intersystem crossing). K fluorescenci dochází po návratu na hladinu stavu  $S_1$ , proto je vlnová délka stejná jako u klasické fluorescence. Vlivem reverzibilního mezisystémového přechodu, který způsobuje zdržení celého děje, je čas vyhasínání mnohem delší než u klasické fluorescence. [22]

### 3.1.5 Zhášení a senzibilizace

Kromě dříve zmíněných unimolekulárních deaktivčních procesů (zářivé a nezářivé přechody u molekuly), existují také bimolekulární deaktivční mechanismy. Ty zahrnují přenos energie z jedné molekuly (označme jako *donor D*) na druhou (označme jako *akceptor A*). Excitace akceptoru při tomto procesu se nazývá *senzibilizace* (*sensitization*), zatímco pokud je předmětem zájmu deaktivace donoru, hovoříme o tzv. *zhášení* (*quenching*). Oba mechanismy hrají důležitou roli v organické fotochemii. [17, 18]

#### Přenos energie

Pokud excitovaná molekula donoru  $D^*$  (*senzibilizátor*) přenesou energii elektronu na molekulu akceptoru  $A$  (*zhášeč*) a sama se deaktivuje do základního stavu, jedná se o proces *přenosu energie*, který se může uskutečnit pomocí dvou mechanismů, které se řídí *Wigner-Witmerovým pravidlem*<sup>4</sup> [17, 18]:



kde  ${}^1D$  ( ${}^1A$ ) a  ${}^1D^*$  ( ${}^1A^*$ ) jsou základní singletový stav donoru (akceptoru), resp. excitovaný singletový stav donoru (akceptoru),  ${}^3D$  ( ${}^3A$ ) a  ${}^3D^*$  ( ${}^3A^*$ ) jsou tripletový stav donoru (akceptoru), resp. excitovaný tripletový stav donoru (akceptoru). Rovnice (3.5) popisuje vznik excitovaného (pomocí absorpce světelného kvanta) a tripletového (prostřednictvím mezisystémového přechodu) stavu senzibilizátoru. Singlet-singletový (3.6) a triplet-tripletový (3.7) přenos energie představují kvantově-mechanicky „povolené“ procesy. V tzv. *senzibilizačních* reakcích (3.7) je používaným mechanismem právě triplet-tripletový přenos energie. Reakce (3.8) představuje tzv. triplet-tripletovou anihilaci (TTA), která je využívána při generování singletového kyslíku. [17, 18, 19]

#### Přenos elektronu

Směs dvou typů molekul, jedna s nízkým ionizačním potenciálem (donor elektronů) a druhá s vysokou elektronovou afinitou (akceptor elektronů), vykazují v základním stavu

<sup>4</sup>V průběhu reakce se celkový spin reakčního procesu nemění. [18]



absorpční pásy, které se jinak u samostatných molekul neobjevují. Tyto absorpční pásy vznikají na základě tvorby tzv. *charge-transfer* (CT) komplexů. Dle definice je charge-transfer (neboli *přenos náboje*) elektronový přechod, kdy je část elektronového náboje přemístěna z donoru na akceptor. Pokud se mezi molekulami donoru a akceptoru přemístí celý náboj, hovoříme o *přenosu elektronu* [18]:

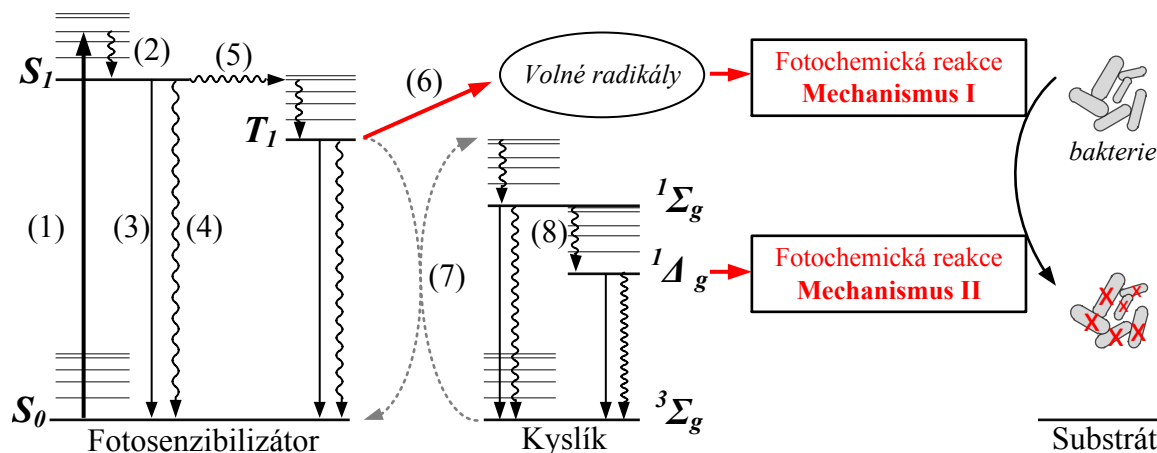


kde  $D^*$  představuje excitovaný stav donoru,  $A$  základní stav akceptoru,  $D^{\cdot+}$  kation radikál donoru a  $A^{\cdot-}$  anion radikál akceptoru.

K dalším deaktivacím procesům excitované molekuly lze zařadit např. *fragmentaci* (rozštěpení molekuly), *ionizaci* (proces, při kterém se z elektricky neutrální molekuly stává ion) nebo *izomeraci* (změna uspořádání atomů v molekule bez změny druhu a počtu atomů tvořících molekulu). [18]

## 3.2 Fotosenzibilizační reakce kyslíku

Vzhledem k tomu, že molekula kyslíku nemá v běžně dosažitelné oblasti UV–VIS záření výraznější absorpci, je nutné excitovat molekulu kyslíku nepřímo pomocí fotosenzibilizátoru. Mechanismy fotosenzibilizačních reakcí kyslíku jsou zjednodušeně znázorněny na obr. 3.4.



**Obr. 3.4:** Mechanismy fotosenzibilizačních reakcí kyslíku. [Převzato s úpravami z: [36]]

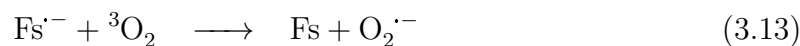
Molekula fotosenzibilizátoru (Fs) se po absorpci světelného kvanta (1) dostává do excitovaného singletového stavu  $S_n$ , který rychlou vibrační relaxací (2) přechází na nejnižší excitovaný singletový stav  $S_1$  ( $^1\text{Fs}^*$ ). Následně se stav  $S_1$  deaktivuje jedním ze tří možných způsobů: vnitřní konverzí (4), vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence (3), mezisystémovým přechodem do tripletového stavu  $T_1$  ( $^3\text{Fs}^*$ ) (5).

Přechod fotosenzibilizátoru ze základního stavu do tripletového lze zobrazit jako:

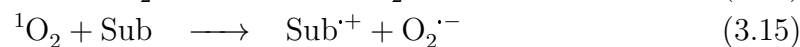
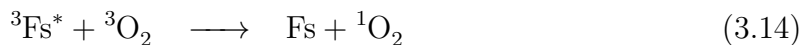


Dosavadní znalosti problematiky fotoexcitace kyslíku mohou vyústit v následující dvě schémata [2] :

- **Mechanismus I** – Přenos elektronu



- **Mechanismus II** – Přenos energie



Rovnice (3.12)–(3.15) představují reakční mechanismy deaktivace tripletového stavu fotosenzibilizátoru, kde:

${}^3\text{Fs}^*$	.....	fotosenzibilizátor v tripletovém stavu
${}^1\text{Fs}$	.....	fotosenzibilizátor v singletovém stavu
Sub	.....	substrát v základním stavu
$\text{Fs}^{\cdot-}$ a $\text{Sub}^{\cdot+}$	.....	částice radikálového typu
${}^1\text{O}_2$	.....	kyslík v singletovém stavu
${}^3\text{O}_2$	.....	kyslík v tripletovém stavu
$\text{O}_2^{\cdot-}$	.....	superoxidový radikál

Výsledkem obou cest je jedno-elektronová oxidace substrátu na kation radikál ( $\text{Sub}^{\cdot+}$ ) a jedno-elektronové redukce kyslíku na superoxidový radikál ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). [2]

Reakční *mechanismus I* představuje elektronový transport. Interakce tripletového stavu fotosenzibilizátoru se základním stavem okolních akceptorových molekul vede ke generaci řady radikálů (6), které následně reagují s okolním kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku. [14]

V reakčním *mechanismu II* interaguje fotosenzibilizátor v tripletovém stavu s dikyslíkem a dochází k přenosu energie z fotosenzibilizátoru na tripletový kyslík (7). Následně vzniká reaktivnější singletový kyslík  ${}^1\text{O}_2$ . Molekula kyslíku v elektronovém uspořádání  ${}^1\Sigma_g$  velmi rychle přechází do stabilnější formy  ${}^1\Delta_g$  (8). Méně častým příkladem ( $< 1\%$ ) reakčního mechanismu II je elektronový transport vedoucí ke vzniku superoxidového radikálu  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . [14, 23]

Zhášení tripletových stavů fotosenzibilizátoru v některých organických rozpouštědlech produkuje jak  ${}^1\Delta_g$  tak i  ${}^1\Sigma_g$ . Poměr mezi produkcí obou forem singletového kyslíku závisí nejen na povaze fotosenzibilizátoru, ale i na přítomném rozpouštědle. [1]

Z obr. 3.4 je patrné, že deaktivace excitovaných stavů je fyzikální monomolekulární proces, zatímco zhášení kyslíkem, popř. jinou molekulou představuje bimolekulární reakci. Pro rychlostní konstantu deaktivace tripletového stavu  $k^T$  za nepřítomnosti kyslíku nebo jiného zhašedla platí [1]:

$$k^T = (k_p + k_{isc}^T) \quad (3.16)$$

kde  $k_p$  a  $k_{isc}^T$  představují rychlostní konstanty deaktivace fosforescencí a mezisystémovým přechodem. Hodnota  $\tau_T = 1/k^T$  je doba života excitovaného fotosenzibilizátoru v tripletovém stavu. Obdobně dobu života excitovaného singletového stavu lze vyjádřit jako  $\tau_S = 1/k^S$ , rychlostní konstantu deaktivace singletového stavu  $k^S$  lze poté stanovit takto [1]:

$$k^S = (k_f + k_{ic}^S + k_{isc}^S) \quad (3.17)$$

kde  $k_f$ ,  $k_{ic}^S$  a  $k_{isc}^S$  představují rychlostní konstanty deaktivace fluorescencí, vnitřní konverzí a mezisystémovým přechodem. V přítomnosti kyslíku je pozorována rychlostní konstanta zhášení fotosenzibilizátoru v tripletovém stavu  $k_{obs}$  a je dána vztahem [1]:

$$k_{obs} = (k^T + k_q) [\text{O}_2] \quad (3.18)$$

kde  $k_q$  představuje rychlostní konstantu charakterizující bimolekulární zhášení kyslíkem a zahrnující všechny zhašecí procesy (přenos energie, přenos elektronu a vliv kyslíku na rychlost mezisystémového přechodu). [1]

Přenos energie nebo elektronu na kyslík představují kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně-chemických a fotofyzikálních vlastnostech fotosenzibilizátoru, která z nich převládá. [1]

Účinnost fotochemické reakce charakterizuje tzv. *kvantový výtěžek*  $\Phi$ , který přímo souvisí se schopností molekuly tvořit produkty po absorpci světla a přímo tedy vyjadřuje „celkovou“ informaci o fotochemické reakci. Je definován jako poměr počtu molů přeměněných molekul (vznik či zánik) k počtu molů absorbovaných světelných kvant. Hodnoty kvantového výtěžku mohou nabývat hodnot  $\leq 1$ . V případech, kdy je počet přeměněných molekul zvyšován následnými reakcemi (řetězová nebo fotokatalytická reakce), může  $\Phi$  nabývat i hodnot  $> 1$ . [1, 18]

Kvantový výtěžek může být vztažen také na počet molekul produktu. U fotosenzibilizačních reakcí produkujících  $^1\text{O}_2$  bývá označován  $\Phi_\Delta$ .

$$\Phi_\Delta = \frac{\text{počet molekul } ^1\text{O}_2}{\text{počet světelných kvant absorbovaných fotosenzibilizátorem}} \quad (3.19)$$

Hodnoty  $\Phi_\Delta$  při zhášení fotosenzibilizátoru v tripletovém stavu  $T_1$  jsou v rozmezí 0 až 1. V prvním případě  $^1\text{O}_2$  vůbec nevzniká, naopak v případě druhém vede každá srážka ke vzniku  $^1\text{O}_2$ . Kvantový výtěžek singletového kyslíku  $\Phi_\Delta$  závisí na kvantovém výtěžku tripletových stavů daného fotosenzibilizátoru  $\Phi_T$  podle následujícího vztahu [1]:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_\Delta S_q \quad (3.20)$$

kde  $S_\Delta$  představuje podíl tripletových stavů fotosenzibilizátoru zhášeného kyslíkem a poskytující  $^1\text{O}_2$ . Pro tripletové stavy s  $\tau_T$  větší než několik  $\mu\text{s}$  platí vztah [1]:

$$S_\Delta = \frac{k_\Delta}{k_q} \quad (3.21)$$

kde  $k_\Delta$  je rychlostní konstanta vzniku  $^1\text{O}_2$  přenosem energie.

Pro přenos energie je nutný kontakt mezi  $^3\text{Fs}^*$  a  $^3\text{O}_2$  dříve, než tripletové stavy zaniknou. Faktor  $S_q$  z rov. (3.20) představuje podíl tripletových stavů fotosenzibilizátoru, které interagují s kyslíkem a je dán vztahem [1]:

$$S_q = \frac{k_q[\text{O}_2]}{k_q[\text{O}_2] + k^T} \quad (3.22)$$

kde ve jmenovateli jsou uvedeny veškeré procesy deexcitace  $^3\text{Fs}^*$ . Pro dostatečně velké koncentrace kyslíku platí:  $k^T \ll k_q[\text{O}_2]$  a  $S_q \cong 1$ . Z toho vyplývá vztah [1]:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_\Delta \quad (3.23)$$

V opačném případě, při velmi malých koncentracích kyslíku, roste význam monomolekulárních deaktivací  $^3\text{Fs}^*$  a  $S_q$  nabývá na významu. Z definic vyplývá, že hodnota  $\Phi_\Delta$  je závislá na koncentraci kyslíku a je tedy proměnným parametrem studovaného fotosenzibilizátoru. [1]

# 4 Detekce singletového kyslíku

Detekce a určení množství singletového kyslíku jsou velmi důležité aspekty pro dokonalé porozumění mechanismů spojených s jeho vznikem. Vzhledem k velké reaktivitě singletového kyslíku existuje pouze několik *přímých metod* detekce  $^1\text{O}_2$ . K přímé detekci patří detekce luminiscence (v tomto případě hovoříme o fosforescenci) singletového kyslíku na vlnové délce 1270 nm. K *nepřímým metodám* lze zařadit spektrofotometrické, fluorescenční nebo chemiluminescenční metody detekce. [4, 24]

## 4.1 Chemické metody

K detekci a určení výtěžků  $^1\text{O}_2$  se většinou používají metody založené na jeho reakcích s látkami, které jsou schopné tvořit charakteristické produkty fotooxidace. Jsou teplotně nezávislé a musejí být dostatečně selektivní s ohledem na  $^1\text{O}_2$  – veškeré primární a sekundární produkty reakce musejí být dobře rozlišitelné. Výhodou chemických metod je jednoduchost experimentálního provedení. [1]

Běžně se k diagnostice přítomnosti singletového kyslíku používají zhašecí metody, kde se nahrazuje  $\text{H}_2\text{O}$  pomocí  $\text{D}_2\text{O}$ . V rozpouštědle  $\text{D}_2\text{O}$  je doba života  $^1\text{O}_2$   $16\times$  vyšší než ve vodě (viz tab. 2.1) a tedy roste i pravděpodobnost chemické reakce. Jako fyzikální zhašeče se používají azid sodný, či  $\beta$ -karoten. K chemickým zhašečům patří histidin, tryptofan, kyselina močová a další. [1]

- **Odbarvovací metody** – využívají skutečnosti, že během reakce s  $^1\text{O}_2$  se absorpční pásy reaktantu snižují úměrně množství generovaného  $^1\text{O}_2$ . Reakci lze tak velmi snadno sledovat fluorescenčně nebo spektrofotometricky. Reaktanty bývají většinou tvořeny konjugovaným systémem dvojných vazeb, se kterými singletový kyslík reaguje za vzniku edoperoxidů či hydroperoxidů. Tyto metody bývají velmi citlivé a jednoduché, neboť singletový kyslík dokáže působit destruktivně na chromofory molekul reaktantu. Na druhou stranu je nutné zdůraznit několik důležitých podmínek: fotosenzibilizátor a reaktant se nesmí příliš lišit polaritou, musejí být navzájem zcela indiferentní a jejich absorpční pásy se nesmějí překrývat. [1]
- **Vznik specifických produktů** – fluorescenční činidla (fluorescence probe) slouží k detekci  $^1\text{O}_2$  pomocí změn vlastností sledované fluorescence (změna intenzity, vlnové délky, doby života nebo kvantového výtěžku). 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. 4.1a). DMAX reaguje s  $^1\text{O}_2$  na odpovídající endoperoxid. Výchozí DMAX je slabě fluoreskující látkou, zatímco jeho endoperoxid vykazuje intenzivní fluorescenci. [1, 24]
- **Reakce s anorganickými látkami** – například reakce  $^1\text{O}_2$  s  $\text{I}^-$  ve vodném prostředí vede složitým mechanismem ke vzniku  $\text{I}_3^-$  v přítomnosti katalyzátoru

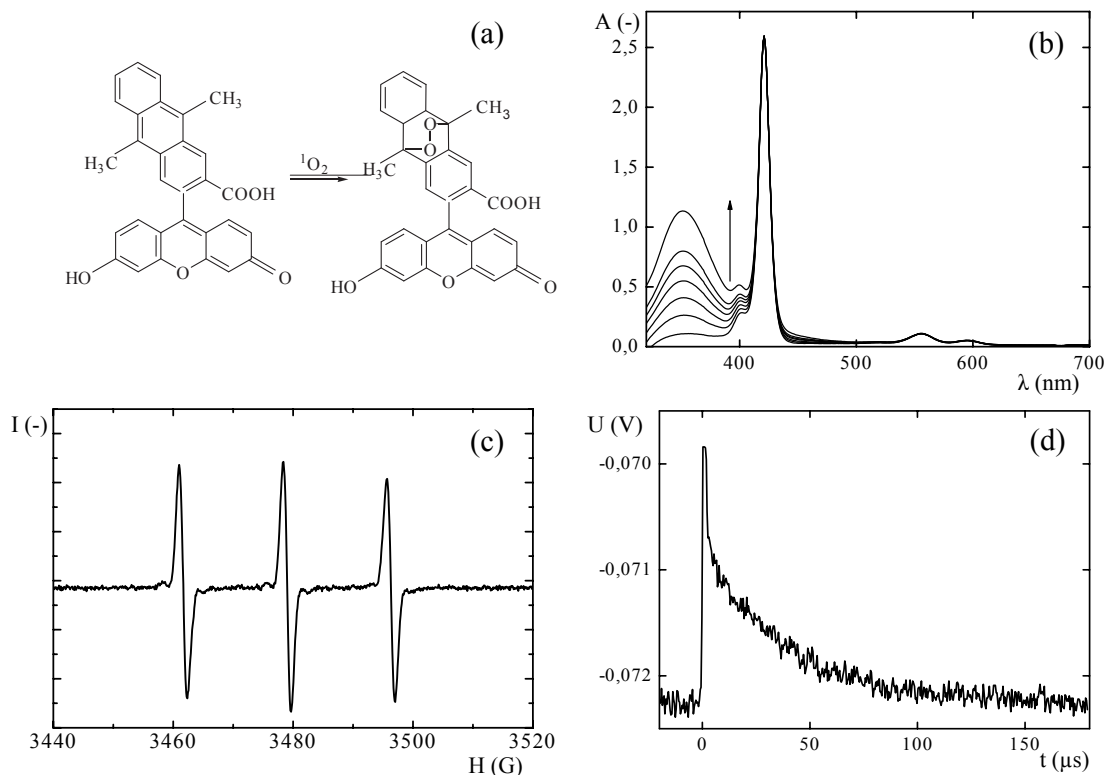
$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  (tzv. *jodometrická metoda*). Koncentraci nově vznikajícího  $\text{I}_3^-$  lze sledovat v jeho absorpčním pásu při vlnové délce 351 nm (obr. 4.1b). [1, 26]

- **Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)** – poměrně instrumentálně náročná (obr. 4.2) metoda nepřímé detekce  $^1\text{O}_2$ , která je založena na reakci  $^1\text{O}_2$  s neradikálovou sloučeninou za vzniku stabilního radikálového produktu. Metoda bývá označována jako *spinový záchyt* (spin trapping). Na stanovení  $^1\text{O}_2$  se nejčastěji používá 2,2,6,6-tetramethylpiperidin a jeho deriváty. Vznikající nitroxidový radikál je charakteristický třemi liniemi v EPR spektru. Intenzita daných linií je úměrná koncentraci singletového kyslíku v roztoku (obr. 4.1c). [1, 25]

## 4.2 Fyzikální metody

K fyzikálním metodám patří zejména přímá detekce luminiscence  $^1\text{O}_2$ , vybrané fototermální techniky a časově rozlišitelná absorpce  $^1\text{O}_2$  v IR oblasti. K výhodám těchto metod patří jednoznačně přímá detekce  $^1\text{O}_2$  – odpadá vliv sekundárních reakcí s chemickými činidly. Na straně druhé je nutné podotknout, že fyzikální metody jsou jak časově, tak i finančně náročné a vyžadují použití speciálních světelných zdrojů (nejčastěji lasery) a speciálně konstruovaných detektorů. [1]

- **Fototermální techniky** – k fototermálním technikám lze zařadit fotoakustickou kalorimetrii (LIOAS - Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy) a TRTL - Time-Resolved Thermal Lensing). První metoda (LIOAS) měří tlakový ráz, který vznikl vlivem uvolnění tepla během neradiačních procesů excitované molekuly. Tlakové vlny jsou převedeny pomocí piezoelektrického čidla na elektrický signál. Zatímco druhá metoda (TRTL) je schopna určit změny indexu lomu indukované lokálním uvolněním tepla v souvislosti se vznikem a reakcemi  $^1\text{O}_2$ . Obě metody lze použít pro stanovení kvantového výtěžku singletového kyslíku ( $\Phi_\Delta$ ). [1]
- **Měření luminiscence** – přímá detekce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  a  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$  je založena na monitorování odpovídajících radiačních přechodů (tab. 2.1). Nejčastěji se používá časově rozlišená detekce fosforescence (TRNIR)  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  při 1 270 nm (obr. 4.1d). Vzorek je umístěn v běžné fluorescenční kyvetě a je excitován pomocí pulzního laseru o vhodné vlnové délce. Kvantový výtěžek fosforescence je velmi malý (dle rozpouštědla  $\sim 10^{-4}$  až  $10^{-7}$ ), proto musí být nároky na citlivost detekčního systému poměrně vysoké. [1, 25]
- **Měření absorpce** – analogicky k měření fluorescence přechodu  $\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow \text{O}_2(^1\Delta_g)$  je možno také měřit opačný jev, tj. absorpci  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$  v IR oblasti. Poloha maxima absorpčního pásu  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  značně závisí na druhu použitého rozpouštědla. [1]



**Obr. 4.1:** Metody detekce singletového kyslíku. (a) Luminiscenční detekce  $^1\text{O}_2$  pomocí fluorescenčního činidla DMAX; (b) Jodometrická metoda detekce  $^1\text{O}_2$  prostřednictvím fotoexcitace Zn-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinu (sleduje se nárůst absorbance  $\text{I}_3^-$  při 351 nm po ozáření látky); (c) Stanovení  $^1\text{O}_2$  po reakci s 2,2,6,6-tetramethylpiperidinem pomocí EPR spektrometrie; (d) Přímá metoda měření fosforescence  $^1\text{O}_2$  (TRNIR) při 1 270 nm (excitace Pd(II)-5,10,15,20-tetrakis(sulfonatofenyl)porfyrinu při 408 nm). [Převzato s úpravami z: [1, 24]]



**Obr. 4.2:** EPR spektrometr Bruker EMX Plus v laboratořích Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. [Převzato z: <http://www.uochb.cz/>]

# 5 Organické fotosenzibilizátory

Existuje celá řada organických molekul absorbujících záření v oblasti UV-VIS a vykazujících schopnost generace reaktivních forem kyslíku prostřednictvím fotosenzibilizačních reakcí. Podle vzniku je lze rozdělit do dvou základních kategorií [1, 2]:

- PŘÍRODNÍ: porfyriny, chlorofyl, bilirubin, retinal, chinony, flaviny (riboflavin), hypericin (třezalka tečkovaná), hypocrellin
- SYNTETICKÉ: fluorescein, eosin (B, Y), methylenová modř, bengálská červeň, akridinová oranž, dibromoalizarinová violet, ftalocyaniny, rhodaminy, purpuriny

Jedná se tedy víceméně o různá barviva, aromatické a heterocyklické organické sloučeniny a barevné kovové komplexy.

Zhášení tripletových stavů kyslíkem může probíhat buď přenosem elektronu za vzniku  $O_2^{\cdot-}$  nebo přenosem energie vedoucí ke vzniku  $^1O_2$  (více viz kapitola 3.2). fotosenzibilizátory označované jako  $(n, \pi^*)$ , kde excitovaný elektron pochází z ne vazebného orbitalu, poskytují převážně  $O_2^{\cdot-}$ . Na druhé straně fotosenzibilizátory typu  $(\pi, \pi^*)$ , kde excitovaný elektron pochází z  $\pi$  orbitalu, poskytují  $^1O_2$ . Mezi významné představitele tohoto typu patří eosin, akridin, bengálská červeň, methylenová modř, porfyriny a ftalocyaniny. [1]

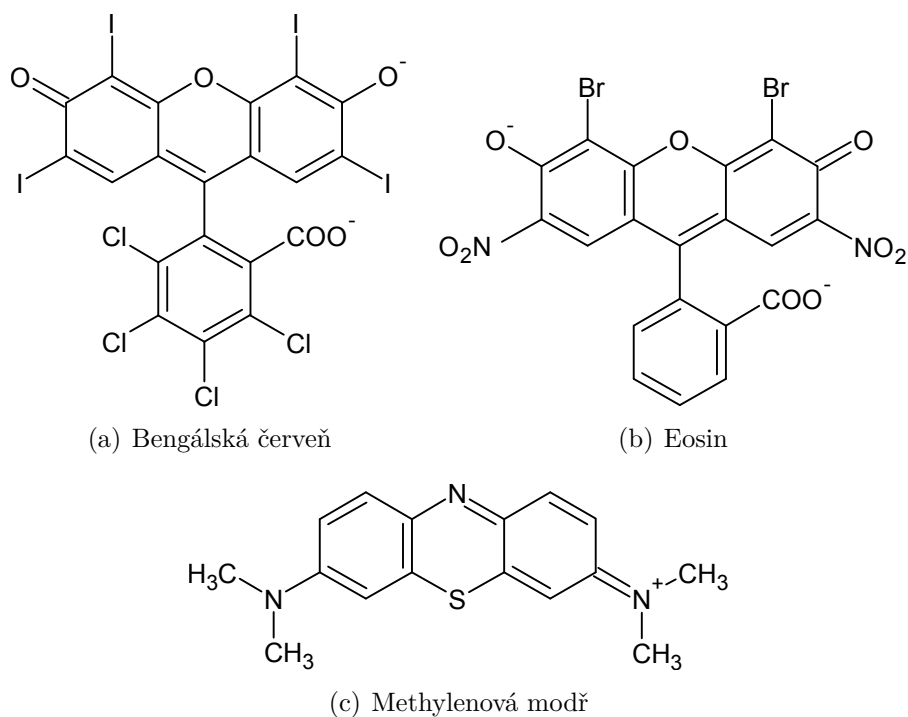
## 5.1 Organická barviva

Organická barviva (pigmenty) jako např. *bengálská červeň*, *eosin* a *methylenová modř* jsou velmi efektivními fotosenzibilizátory, které disponují odpovídající energií tripletového stavu pro fotosenzibilizaci kyslíku. Methylenová modř je fenothiazinové barvivo s výraznou absorpcí v rozmezí 550–700 nm a značným kvantovým výtěžkem ( $\Phi_{\Delta} = 0,52$ ). Xantheonová barviva – bengálská červeň a eosin – vykazují intenzivní absorpci v zelené oblasti spektra viditelného záření (480–550 nm). Kvantový výtěžek bengálské červeně odpovídá  $\Phi_{\Delta} = 0,76$ . [4]

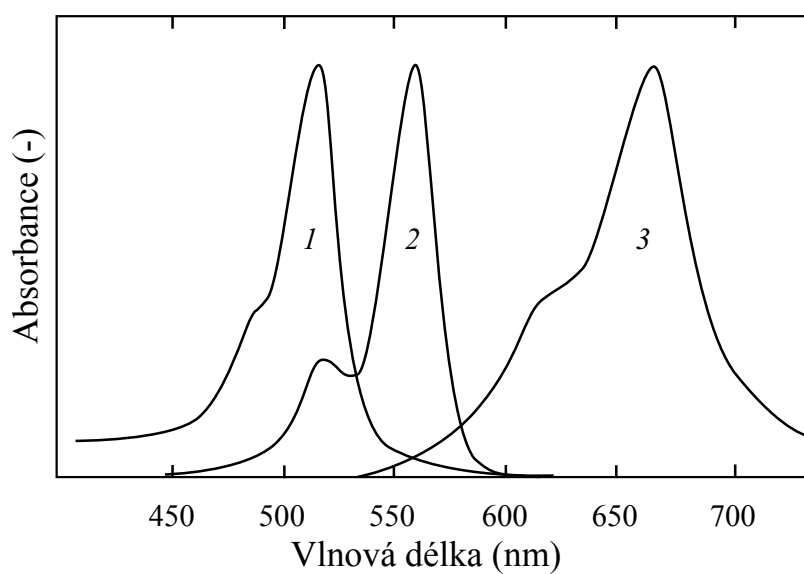
**Tab. 5.1:** Kvantové výtěžky vybraných organických barviv. |Převzato s úpravami z: [4]|

Barvivo	$\phi_{\Delta}$
Bengálská červeň	0,76 (H <sub>2</sub> O)
Fluorescein	0,03 (H <sub>2</sub> O)
Eosin	0,52 (H <sub>2</sub> O)
Methylenová modř	0,52 (EtOH)
Erythrosin	0,63 (H <sub>2</sub> O)





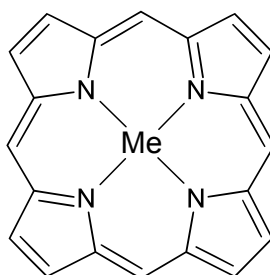
**Obr. 5.1:** Chemické struktury vybraných organických barviv.



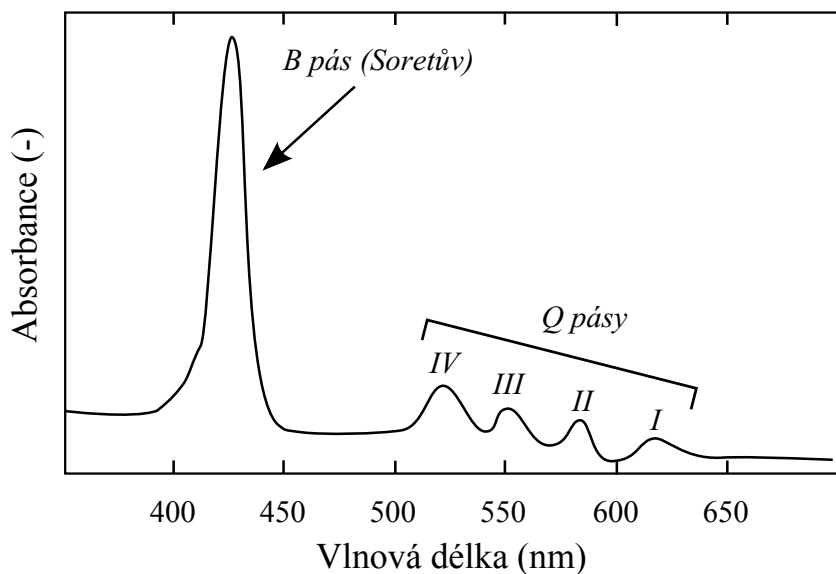
**Obr. 5.2:** Absorpční spektrum vybraných organických barviv. 1 – Eosin; 2 – Bengálská červeně; 3 – Metylenová modř. [Převzato s úpravami z: [27, 28, 29]]

## 5.2 Porfyriny

V poslední době byla v oblasti výzkumu fotosenzibilizátorů pozornost zaměřena také na *porfyriny* a jejich deriváty, neboť jejich přítomnost v přírodních systémech z nich dělá ideální kandidáty pro biologické aplikace spojené s generací singletového kyslíku. Porfyriny představují cyklické tetrapyrrolové sloučeniny obsahující systém konjugovaných dvojných vazeb se schopností tvořit komplexy s kovovými ionty. Charakteristickým znakem většiny porfyrinů je úzký absorpční pás ležící mezi 350 nm a 450 nm, jedná se o tzv. *Soretův pás* (někdy bývá označován také jako *B pás*) a několik nižších pásů ležících mezi 500 nm a 650 nm (tzv. *Q pásy*). Porfyriny disponují velkými kvantovými výtěžky  $\Phi_{\Delta}$  díky dlouhé době života jejich tripletových stavů. Některé porfyriny se velmi rychle rozkládají za přítomnosti  $^1\text{O}_2$ . K dobře prozkoumaným porfyrinům patří hematoporfyrin s vysokým kvantovým výtěžkem  $\Phi_{\Delta} = 0,83$ . [4, 30]



**Obr. 5.3:** Základní chemická struktura porfyrinu s centrálním kovovým atomem.



**Obr. 5.4:** Absorpční spektrum porfyrinu s typickými absorpčními pásy. [Převzato s úpravami z: [30]]

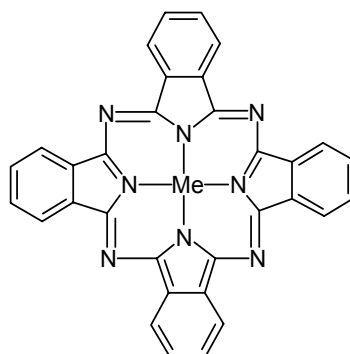
## 5.3 Ftalocyaniny

*Ftalocyaniny*, deriváty porfyriu, představují organická barviva modré barvy, která byla prvně objevena na počátku 19. století. Struktura ftalocyaninu je odvozena od molekuly tetraazaporfyriu, rozšířeného o čtyři benzenová jádra. Molekula ftalocyaninu obsahuje centrální kovový atom vázaný pomocí kovalentních a elektrostatických vazeb k organickému ligandu, který ho obklopuje (obr. 5.5). Doposud bylo připraveno více jak sedmdesát ftalocyaninů různých kovů, mezi kterými zaujímá významné postavení ftalocyanin mědi. Molekula nesubstituovaného ftalocyaninu vykazuje nízkou rozpustnost jak v polárních, tak i nepolárních rozpouštědlech, a proto vyžaduje dodatečnou chemickou modifikaci. Pro použití v polárním prostředí (vodné) se benzenová jádra základní molekuly ftalocyaninu modifikují specifickými funkčními skupinami. K nejčastější chemické modifikaci patří *sulfonace* nebo *karboxylace* ftalocyaninů, které jsou poté ve vodě velmi dobře rozpustné, ale takto modifikované sloučeniny ovšem mají tendenci k tzv. *agregaci* (tvorba dimerních forem a struktur vyšších řádů) díky jejich systému konjugovaných vazeb. Agregace snižuje dobu života excitovaného tripletového stavu látky vlivem samozhášení excitovaných stavů a tím snižuje účinnost fotosenzibilizačních reakcí. [31, 32, 33, 34]

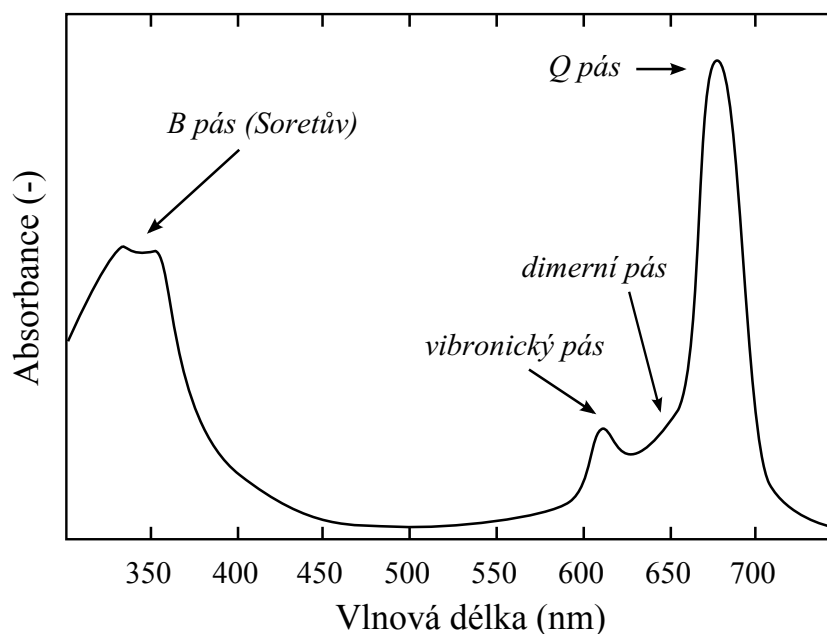
Obecně v UV-VIS absorpčním spektru ftalocyaninů (obr. 5.6) dominují dva charakteristické pásy, Soretův (B) pás a Q pás v oblasti 350 nm, respektive 670 nm. Q pás dále obsahuje sousední vibronický pás pozorovatelný při 610 nm. Další rozpoznatelný pás, objevující se okolo 630 nm, je způsoben agregáty (dimerní formy) a většinou se překrývá s postranním vibronickým pásem. Pozice těchto charakteristických absorpčních pásů ftalocyaninů je ovlivněna povahou, polohou a počtem substituentů ftalocyaninu, centrálním atomem kovu, použitým rozpouštědlem a v neposlední řadě i agregací molekul ftalocyaninu. [35]

Povaha centrálního atomu ovlivňuje celkové fotofyzikální vlastnosti ftalocyaninů – kvantový výtěžek formace tripletového stavu a jeho dobu života. Ftalocyaniny obsahující paramagnetický kov ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{V}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  a  $\text{Pd}^{2+}$ ) vykazují krátké doby života tripletového stavu v důsledku zvýšení mezisystémového přechodu zpět do základního stavu. Ftalocyaniny s diamagnetickým kovovým iontem ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$ ) dosahují značných kvantových výtěžků v organických rozpouštědlech ( $\Phi_{\Delta} = 0,47\text{--}0,63$ ) díky relativně dlouhé době života tripletových stavů ( $\tau_t > 200 \mu\text{s}$ ). [35]

Výrazná absorpce ftalocyaninů v oblasti červeného spektra překrývající oblast vlnových délek maximální penetrace světla do tkáně společně se zdravotní nezávadností z nich dělá velmi vhodné kandidáty pro použití ve fotosenzibilizačních reakcích, zejména pak ve fotodynamické terapii. [4]



**Obr. 5.5:** Základní chemická struktura ftalocyaninu s centrálním kovovým atomem.



**Obr. 5.6:** Absorpční spektrum sulfonovaného derivátu ftalocyaninu hliníku s typickými absorpčními pásy. [Převzato s úpravami z: [37]]

## 5.4 Imobilizované fotosenzibilizátory

Do popředí zájmu se dostávají také *imobilizované* fotosenzibilizátory. Pomocí imobilizace se vytvoří heterogenní systém, kde jsou fotosenzibilizátor a reagující látka odděleny, zatímco v neimobilizované formě jsou v přímém kontaktu. Nasazení těchto látek v praktických aplikacích má řadu výhod: snadné odstranění fotosenzibilizátoru ze systému, opakované použití, zamezení samozhášení a zvýšení odolnosti fotosenzibilizátoru vůči degradaci. Imobilizaci fotosenzibilních látek lze uskutečnit například pomocí adsorpce, iontovou výměnou nebo přímou kovalentní vazbou. I přes nižší cytotoxicitu ve srovnání s klasickými fotosenzibilizátory lze říci, že imobilizované formy by se mohly stát jejich zajímavou alternativou, zejména v oblasti dezinfekce pitné vody nebo aditiv do nátěrových hmot. [4, 10, 34]

Podrobněji se možnostmi imobilizovaných organických fotosenzibilizátorů zabývá Spangul a kol. [36].

## 5.5 Fotosenzibilizátory v medicíně

Fotosenzibilizátory používané ve fotomedicínských aplikacích jsou většinou látky s porfyrinoidní strukturou. Důvodem je jejich podobnost s přírodními porfyriny, které často tvoří aktivní místa biomolekul a vykazují dobré fotochemické vlastnosti. Fotosenzibilizátor určený k použití ve fotomedicínských aplikacích musí splňovat několik důležitých parametrů [1, 2, 9]:

- i) Vhodná absorpce fotosenzibilizátoru – vysoká absorpce v oblasti vlnových délek tzv. „terapeutického okna“ (600–1070 nm, oblast s nejhlubší penetrací tkáně) a naopak nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm (v této oblasti se může projevit nežádoucí fotosenzitizace pokožky).

- ii) Vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku  $\Phi_{\Delta}$ .
- iii) Selektivní retence<sup>1</sup> fotosenzibilizátoru v neoplastických tkáních.
- iv) Fotostabilita – musí být dostatečně stabilní vůči přímé fotodegradaci a oxidaci vznikajícím  $^1\text{O}_2$ .
- v) Nízká toxicita fotosenzibilizátoru.
- vi) Polarita fotosenzibilizátoru – polární (hydrofilní) fotosenzibilizátory mohou být aplikovány intravenózně, zatímco hydrofobní vyžadují aplikaci na nosičích.

Výzkum v oblasti fotochemicky aktivních látek neustále pokračuje. V odborných lékařských publikacích se lze nejčastěji setkat s jejich klasifikací na I., II. a případně III. generaci:

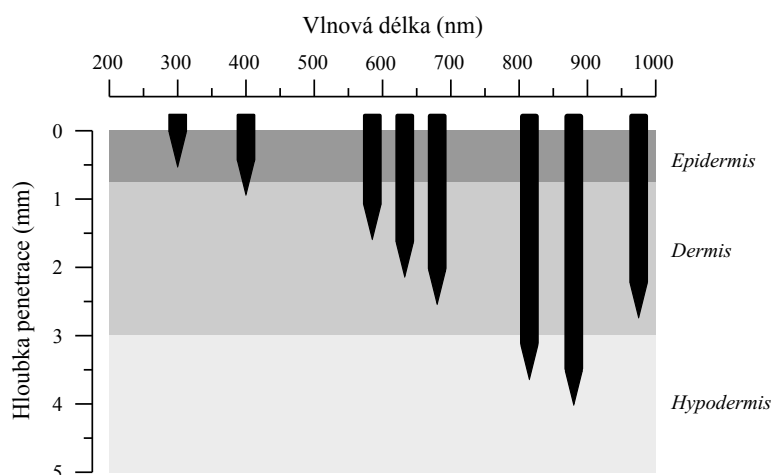
- **I. generace:** První generaci fotosenzibilizátorů představují deriváty hematoporphyrinu (HPD) s různým stupněm čistoty. Směsi obohacené o dimerní a oligomerní složky jsou používány při léčbě raných i pozdních stadií rakoviny plic, žaludku, kůže a dalších. Fotosenzibilizátory první generace mají při systémovém použití řadu omezení. U těchto látek není známá detailní chemická struktura a po intravenózní aplikaci vyvolávají kožní fotosenzitivitu v interakci se slunečním zářením. Reziduální množství fotosenzibilizátoru jsou detekována ještě za 75 dní. Dalším negativem je nutnost použití krátkovlnného světelného záření pro excitaci fotosenzibilizátoru, které špatně proniká do tkání. Příkladem nejrozšířenějšího fotosenzibilizátoru I. generace je Photofrin<sup>®</sup> (USA) – směs nekovových oligomerních porfyrinů. Můžeme se setkat i s jinými komerčními názvy tohoto fotosenzibilizátoru: Photocarcinorin (Čína), Photosan<sup>®</sup> (Německo), PHOTOGEM<sup>®</sup> (Rusko). [2, 14, 34, 38]
- **II. generace:** Od roku 1991 jsou předmětem vědeckého zájmu fotosenzibilizátory II. generace. Jejich přednostmi jsou nevýrazná kožní fotosenzitivita po léčbě, chemická čistota, v přítomnosti světla výrazná cytotoxicita, absorpční maximum v oblasti 650 nm až 800 nm a vysoký kvantový výtěžek fotochemického procesu. Mezi fotosenzibilizátory II. generace patří např. chloriny<sup>2</sup>, 5-aminolevulová kyselina (5-ALA) a ftalocyaniny. Ftalocyaniny mají aktivační vlnové délky v dlouhovlnné oblasti viditelného světla (670 nm až 700 nm) s větší penetrací do tkáně. Ve stadiu zkoumání jsou pheoforbidy a pyropheoforbidy s absorpčním maximem při 655 nm, které jsou izolovány z chlorofylu. Dále sem lze ještě zařadit purpuriny, naftalocyaniny a další. K registrovaným komerčně prodávaným fotosenzibilizátorům druhé generace patří např. Foscan<sup>®</sup> (temoporfin), Visudyne<sup>®</sup> (verteporfin) a Levulan<sup>®</sup> (ALA). [2, 34, 38]
- **III. generace:** Do této kategorie patří látky z předchozí generace, které jsou navázané na nosičích (nejčastěji biomolekulách) pro selektivnější dodávku fotosenzibilizátoru do tumorové tkáně. V současnosti jsou tyto látky předmětem intenzivního vědeckého zkoumání. [4]

<sup>1</sup>Schopnost zadržetí látky.

<sup>2</sup>Degradační produkty chlorofylu, které absorbují světlo o vlnových délkách 640 nm až 700 nm

## 6 Světelné zdroje

Historii vývoje světelných zdrojů pro fotosenzibilizační reakce kyslíku lze nejlépe zmapovat pomocí světelných zdrojů používaných ve fotodynamické terapii představující aplikačně nejstudovanější oblast. Typ světelného zdroje a způsob dodání energie jsou velmi důležité aspekty u fotosenzibilizačních aplikací. Optimální světelný zdroj musí být schopen dodat potřebnou energii fotosenzibilizátoru nutnou pro efektivní produkci singletového kyslíku. Osvit oblasti musí být stabilní, ideálně homogenní a reprodukovatelný. Spektrální charakteristika světelného zdroje tedy musí odpovídat jednomu z absorpčních maxim fotosenzibilizátoru k vyvolání fotoexcitace. Vzhledem k tomu, že tkáňová penetrace závisí na vlnové délce (*terapeutické okno* = 600–1 070 nm), musejí být vlnové délky vybrány tak, aby dostatečný počet fotonů dosáhl určitého místa zásahu. Ve viditelné oblasti spektra se vzrůstající vlnovou délkou narůstá i hloubka penetrace záření do tkáně. Světelné záření v oblasti 600–700 nm prostupuje do tkáně o 50–200 % efektivněji než světlo v oblasti 400–500 nm (obr. 6.1). Tyto požadavky posunuly vývoj světelných zdrojů pro PDT směrem k červené oblasti emisního spektra. S tím také samozřejmě souvisí vývoj nových fotosenzibilizátorů schopných efektivně absorbovat červené a infračervené světlo. Absorpce tkáně v oblastech mimo terapeutické okno je velmi neefektivní. V oblasti < 600 nm dochází k nežádoucí absorpci energie hemoglobinem a v oblasti > 1 000 nm světelné záření absorbuje z větší části voda ve tkáni. [7, 39, 40]



Obr. 6.1: Hloubka optické penetrace tkáně. |Převzato s úpravami z: [5]|

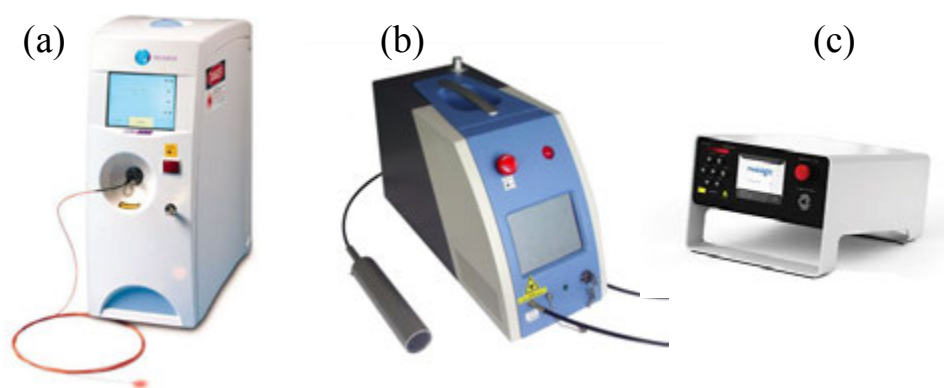
Ve fotodynamické terapii se lze setkat s těmito světelnými zdroji: lasery, širokospektrální zdroje (lampy, výbojky) a elektroluminiscenční diody (LED). V současné době je snaha kompletně nahradit lasery a širokospektrální zdroje právě elektroluminiscenčními diodami, které dokáží využít výhod obou typů nahrazovaných zdrojů. LED vynikají malou cenou, dlouhou životností, minimálním zahříváním, možností volby specifické vlnové délky, dobrou homogenitou a variabilní geometrií při plošném osvitu. [6, 8]

## 6.1 Lasery

Lasery jsou zdrojem velmi intenzivního monochromatického, lineárně polarizovaného a koherentního záření. K historicky prvním světelným zdrojům pro PDT byly využívány na konci sedmdesátých let *plynové argonové* a *kapalinové barvivové* lasery. Kapalinové lasery využívají jako aktivní prostředí různá barviva (např. Rhodamin 6G, Rhodamin B, Fluorescein atd.) rozpuštěné v lihu nebo destilované vodě. Jejich obrovskou výhodou je jejich možnost přeladění na jiné vlnové délky, lze tak stejný laserový zdroj využít pro excitaci různých fotosenzibilizátorů. K nevýhodám patří krátká životnost aktivního prostředí, které se vlivem tepla a světla rozkládá, velikost, potřeba účinného vodního chlazení a nízká spolehlivost. Výkon těchto laserů se pohybuje v rozmezí 10–500 mW/cm<sup>2</sup> s šířkou pásma 5–10 nm. Tyto typy laserů i přes dostatečný výkon a možnost ladění vlnových délek byly brzy nahrazeny pevnolátkovými lasery Nd:YAG, které vykazují lepší spolehlivost a jsou kompaktnější než lasery plynové (nepotřebují velké vodní chlazení). Aktivním prostředím u těchto laserů je izotropní krystal Yttrium Aluminium Granátu (Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>) dopovaný ionty neodymu (Nd<sup>3+</sup>). Typická vlnová délka záření emitovaného z Nd:YAG laseru je 1064 nm. Mohou být provozovány jak v pulzním, tak v kontinuálním režimu. Dalším vývojem laserové techniky byly tyto lasery nahrazeny kompaktními polovodičovými (diodovými) lasery. Polovodičové lasery mohou být využity v kontinuálním i pulzním režimu (délka pulzu od milisekund až po jednotky pikosekund). Šířka pásma emitovaného záření odpovídá typicky 6 nm s maximálním výstupním výkonem v jednotkách wattů. Polovodičové lasery jsou schopny pracovat od blízké UV oblasti spektra až po oblast infračervenou. Vzhledem k malým rozměrům, vysoké účinnosti a integrovatelnosti patří dnes mezi nejpoužívanější typy laserů nejen v medicíně. [7, 41]

**Výhody laserů:** vysoká účinnost, vysoký výkon, snadné navázání do tenkých optických vláken (endoskopy, katetry), monochromaticnost.

**Nevýhody laserů:** vyšší cena ve srovnání s LED, omezené použití pouze na jednu vlnovou délku, bezpečnostní opatření při manipulaci, náročnost obsluhy.



**Obr. 6.2:** Laserové zdroje pro PDT. (a) 630 PDT (630 nm, Diomed, USA); (b) Red PDT (635 nm, SinoLaser, Čína); (c) ML7710 (400–2000 nm, Modulight, Finsko).

## 6.2 Výbojky

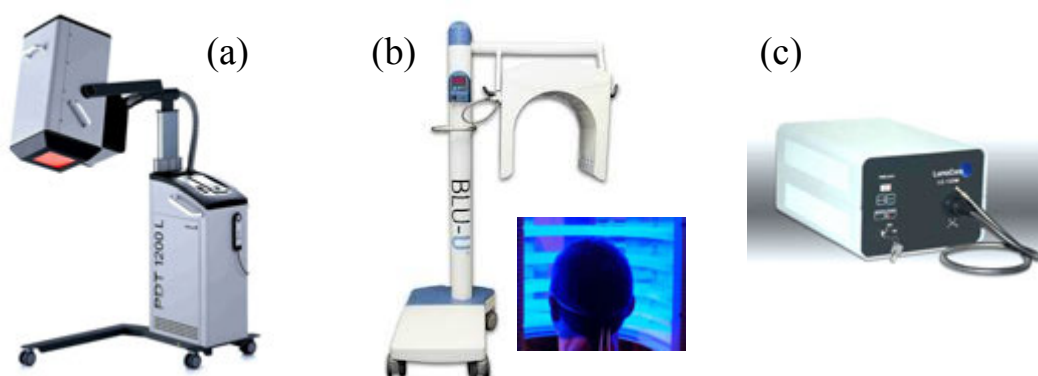
K dalším světelným zdrojům pro PDT lze zařadit širokospektrální zdroje – *výbojky*. Výbojové světelné zdroje jsou založené na principu elektrických výbojů v plynech a parách různých kovů. Ve srovnání s lasery emitují světlo v daleko větším rozsahu vlnových délek a mohou tak být použity pro excitaci více druhů fotosenzibilizátorů současně, nebo s nimi lze osvětlit více absorpčních maxim zvoleného fotosenzibilizátoru (využití Q pásů a Soretova pásu současně), a tím zvýšit účinnost fotosenzibilizační reakce. [41]

Ve fotodynamické terapii je nutné výbojky doplnit různými druhy filtrů. Jedná se především o pásmové interferenční filtry propouštějící pouze úzkou část spektra (např. 10 nm, narrowband), filtr typu horní propust (longpass) pro selektivní odstranění nežádoucích vlnových délek v ultrafialové oblasti spektra a teplotní absorpční filtr pro pohlcení infračervené složky záření, která by mohla způsobit nežádoucí ohřev ošetřované oblasti a také poškození optiky výbojky. Velkou výhodou výbojek je schopnost ozářit velkou plochu (desítky až stovky  $\text{cm}^2$ ), lze je spojovat do celků a vytvořit tak unikátní geometrii vyhovující dané aplikaci (obr. 6.3 (b) zobrazuje speciální uspořádání několika fluorescenčních výbojek do písmene U, které se využívá pro osvětlení celé tváře a hlavy při léčbě aktinické keratózy). Výbojky vzhledem ke kvalitě světelného výstupu, velikosti světelného paprsku a hustotě energie záření nelze efektivně navázat do optických vláken malých průměrů (není možné je využít v endoskopech jako lasery). Výbojky a lampy nalézají uplatnění zejména v dermatologii. [7, 41]

V klinické praxi se lze nejčastěji setkat s halogenovými výbojkami (350–850 nm, až  $250 \text{ mW/cm}^2$ ), xenonovými výbojkami (300–1200 nm, stovky  $\text{mW/cm}^2$ ), sodíkovými výbojkami (590–670 nm, 25–100  $\text{mW/cm}^2$ ) a fluorescenčními katodovými lampami (420 nm, 10  $\text{mW/cm}^2$ ). [7, 8, 41]

**Výhody výbojek:** jednoduchá obsluha, cena, manipulace, osvětlení velkých ploch.

**Nevýhody výbojek:** nízká intenzita vyzařovaného světla, výrazné zahřívání, obtížná regulace světelných dávek, nehomogenní plošný osvětlení.



**Obr. 6.3:** Výbojové zdroje pro PDT. (a) PDT 1200 L (halogenová výbojka, 600–720 nm,  $200 \text{ mW/cm}^2$ , Waldmann, Německo); (b) Blu-U (fluorescenční katodová lampa, 417 nm,  $10 \text{ mW/cm}^2$  DUSA, USA); (c) LC-122 (400–800 nm, až  $1000 \text{ mW/cm}^2$  LumaCare, USA).



### 6.3 Elektroluminiscenční diody

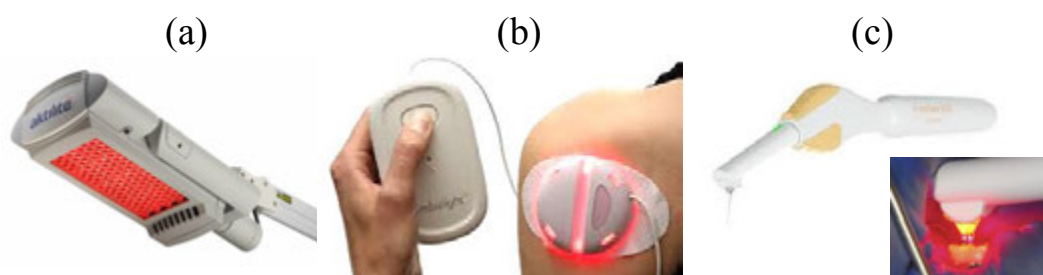
V posledních letech se jako vhodný alternativní světelný zdroj pro potřeby fotodynamické terapie ukázaly být elektroluminiscenční diody (LED) s nekoherentním monochromatickým optickým výstupem. LED pracují na principu injekční elektroluminiscence (přechod elektronu z vyšší energetické hladiny na nižší za současného uvolnění fotonu).

Pro klinické a laboratorní použití LED nabízejí celou řadu výhod. Jedná se zejména o možnost volby libovolných vlnových délek LED od ultrafialové oblasti (350 nm) až po oblast infračervenou (1 100 nm), dále jejich nízkou cenu ve srovnání s lasery a výbojkami, malou velikost, univerzálnost, životnost a bezpečnost při manipulaci. Elektroluminiscenční diody lze efektivně kombinovat, a tím vytvořit naprosto univerzální světelný zdroj schopný excitovat několik fotosenzibilizátorů současně. Pomocí několika desítek či stovek LED lze vytvořit celá diodová pole (LED Array) umožňující efektivní plošný osvit ošetřované plochy. Šířka pásma vyzařovaného světla se u LED pohybuje v rozmezí 10–30 nm s výkonem ve stovkách  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . Velikost ozařované plochy se může pohybovat v několika desítkách  $\text{cm}^2$ . Vzhledem k nízké energetické náročnosti některých LED lze světelné zdroje koncipovat s bateriovým napájením a vytvořit tak velmi snadno přenositelné zařízení s maximálním komfortem obsluhy. Hlavním nedostatkem je stále jejich nízká účinnost přeměny elektrické energie na světelnou srovnatelná s výbojkami (15–30 %), nicméně během několikaletého vývoje je snaha neustále optimalizovat parametry LED. [7, 41]

Vzhledem k rostoucí popularitě LED nejen v medicínských aplikacích (např. automobilový průmysl) lze očekávat, že vývoj výkonných LED s vysokou účinností bude značně urychlen vlivem poptávky po nových levných světelných zdrojích s dlouhou životností.

**Výhody LED:** cena, manipulace, univerzálnost, přenositelnost, osvit velkých ploch, bezpečnost při manipulaci, možnost kombinace několika LED s různou vlnovou délkou, životnost.

**Nevýhody LED:** stále nízká účinnost přeměny elektrické energie na světelnou.



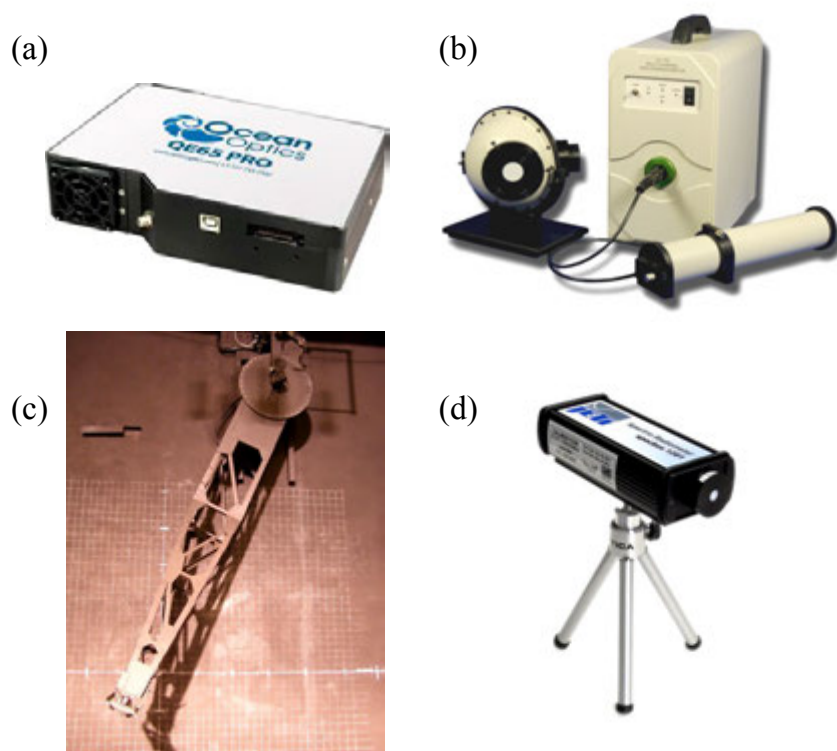
**Obr. 6.4:** LED zdroje pro PDT. (a) Stojanová lampa (dermatologie) Aktelite CL128 (128 LED, 633 nm, 70–100  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , Galderma, Velká Británie); (b) Přenosný systém Ambulight (dermatologie) (Ambicare, Skotsko); (c) Přenosný systém Fotosan (stomatologie) (620–640 nm, až 3 000  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , CMS Dental, Dánsko).

# 7 Experimenty

Cílem experimentální části je selekce vhodného organického materiálu (fotosenzibilizátoru), návrh světelného LED zdroje včetně řídicí jednotky a realizace laboratorních osvětlových jednotek pro efektivní generování reaktivních forem kyslíku prostřednictvím fotosenzibilizačních reakcí.

## a) Použité přístroje

- **Spektrometr QE65 PRO (*OceanOptics, USA*):** Kompaktní vláknový spektrometr s chlazeným 2D detektorem zajišťující vysokou kvantovou účinnost (až 90 %) a vysoký poměr signál/šum. Rozsah citlivosti detektoru 185–1 160 nm.
- **Systém pro testování a měření LED OL 770 (*Gooch & Housego, USA*):** Vysokorychlostní spektroradiometr určený speciálně pro měření LED, který splňuje všechny podmínky definované normou CIE 127.
- **Goniofotometr (*ČVUT FEL, ČR*):** Modernizovaný goniofotometr s řízeným natáčecím ramenem s úhlovým krokem 0,1 °.
- **Spektroradiometr Specbos 1201 (*JETI, Německo*):** Kompaktní VIS spektroradiometr určený pro radiometrická a kolorimetrická měření. Spektrální rozsah přístroje 380–780 nm.



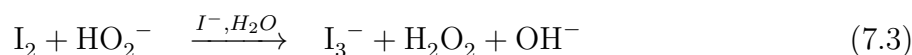
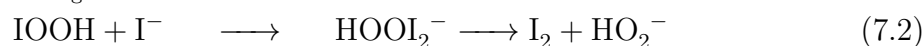
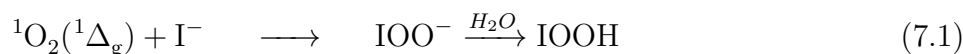
**Obr. 7.1:** Použité přístroje. (a) Spektrometr QE65 Pro (*OceanOptics, USA*); (b) Systém pro testování a měření LED OL 770 (*Gooch & Housego, USA*); (c) Goniofotometr s řízeným natáčecím ramenem (*FEL ČVUT, ČR*); (d) Radiometr Spechbos 1201 (*JETI, Německo*).

## b) Použitá detekční metoda

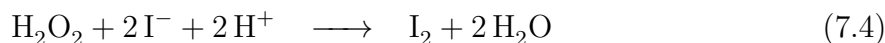
Z pohledu jednoduchosti a realizovatelnosti metody detekce produkce singletového kyslíku v laboratořích ZČU FEL byla jako vhodná metoda zvolena tzv. *jodometrická metoda* (podrobněji se detekčními metodami zabývá kap. 4).

Jedná se o chemickou metodu, která byla vyvinuta Mosingerem [42] pro měření produkce  $^1\text{O}_2$  generovaného prostřednictvím sulfo-derivátů porfyrinu ve vodném prostředí. Princip metody spočívá v reakci singletového kyslíku  $^1\text{O}_2$  s jodidem  $\text{I}^-$  za přítomnosti katalyzátoru molybdenanu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ . Výsledným produktem chemické reakce je trijodidový anion  $\text{I}_3^-$ , který lze sledovat v jeho absorpčním pásu při  $\lambda = 351$  nm. Množství vzniklého trijodidového anionu je přímo úměrné množství generovaného singletového kyslíku. [26]

Reakce probíhá podle následujícího mechanismu [26]:



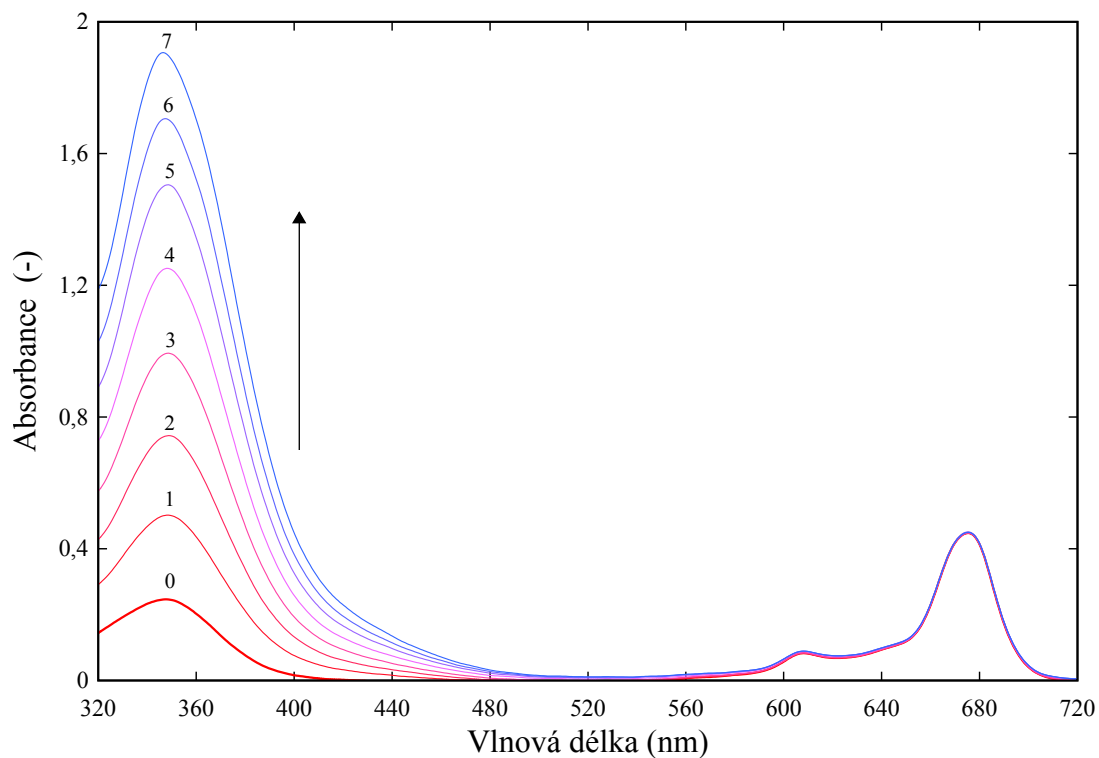
Ve slabě kyselém prostředí (pH = 6,2) v přítomnosti katalyzátoru molybdenanu amonného můžeme sledovat další chemickou reakci:



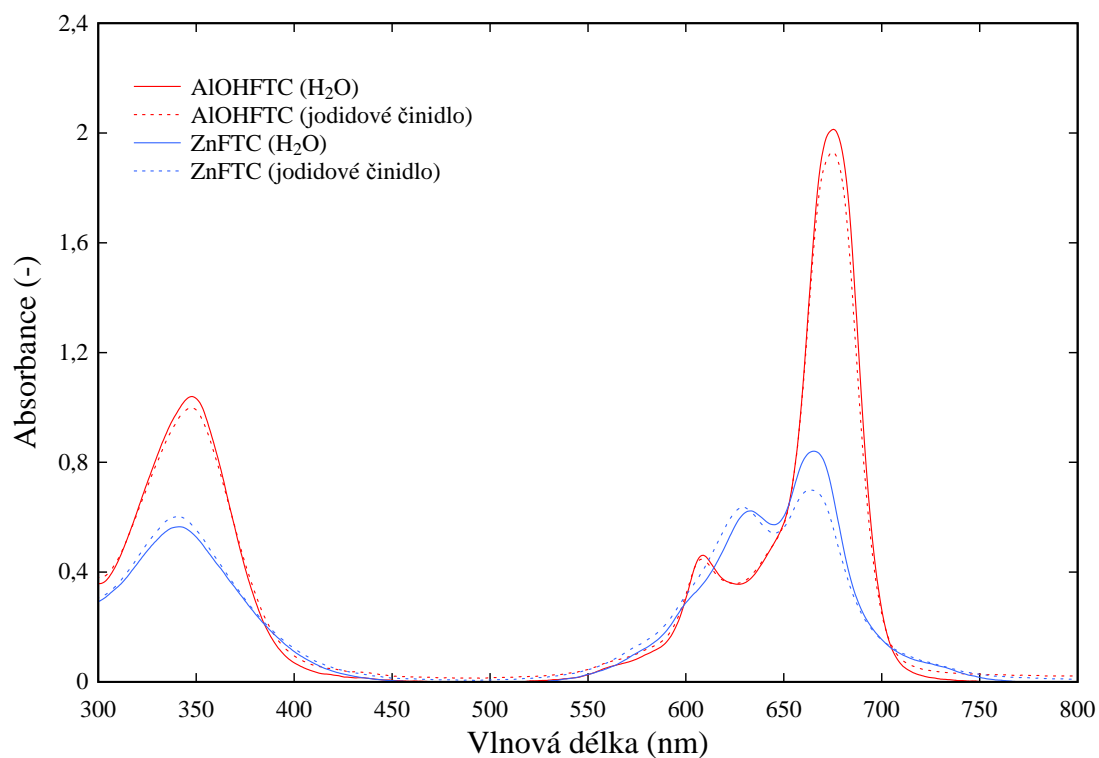
Poměr složek jodidového činidla je následující:

- 6,81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$
- 19,92 g KI
- 8,6 ml NaOH

Všechny složky se promíchají a doplní se deionizovanou vodou na objem 1 l. Do takto připraveného jodidového činidla se přidá zkoumaný vzorek ftalocyaninu a po jeho osvitlu se sleduje nárůst absorbance trijodidového anionu v oblasti  $\lambda = 351$  nm.



Obr. 7.2: Spektrální charakteristika ftalocyaninu AlOHFTC v jodidovém činidle v závislosti na počtu světelných pulzů (0–7 s).



Obr. 7.3: Absorpční spektra derivátů ftalocyaninů zinku a hliníku ve vodě a v jodidovém činidle.

## 7.1 Organický fotosenzibilizátor

Pro výběr organického materiálu byla stanovena následující kritéria:

- látka ze skupiny II. generace fotosenzibilizátorů,
- efektivní absorpce v rozsahu vlnových délek 600–1 070 nm (terapeutické okno),
- značná stabilita,
- odolnost vůči fotodegradaci,
- nízká toxicita.

V rámci úzké spolupráce s výzkumným ústavem Centra organické chemie byla syntetizována skupina organických látek na bázi ftalocyaninů a jejich derivátů. Pozornost byla zaměřena zejména na ftalocyaniny s diamagnetickým kovovým iontem ( $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ ), které dosahují značných kvantových výtěžků díky dlouhé době života tripletových stavů. Rozhodujícím faktorem pro selekci těchto látek byla jejich velká modifikovatelnost, jejich výrazná absorpce v oblasti červeného světla a v neposlední řadě jejich zdravotní nezávadnost.

V této kapitole je zaveden parametr  $D_r$ , který představuje relativní poměr dimerů a monomerů u zkoumané látky [23]:

$$D_r = \frac{A_{\lambda_{MAX}}}{A_{\lambda_{630}}} \quad (7.6)$$

kde  $A_{\lambda_{MAX}}$  je maximální hodnota absorpance pásu odpovídající monomerní formě látky a  $A_{\lambda_{630}}$  představuje hodnotu absorpance pásu odpovídající formám dimerním (u ftalocyaninů je tento pás oblasti v 630 nm). V případě vysoké koncentrace dimerů je koeficient  $D_r$  nízký.  $D_r$  roste s klesajícím poměrem dimerů vůči monomerům. Tento koeficient si lze představit jako míru potlačení dimerizace molekul. [23]

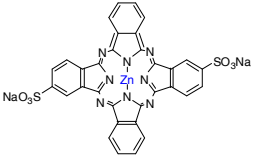
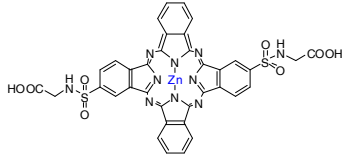
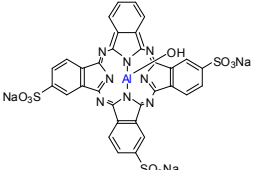
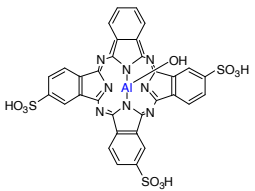
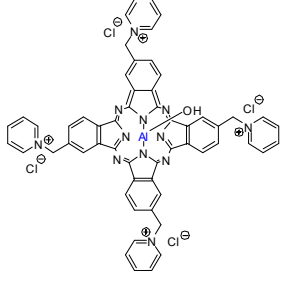
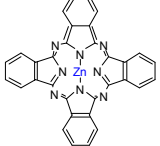
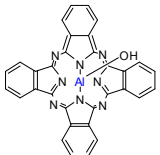
### 7.1.1 Absorpční spektra vybraných ftalocyaninů

Byly připraveny zásobní roztoky testovaných ftalocyaninů (tab. 7.1) o koncentraci 4 mg/l v jodidovém činidle. Pro měření bylo použito 2 ml roztoku ftalocyaninu, křemenné kyvety (délka optické dráhy 1 cm), magnetické míchadlo a zkonstruovaný laboratorní fotoreaktor GSO-1 (kap. 7.3.1). Absorpční spektrum vzorků bylo měřeno bezprostředně po jeho ozáření. Sledována byla absorpance trijodidového aniontu ( $\lambda_{I_3^-} = 351$  nm) vycházející z jodometrické detekční metody. Celková dávka záření byla stanovena na  $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , aby při ozáření vzorku ftalocyaninu produkujícího nejvyšší množství singletového kyslíku nedošlo k absorpaci trijodidu při 351 nm vyšší než 2. V této kapitole je zaveden zjednodušující symbol  $A_{XXX}$ , který představuje hodnotu absorpance zkoumané látky při dané vlnové délce (např.  $A_{334}$  představuje hodnotu absorpance při vlnové délce  $\lambda = 334$  nm).

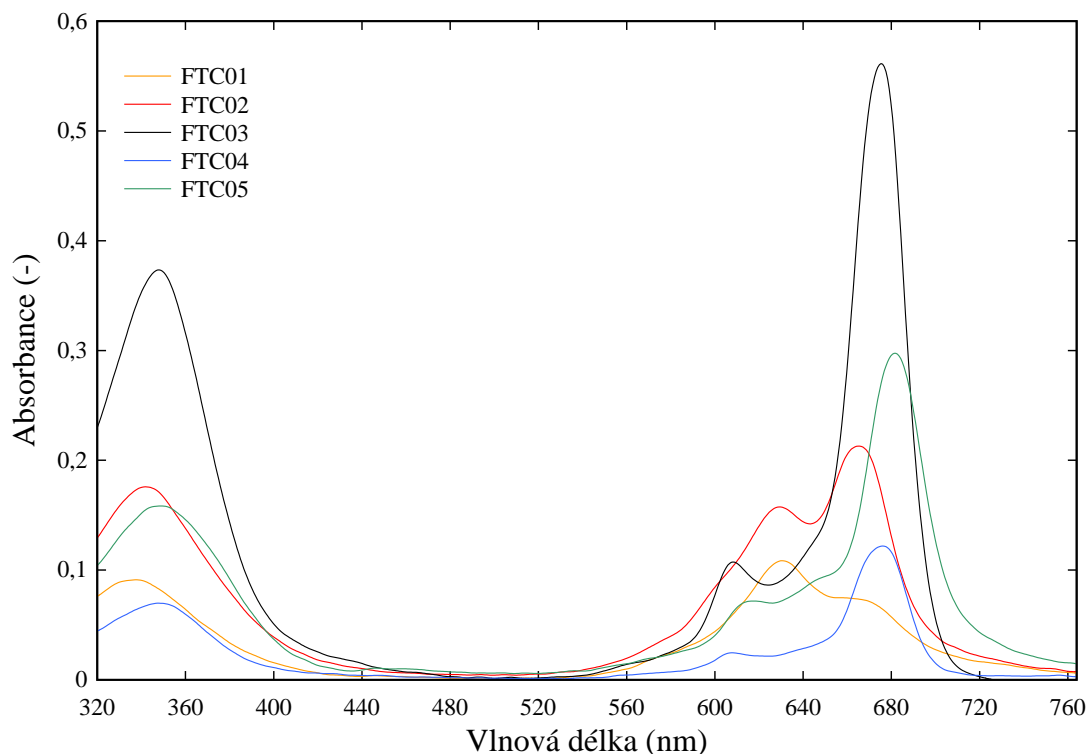
#### a) Před ozářením

Vzhledem k velice obtížné rozpustnosti nesubstituovaných ftalocyaninů s centrálním atomem zinku (FTC06) a hliníku (FTC07), byly tyto sloučeniny upraveny pomocí dispergátorů jako disperze ve vodném prostředí o velikosti částic 100–200 nm. Ve spektrech

**Tab. 7.1:** Testované druhy ftalocyaninových derivátů.

Vzorek	Popis vzorku	Chemická struktura
FTC01	Sulfonovaný ZnFTC(SO <sub>3</sub> Na) <sub>2</sub>	
FTC02	ZnFTC(SO <sub>2</sub> glycin)	
FTC03	AlOHFTC(SO <sub>3</sub> Na) <sub>2</sub>	
FTC04	Sulfonovaný AlOHFTC	
FTC05	Tetrakismethylpyridinium chlorid AlOHFTC	
FTC06	ZnFTC, nanodisperze	
FTC07	AlOHFTC, nanodisperze	

těchto vzorků nebyly zaznamenány zřetelné absorpční pásy a proto nebyly zahrnuty ve společných grafech.



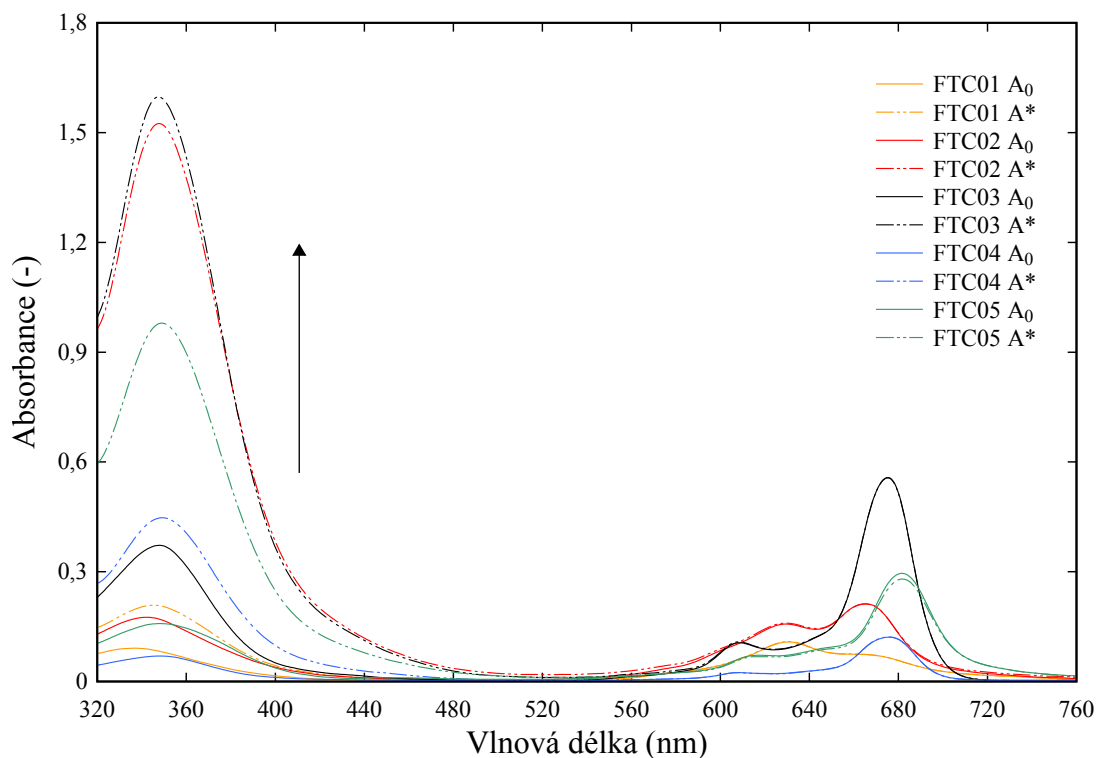
**Obr. 7.4:** Absorpční spektra vybraných vzorků ftalocyaninů v jodidovém činidle před ozářením.

**Závěr** U sulfonovaného  $\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_2$  (FTC01) byly nalezeny 3 absorpční pásy:  $A_{334} = 0,091$ ,  $A_{630} = 0,109$  a  $A_{662} = 0,074$ . Vzhledem k tomu, že pás u  $\lambda = 662$  nm je nižší než u  $\lambda = 630$  nm ( $D_r = 0,679$ ), lze očekávat, že výtěžek singletového kyslíku bude malý. Reakcí glycinu a sulfonovaného  $\text{ZnFTC}$  byl získán odpovídající amid –  $\text{ZnFTC}(\text{SO}_2 \text{ glycin})$  (FTC02). U tohoto vzorku je v absorpčním spektru poměr absorpčních pásů u  $\lambda = 665$  nm a  $\lambda = 630$  nm příznivější ( $D_r = 1,357$ ) než u sulfonovaného  $\text{ZnFTC}$ . Z toho lze usuzovat, že výtěžek singletového kyslíku bude vyšší než u předchozího vzorku. Nevýhodou ovšem je, že získání této sloučeniny vyžaduje další reakční krok. Absorpční pásy u tohoto vzorku jsou:  $A_{342} = 0,176$ ,  $A_{630} = 0,157$  a  $A_{665} = 0,213$ . Další dva měřené vzorky se liší pouze v tom, že sulfonovaný  $\text{AlOHFTC}$  (FTC04) je směs sulfokyselin a  $\text{AlOHFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_2$  (FTC03) je ve formě sodné soli těchto kyselin. Z naměřených spekter lze vyčíst, že obě sloučeniny výrazně absorbují světlo vlnové délky  $\lambda = 675$  nm. Dalším charakteristickým absorpčním pásem ve viditelné oblasti spektra je pás  $\lambda = 607$  nm. Poměr dimerní a monomerní složky u obou materiálů je výrazně posunut ve prospěch monomerní formy (6,165 u sulfokyselin a 5,304 u sodné soli). Z toho lze usuzovat, že při ozáření vzorků světlem o vlnové délce blízké 676 nm bude výtěžek singletového kyslíku velmi vysoký. Vzorek FTC04 vykazoval velmi malou rozpustnost. U vzorku tetrakisdimethylpyridinium chloridu  $\text{AlOHFTC}$  (FTC05) bylo naměřeno:  $A_{348} = 0,158$ ,  $A_{630} = 0,072$  a  $A_{682} = 0,297$ . I u tohoto vzorku byl pozorován výrazný rozdíl hodnot absorpance u absorpčních pásů  $\lambda = 682$  nm a  $\lambda = 630$  nm ( $D_r = 4,125$ ).



## b) Po ozáření

Neozářený vzorek nese v absorpčních spektrech (obr. 7.5) označení  $A_0$  a v grafu mu odpovídá plná čára, zatímco vzorky po ozáření jsou označeny  $A^*$  a v grafu jim odpovídá čerchovaná čára se dvěma tečkami. Nejvyšší množství singletového kyslíku vzniká u vzorku, kde je rozdíl před a po ozáření v oblasti absorpce trijodidového aniontu ( $\lambda = 351$  nm) mezi  $A_0$  a  $A^*$  největší. Změna absorpance v oblasti 351 nm je přímo úměrná zvýšení koncentrace trijodidu v reakční směsi. Na počátku reakce je koncentrace trijodidu rovna nule, v oblasti  $\lambda = 351$  nm sledujeme pouze Soretův pás daného ftalocyaninu.



**Obr. 7.5:** Absorpční spektra vybraných vzorků ftalocyaninů v jodidovém činidle před ( $A_0$ ) a po ( $A^*$ ) ozáření.

**Tab. 7.2:** Produkce singletového kyslíku u vybraných vzorků ftalocyaninu.

Vzorek	$A_0$	$A^*$	$\Delta (A^* - A_0)$
FTC01	0,090	0,215	0,125
FTC02	0,171	1,522	<b>1,351</b>
FTC03	0,396	1,633	<b>1,237</b>
FTC04	0,109	0,450	0,341
FTC05	0,171	0,995	0,824

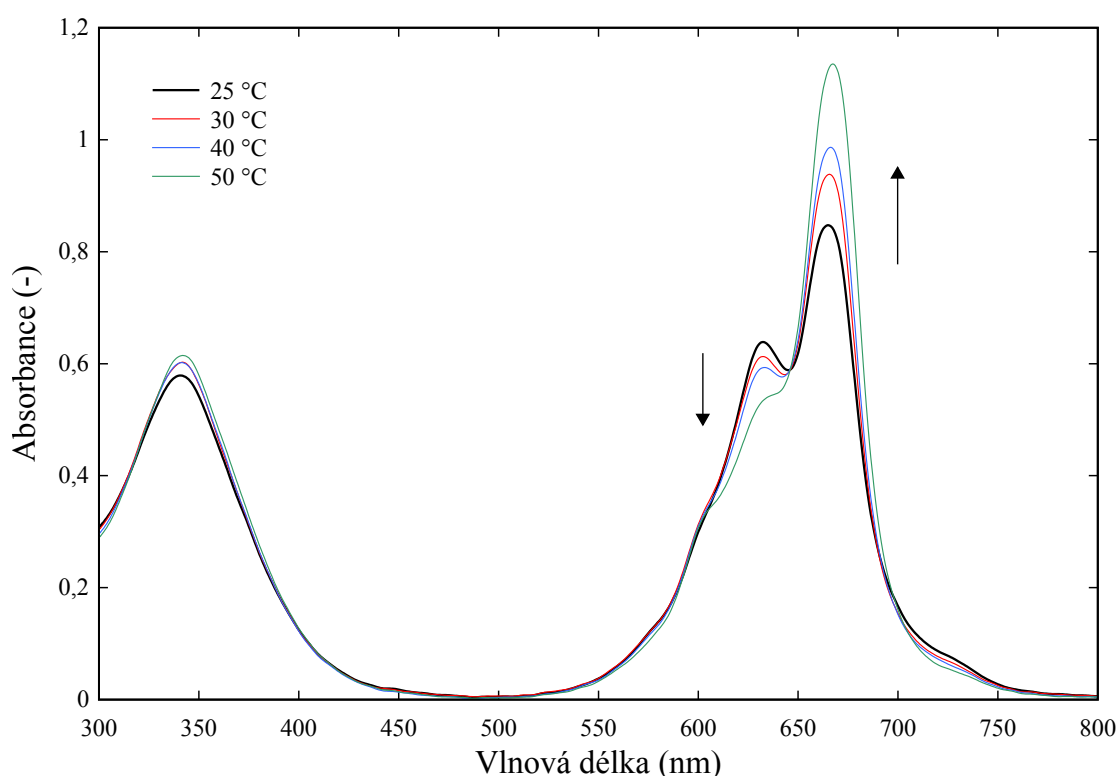
**Závěr** Z tab. 7.2 vyplývá, že největší množství singletového kyslíku za daných podmínek vzniká u vzorků FTC02 a FTC03. Tyto dva vzorky byly vybrány pro další experimenty.

## 7.1.2 Stabilita fotosenzibilizátoru

Po předchozím výběru dvou vzorků ftalocyaninů (vzorek FTC02 a FTC03) je nyní důležité zjistit teplotní závislost fotosenzibilizátoru a také stanovit míru degradace při dlouhodobé světelné expozici.

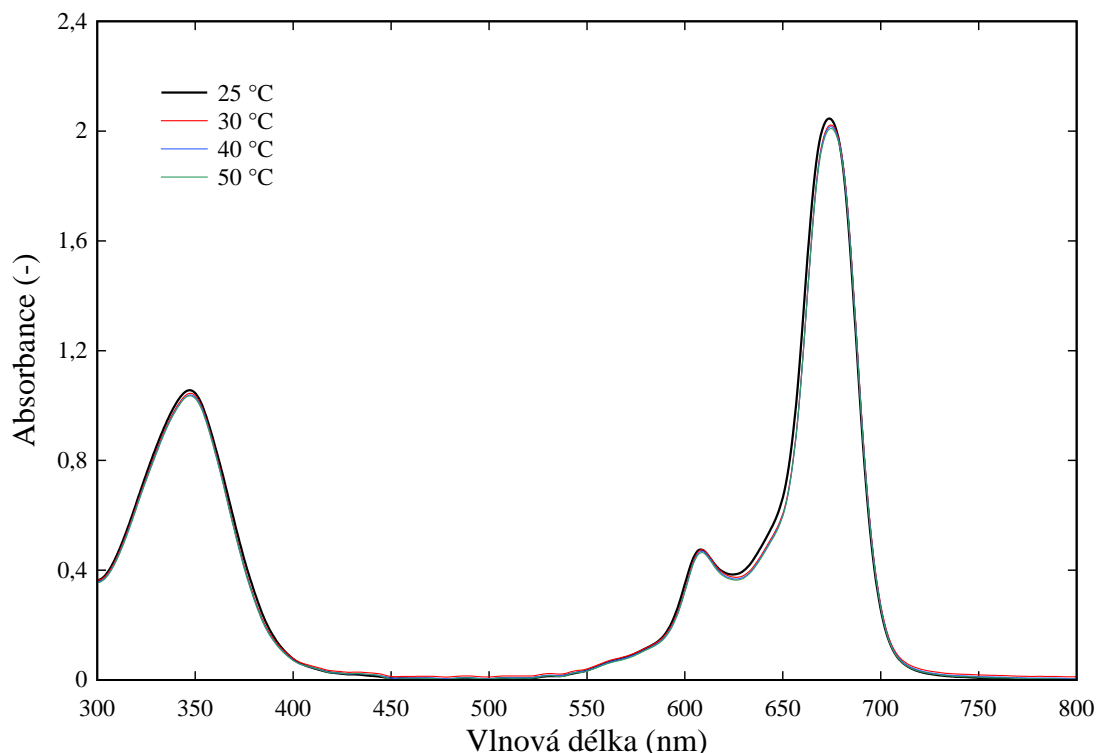
### a) Teplotní závislost

Pro měření byly použity vodné roztoky FTC02 a FTC03 o koncentraci  $c = 16,04$  mg/l. Zásobní roztok byl ohříván za stálého míchání na teplotu  $55$  °C. Do křemenné kyvety bylo nadávkováno 2 ml ohřátého roztoku. Kyveta byla umístěna do spektrometru a za stálého míchání bylo odečítáno absorpční spektrum roztoku při teplotách  $50$  °C,  $40$  °C,  $30$  °C a  $25$  °C.



**Obr. 7.6:** Teplotní závislost vzorku FTC02 ve vodě.

**Závěr** Z obr. 7.6 je patrné, že v absorpčním spektru ftalocyaninu FTC02 dochází při rozdílných teplotách ke změnám: s přibývajícím teplotou roztoku sledujeme nárůst nejen Soretova pásu, ale také se vlivem vyšší teploty mění poměr dimerní a monomerní složky ve prospěch monomerní složky, což je příznivý jev, neboť se zvyšuje kvantový výtěžek singletového kyslíku. Vzorek ftalocyaninu FTC03 je v měřeném rozsahu teplot velmi stabilní (obr. 7.7).

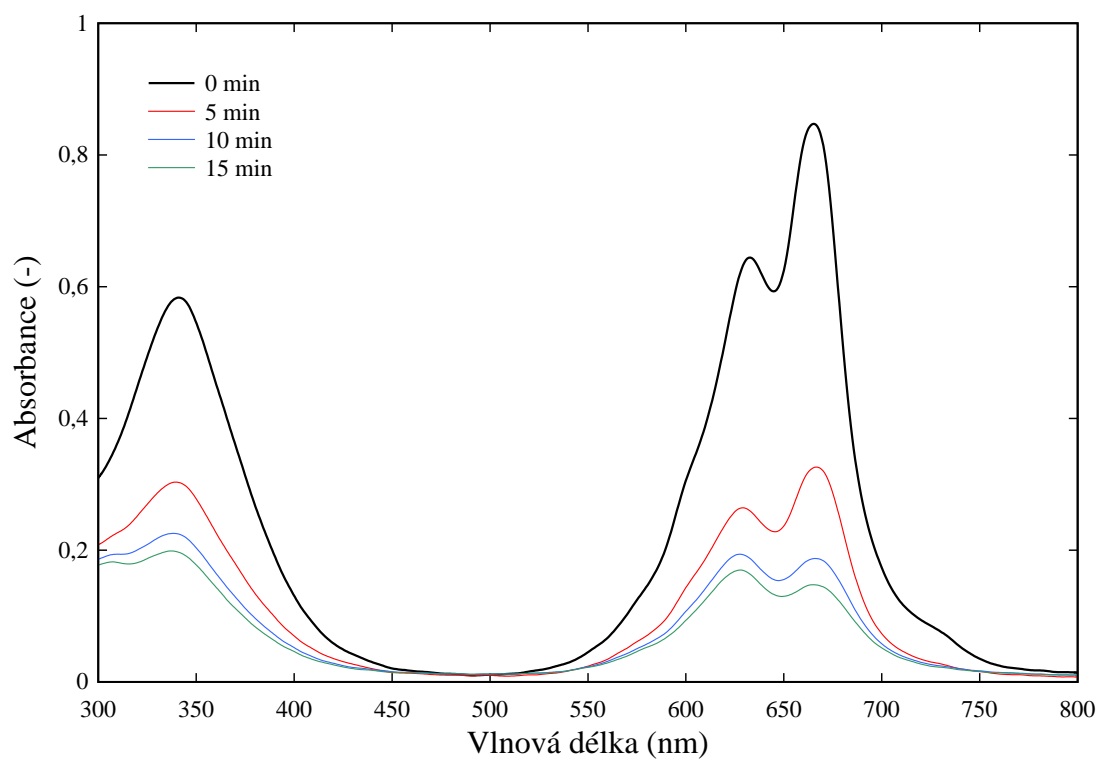


**Obr. 7.7:** Teplotní závislost vzorku FTC03 ve vodě.

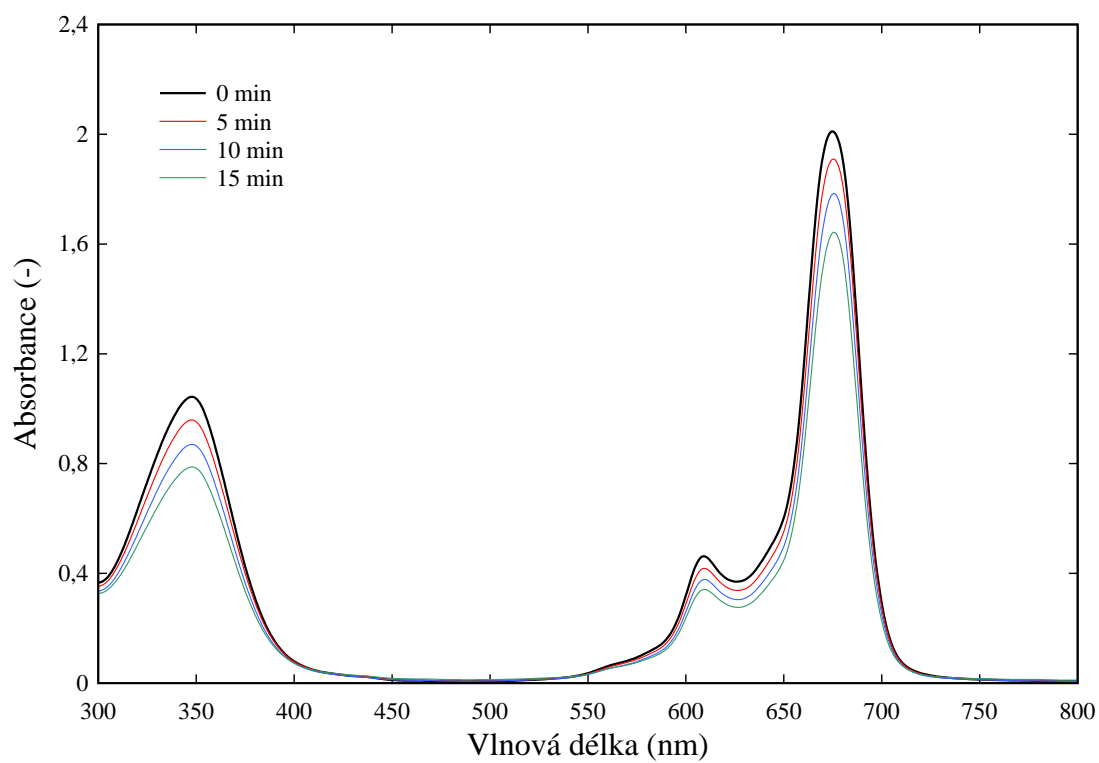
### b) Degradace materiálu

Pro měření byly použity vodné roztoky FTC03 a FTC02 o koncentraci  $c = 16,04 \text{ mg/l}$ . Měření probíhalo za stálého míchání v křemenné kyvetě, do které bylo nadávkováno 2 ml zásobního vzorku ftalocyaninu. Kyveta byla ozářena v laboratorním fotoreaktoru GSO-1 po dobu 5 min. při 100% výkonu diod. Poté byla kyveta vložena do spektrometru a bylo odečteno spektrum. Tento proces se opakoval ještě dvakrát. Celková dávka záření byla stanovena na  $2380 \text{ J.cm}^{-2}$ .

**Závěr** Z obr. 7.8 lze vypořadovat ztelný rozpad materiálu FTC02 již při 5minutové světelné expozici odpovídající dávce  $792 \text{ J.cm}^{-2}$  (pokles absorbance při  $\lambda = 665 \text{ nm}$  na  $\sim 39 \%$  původní hodnoty). Vzorek ftalocyaninu č. FTC03 vykazuje větší odolnost proti fotodegradaci (obr. 7.9) než FTC02, a proto byl ještě proveden dlouhodobější test s větším objemem látky (50 ml) v kruhovém fotoreaktoru (kap. 7.3.2) při delší světelné expozici. Výsledky prokázaly velmi malý pokles absorbance monomerní složky ( $\lambda = 675 \text{ nm}$ ) po 60 minutách kontinuálního ozařování (celková dávka záření odpovídá  $9,5 \text{ kJ.cm}^{-2}$ ). Degradace vzorku č. FTC03 byla stanovena jako 10% úbytek materiálu za 60 minut trvalé světelné expozice.



Obr. 7.8: Degradace vzorku FTC02.



Obr. 7.9: Degradace vzorku FTC03.

### 7.1.3 Agregace fotosenzibilizátoru

Agregace, v případě ftalocyaninových derivátů, je způsobena koplanární interakcí řetězců, kde se z monomerních forem utváří dimery a struktury vyšších řádů. Pro fotosenzibilizační reakce je tvorba dimerů nežádoucím jevem, neboť se těchto reakcí neúčastní. V literatuře je uvedeno několik způsobů, jak agregaci potlačit [43]:

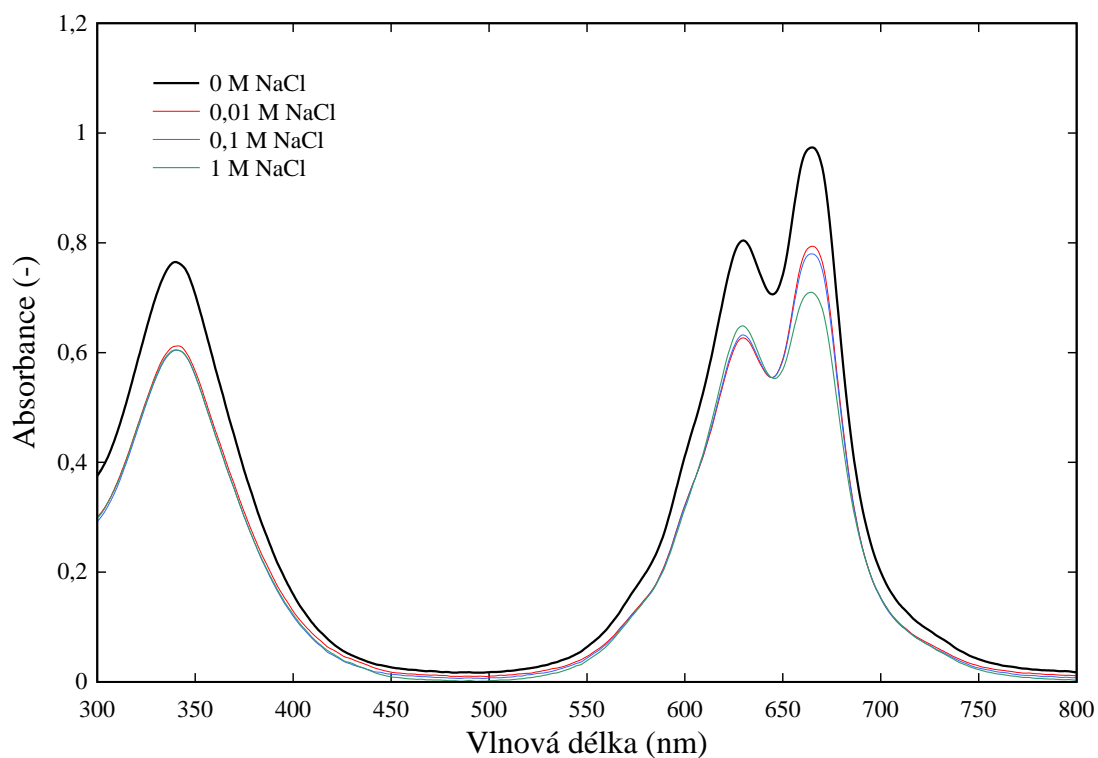
- Zvýšením iontové síly roztoku pomocí anorganických solí (KCl, NaCl) – dochází ke zvýšení rozpustnosti. Přidaná sůl redukuje přitažlivé síly mezi opačně nabitými skupinami.
- Použitím polárních rozpouštědel s vysokou dielektrickou konstantou (DMF, DMSO).
- Zvýšením pH roztoku.
- Přidáním ve vodě rozpustných organických rozpouštědel do vodného roztoku (DMF, pyridin, EtOH).

Kapitola se zabývá vlivem přídavku anorganických solí a ethanolu na agregaci vybraných vodných roztoků ftalocyaninových derivátů FTC02 a FTC03. Poměr dimerní a monomerní složky u ftalocyaninů rozpuštěných ve vodě před ověřovacími experimenty je pro vzorek FTC02  $D_r = 1,20$  a pro vzorek FTC03  $D_r = 6,165$ .

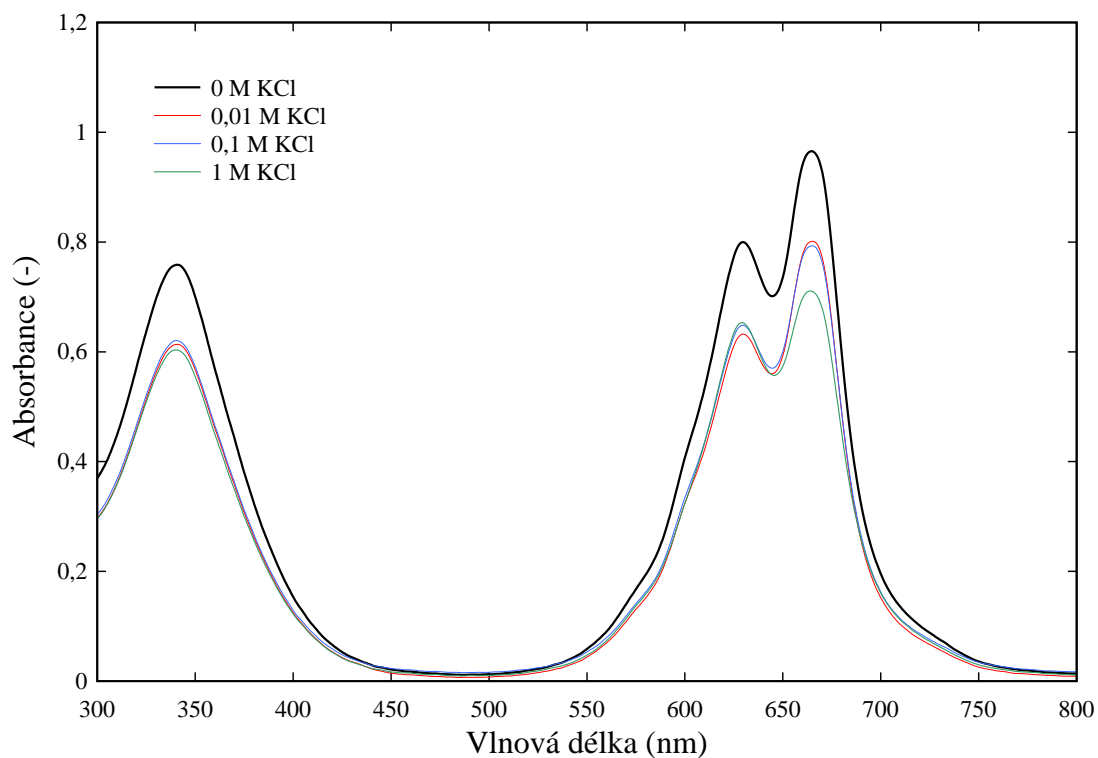
#### a) Přidání NaCl a KCl

Pro měření byly použity vodné roztoky FTC02 a FTC03 o koncentracích  $c = 18,3$  mg/l a  $c = 16,9$  mg/l. Měření probíhalo za stálého míchání v křemenné kyvetě, do které bylo nadávkováno 2 ml zásobního vzorku ftalocyaninu a bylo přidáno 500  $\mu$ l anorganické soli (NaCl, KCl) o koncentracích 0,01 M; 0,1 M a 1 M.

**Závěr** Z výsledných absorpčních spekter vzorku FTC02 (obr. 7.10, obr. 7.11) můžeme pozorovat, že dochází k drobným změnám ve spektru. V obou případech se koeficient  $D_r$  nepatrně snižuje. U vzorku FTC03 byl pozorován shodný pokles všech absorpčních pásů, který byl způsoben pouze zředěním roztoku vlivem přidání roztoku NaCl a KCl. Proto není jeho absorpční spektrum uvedeno.



Obr. 7.10: Vliv přidavku NaCl na změnu spektra vzorku FTC02.

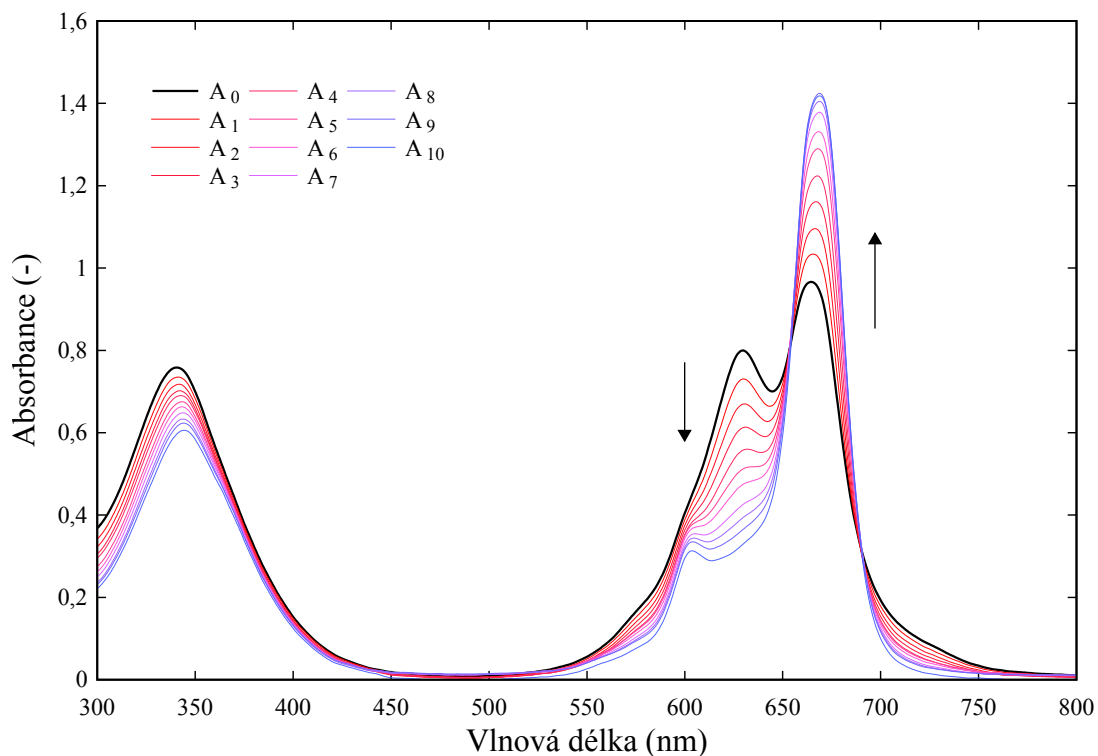


Obr. 7.11: Vliv přidavku KCl na změnu spektra vzorku FTC02.

## b) Přidání EtOH

Pro měření byly použity vodné roztoky FTC02 a FTC03 o koncentracích  $c = 18,3 \text{ mg/l}$  a  $c = 16,9 \text{ mg/l}$ .

Měření probíhalo za stálého míchání v křemenné kyvetě, do které bylo nadávkováno 2 ml zásobního vzorku ftalocyaninu a postupně byly přidány dávky EtOH s krokem 100  $\mu\text{l}$  až do celkové hodnoty 1 ml ( $10 \times 100 \mu\text{l}$ ).



**Obr. 7.12:** Vliv přídavku EtOH na změnu spektra vzorku FTC02.

**Tab. 7.3:** Koeficient  $D_r$  u vzorku FTC02 v závislosti na přídavcích EtOH.

Absorpční spektrum	Přídavek EtOH ( $\mu\text{l}$ )	$D_r$	Nárůst $D_r$ oproti $A_0$
$A_0$	0	1,20	1,00 $\times$
$A_1$	100	1,41	1,18 $\times$
$A_2$	200	1,63	1,36 $\times$
$A_3$	300	1,90	1,58 $\times$
$A_4$	400	2,19	1,83 $\times$
$A_5$	500	2,51	2,10 $\times$
$A_6$	600	2,81	2,34 $\times$
$A_7$	700	3,23	2,69 $\times$
$A_8$	800	3,55	2,96 $\times$
$A_9$	900	3,88	3,23 $\times$
$A_{10}$	1000	4,29	3,58 $\times$

**Závěr** Z výsledného absorpčního spektra vzorku FTC02 (obr. 7.12) můžeme pozorovat, že přidavkem EtOH do roztoku se agregace ftalocyaninu potlačuje, neboť dochází k zřetelným změnám poměru dimerní a monomerní složky. Míra potlačení dimerizace pro tento vzorek v průběhu experimentu je podrobně stanovena v tab. 7.3. V případě celkové dávky EtOH 1 ml do roztoku odpovídá poměr monomer/dimer hodnotě 4,29 (3,58násobek původní hodnoty). U vzorku FTC03 v průběhu celého experimentu nedocházelo k disbalanci mezi dimerní a monomerní složkou. Opět byl pozorován pouze postupný pokles všech absorpčních pásů, který byl způsoben pouze zředěním roztoku vlivem přísadků EtOH. Výsledné spektrum proto není uvedeno.

#### 7.1.4 Toxicita ftalocyaninových derivátů

Toxicita ftalocyaninových derivátů FTC02 a FTC03 byla testována na pracovišti COC v rámci výzkumných prací týkajících se jeho lékové formy pro humánní použití. Byla provedena celá řada toxikologických testů, jejichž výsledky lze sumarizovat následovně: při intravenózním podání je maximální tolerovaná dávka u myši 280 mg/kg, u potkanů 250 mg/kg. Toxikologická studie trvající 28 dní neprokázala změny v krevním obraze, biochemické vyšetření neprokázalo změny.

Hlavním rozkladným produktem derivátů ftalocyaninu jsou kyselina ftálová a ftalimid.

- *Kyselina ftálová*: (a) akutní toxicita:  $LD_{50}^1 > 5000$  mg/kg (myš, orálně); (b) dráždivost: není dráždivý (králík, kůže), velmi dráždivý (králík, oko).
- *Ftalimid*: (a) akutní toxicita:  $LD_{50} = 5000$  mg/kg (myš, orálně); (b) dráždivost: není dráždivý (králík, kůže), není dráždivý (králík, oko).

U ftalocyaninových derivátů ani u jeho rozkladných produktů nejsou prokázány žádné toxické účinky na vyšší organismy. Testovaná látka není hepatotoxická<sup>2</sup> ani nefrotoxická<sup>3</sup>.

#### 7.1.5 Zhodnocení výběru materiálu

Vzorek ftalocyaninu FTC02 – sulfoglycinový derivát ftalocyaninu zinku (ZnFTC) – vyžaduje v porovnání s FTC03 dodatečný syntetizační krok, s čímž souvisí vyšší cena a vyšší náročnost přípravy látky. V základní podobě sice dosahuje tento materiál o něco vyšší fotosenzibilizační aktivity ve srovnání s FTC03, ale podléhá mnohem rychlejší fotodegradaci. Bylo zjištěno, že fotosenzibilizační aktivitu lze u tohoto materiálu ještě zvýšit pomocí ohřevu nebo přidáním etanolu. Nicméně, při použití fotosenzibilizátoru ve fotodynamické terapii maligních nádorů, kde se aplikuje fotosenzibilizátor přímo do krevního řečiště pacienta, je přidavek etanolu nemožný.

Na základě provedených experimentů byl jako nejvhodnější organický materiál pro fotosenzibilizační reakce zvolen vzorek ftalocyaninu FTC03 – sodná sůl sulfonovaného hydroxyhlinitého derivátu ftalocyaninu (AlOHFTC), který vykazoval výbornou teplotní stabilitu a značnou odolnost proti fotodegradaci.

<sup>1</sup> $LD_{50}$  – smrtelná dávka podaná testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin od expozice. Udává se v mg/kg živé hmotnosti.

<sup>2</sup>Nepoškozuje játra.

<sup>3</sup>Nepoškozuje ledviny.



## 7.2 Světelný LED zdroj

### 7.2.1 Parametry zdroje záření

Pro výběr elektroluminiscenční diody vzhledem ke zvolenému fotosenzibilizátoru (sulfovaný derivát ftalocyaninu hliníku) byla stanovena následující kritéria:

- emisní spektrum využívající maximum absorpčního spektra zvoleného fotosenzibilizátoru,
- vysoký zářivý tok (stovky mW),
- vysoká účinnost přeměny energie ( $> 20 \%$ ),
- cena a dostupnost.

Ke sledovaným parametrům LED patří zejména:

- *Napětí v propustném směru*  $U_F$  (V) – trvalé napětí, při kterém dioda emituje světelné záření, je závislé na použitém materiálu a teplotě.
- *Proud v propustném směru*  $I_F$  (A) – trvalý proud, při kterém dioda emituje světelné záření.
- *Příkon*  $P$  (W) – elektrický příkon diody, který se stanoví jako:

$$P = U_F \cdot I_F \quad (7.7)$$

- *Zářivý tok*  $\Phi_e$  (W) – celková vyzářená energie  $Q_e$  (J) za jednotku času:

$$\Phi_e = \frac{dQ_e}{dt} \quad (7.8)$$

- *Intenzita záření*  $I_e$  ( $W \cdot m^{-2}$ ) – zářivý tok procházející plochou kolmou k ose šíření, jedná se tedy o plošnou hustotu zářivého toku:

$$I_e = \frac{d\Phi_e}{dS} \quad (7.9)$$

- *Vlnová délka*  $\lambda_g$  (m) – vztažená k energii zakázaného pásu  $E_g$ :

$$\lambda_g = \frac{hc}{E_g} \quad (7.10)$$

- *Účinnost*  $\eta$  (%) – s ohledem na příkon diody lze její účinnost stanovit jako:

$$\eta = \frac{\Phi_e}{U_F \cdot I_F} \quad (7.11)$$

- *Vyzařovací úhel*  $2\Theta_{1/2}$  ( $^\circ$ ) – úhel sevřený s centrální osou vyzařování světelného zdroje, kde velikost relativní intenzity světelného zdroje dosahuje hodnoty 50 %.

## 7.2.2 Výběr zdroje záření

Na základě stanovených kritérií byla provedena rešerše výkonných LED s maximem emisního spektra ( $\lambda_P$ ) v oblasti vlnových délek od 660 do 680 nm (*deep red*). Ukázalo se, že nabídka LED s dostatečným světelným výkonem v této oblasti vlnových délek není nijak pestrá. Celkem byly vybrány čtyři typy diod od výrobců Epitex a LEDEngin. Vybrané elektro-optické parametry vtipovaných LED jsou prezentovány v tab. 7.4.

Ke změření spektrálních charakteristik byl použit spektrometr QE65Pro s kosinovým korektorem umožňující sběr světla v úhlu  $180^\circ$ . Jednotlivé diody byly umístěny na Peltierově článku s možností regulace teploty pomocí PID regulace s krokem  $1^\circ\text{C}$  (obr. 7.14). Hodnoty napětí a proudu byly nastaveny dle doporučených katalogových hodnot. Teplota Peltierova článku byla nastavena na konstantní hodnotu  $25^\circ\text{C}$ .

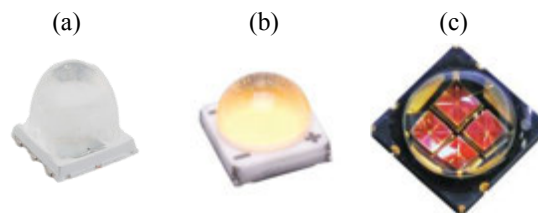
**Tab. 7.4:** Vybrané elektro-optické parametry LED.

Parametr/Označení	SMB660N-1100	LZ1-00R200	LZ4-40R200	SMB680-1100
Výrobce	Epitex	LEDEngin	LEDEngin	Epitex
Materiál	AlGaInP	AlGaInP	AlGaInP	AlGaAs
Rozměry (š×h×v mm)	5×5×7,5	4,4×4,4×2,7	7×7×4,2	5×5×4,7
$\lambda_P$ (nm)	660	660	660	680
$P$ (mW)	1 600	2 500	7 400	1 600
$U_F$ (V)	2,4	2,5	10,5	2,4
$I_F$ (mA)	500	1 000	700	500
$\phi_e$ (mW)	300	660	2 600	90
$2\Theta_{1/2}$ ( $^\circ$ )	14	90	95	24
$\eta$ (%) <sup>[*]</sup>	25,0	26,4	35,4	7,5
Cena (Kč) <sup>[**]</sup>	-	133,00	569,00	-

\*Vypočteno dle katalogových hodnot.

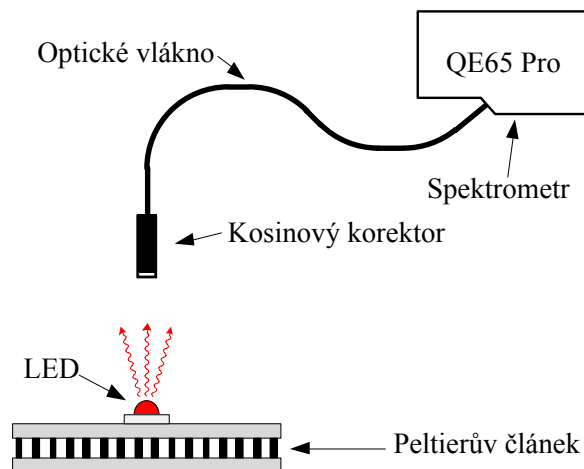
\*\*Cena stanovena ze stránek distributora elektronických součástek Farnell.

Diody od společnosti Epitex nejsou v ČR dostupné a byly objednány jako „Free Sample“.

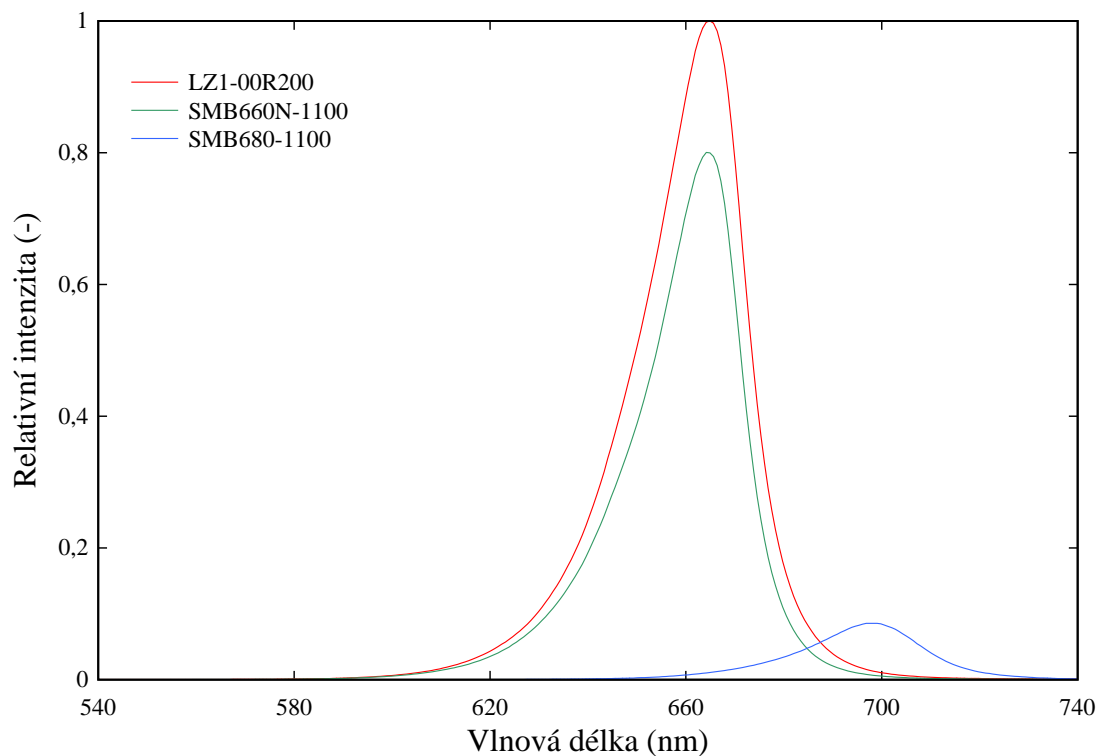


**Obr. 7.13:** Vybrané LED. (a) SMB660N-1100; (b) LZ1-00R200; (c) LZ4-40R200

**Závěr** Na základě elektro-optických parametrů a spektrální charakteristiky byla zvolena pro další experimenty LED LZ1-00R200 od společnosti LEDEngin disponující malou velikostí, nízkou cenou a vysokým zářivým tokem.



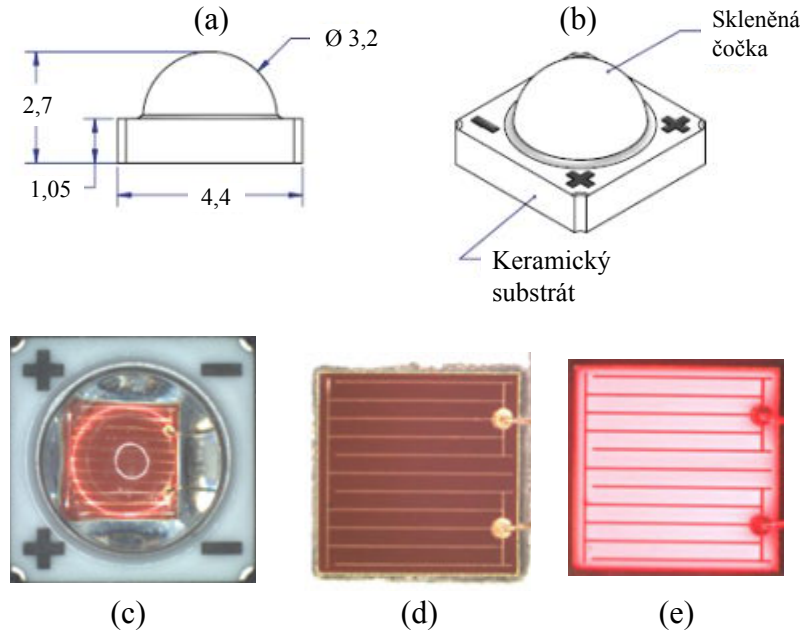
Obr. 7.14: Měření spektrální charakteristiky LED pomocí spektrometru QE65 Pro.



Obr. 7.15: Normalizované emisní spektrum vybraných LED. (Dioda LZ4-40R200 není ve spektrálních charakteristikách zahrnuta, neboť obsahuje čtyři čipy, které jsou totožné s LZ1-00R200.)

### 7.2.3 Charakterizace zvolené LED

Po výběru vhodné elektroluminiscenční diody (LEDEngin LZ1-00R200) je nyní nutné diodu charakterizovat a podrobně stanovit její radiometrické a elektrické parametry. Získaná data budou použita k efektivnímu návrhu osvitových jednotek pro dané aplikace.



**Obr. 7.16:** Zvolená LED LZ1-00R200. (a) Rozměry; (b) 3D pohled; (c) Horní pohled; (d) Detail čipu; (e) Detail rozsvíceného čipu. (Fotografie (d) a (e) byly pořízeny na diodě bez čočky).

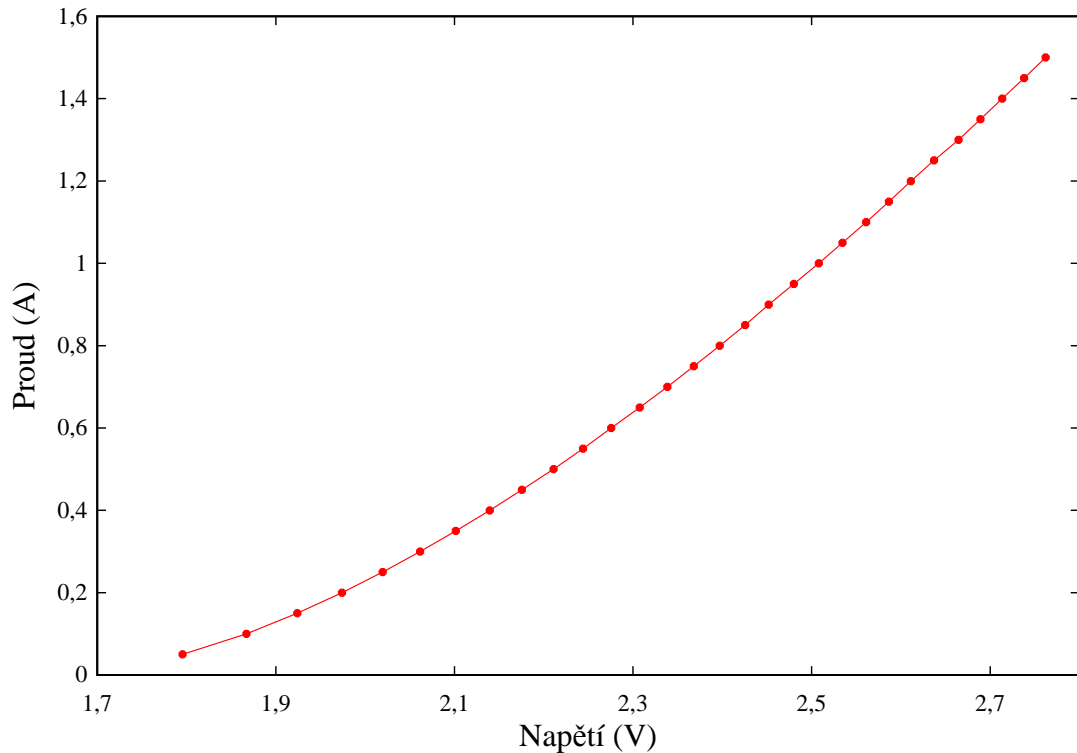
#### a) Volt-ampérová charakteristika

Napětí v propustném směru, neboli *prahové* napětí  $U_F$  elektroluminiscenční diody lze stanovit v ideálním případě jako [44]:

$$U_F \approx \frac{E_g}{e} \quad (7.12)$$

kde  $e$  je elementární náboj a  $E_g$  energie zakázaného pásu použitého materiálu. Reálná elektroluminiscenční dioda většinou obsahuje parazitní odpor, který způsobuje pokles prahového napětí. Parazitní odpor diody může být způsoben několika mechanismy: odporem kontaktů, odporem heterostrukтуры, odporem materiálu vykazujícího nízkou koncentraci nebo nízkou pohyblivost nosičů náboje. Druhým jevem, který ovlivňuje velikost prahového napětí, je injekce nosičů do kvantové jámy, kde je jejich energie přeměněna na teplo – *fononová emise*. [44]

Pro měření volt-ampérové charakteristiky byl použit programovatelný zdroj *iTech 6154*. Dioda na hliníkovém substrátu (IMS) byla připojena na Peltierův článek s možností regulace teploty pomocí PID regulace s krokem 1 °C. Teplota byla nastavena na hodnotu 25 °C.



Obr. 7.17: Volt-ampérová charakteristika LED. Měřeno při teplotě  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### b) Spektrální charakteristika

Měření spektrální charakteristiky diody bylo realizováno ve fotometrické laboratoři Katedry elektroenergetiky a ekologie FEL ZČU prostřednictvím VIS spektrometru JETI Specbos 1201. Uspořádání experimentu ilustruje obr. 7.18. LED na hliníkovém chladiči  $60 \times 60 \times 40\text{ cm}$  byla pevně umístěna do fotometrické soustavy ve vzdálenosti 1 m od spektrometru. Proud LED byl nastaven na hodnotu 1000 mA. Dioda byla protékána proudem po dobu 60 minut před samotným měřením z důvodu ustálení teploty.

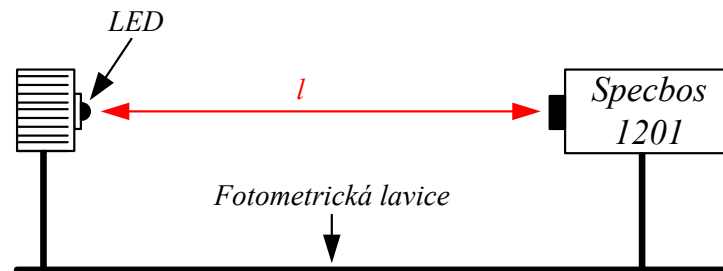
K sledovaným parametrům spektrální charakteristiky kromě vrcholové vlnové délky  $\lambda_p$  dále patří [45]:

- *Spektrální šířka pásma* ( $\lambda_{FWHM}^4$ ) – šířka vyzařovaného pásma při poloviční hodnotě vrcholové vlnové délky.
- *Centrální vlnová délka* ( $\lambda_{0,5m}$ ) – vlnová délka v polovině nejvyšší intenzity vyzařovaného spektra.
- *Vrcholová vlnová délka* ( $\lambda_p$ ) – nejvyšší hodnota emisního spektra.
- *Dominantní vlnová délka* ( $\lambda_{dom}$ ) – vlnová délka ležící na okraji diagramu chromatičnosti.

<sup>4</sup>FWHM – Full Width Half Max

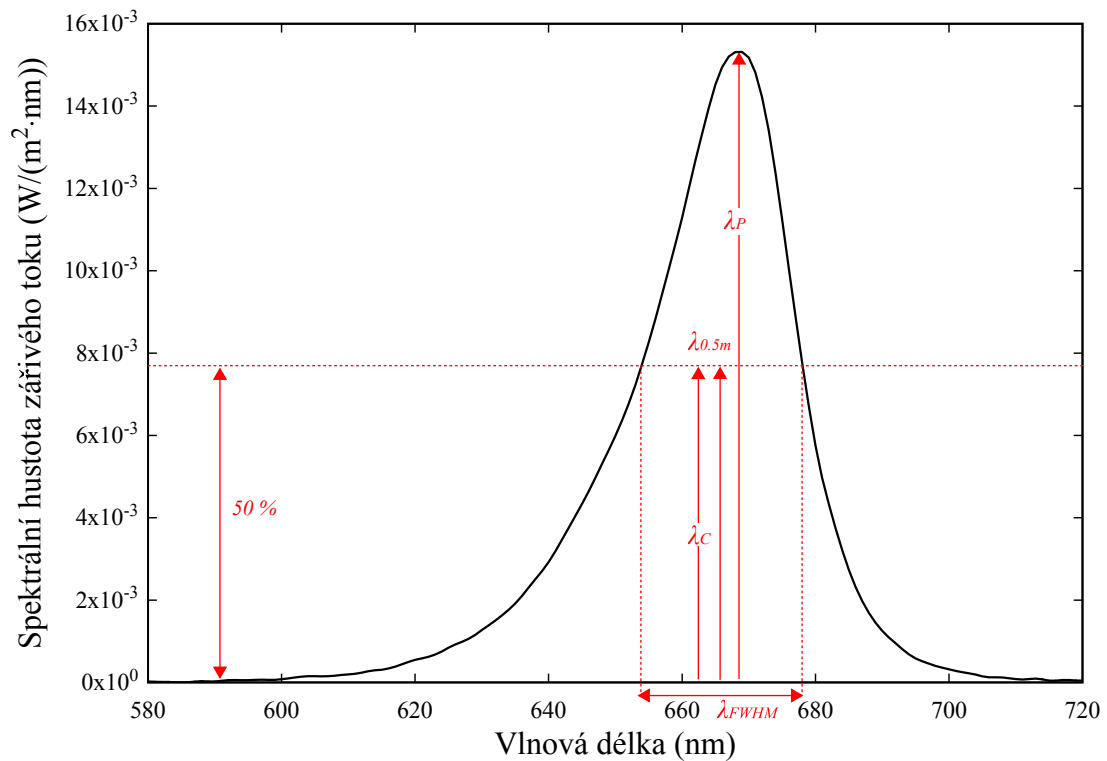
- *Centroidní vlnová délka* ( $\lambda_c$ ) – vlnová délka ve smyslu těžiště, která je určena jako integrál rozdělující celé spektrum na dvě stejné části [45]:

$$\lambda_c = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \lambda \cdot S(\lambda) \cdot d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} S(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (7.13)$$



**Obr. 7.18:** Uspořádání měření spektrálních charakteristik.

Z výsledného emisního spektra (obr. 7.19) bylo stanoveno:  $\lambda_P = 669$  nm,  $\lambda_{FWHM} = 24,3$  nm,  $\lambda_{0,5m} = 665$  nm,  $\lambda_C = 662,9$  nm a  $\lambda_{dom} = 644$  nm.

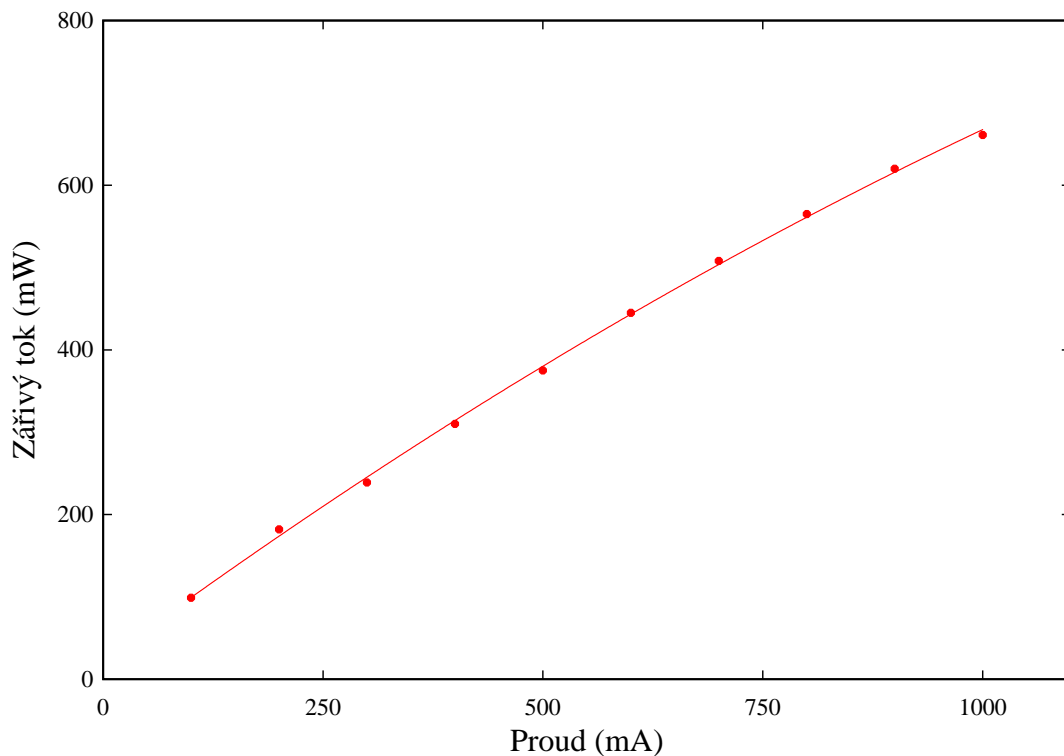


**Obr. 7.19:** Spektrální charakteristika LED s charakteristickými vlnovými délkami.

### c) Celkový zářivý tok

Zářivý tok diody byl změřen v laboratořích společnosti *Lightronic, s.r.o.* Tamní laboratoř disponuje špičkovým zařízením pro stanovení optických vlastností LED, konkrétně se jedná o přístroj OL770 LED s kulovým integrátorem (obr. 7.1 (b)) od společnosti Optronic Laboratories.

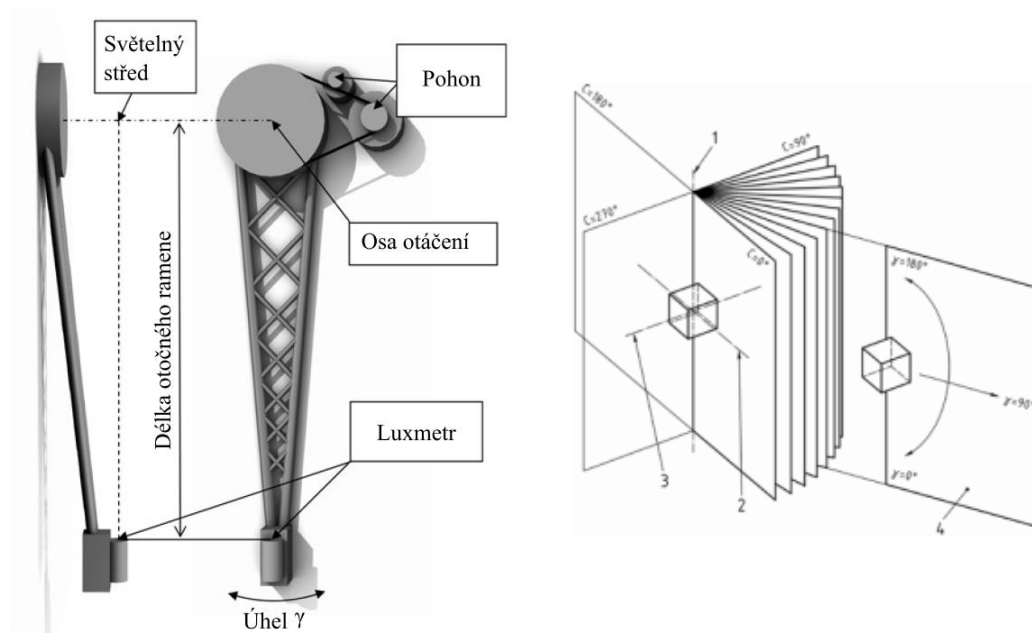
Kulový integrátor, též integrační koule, je fotometrický laboratorní měřicí přístroj ve tvaru duté koule. Koule je zevnitř opatřena speciální normovanou skladbou nátěrů a konečný povrch je barevně neselektivní, spektrálně nezávislý a má vysokou odrazivost. V kouli je vložen v malém okénku fotočlánek, který je překrytý clonkou tak, aby se zamezilo přímému dopadu světla na jeho povrch. Vnitřní průměr integrátoru se pohybuje od několika desítek centimetrů až do jednotek metrů, dle velikosti měřeného světelného zdroje. Princip měření spočívá v mnohonásobných odrazech, ke kterým dochází uvnitř koule. Měřenou veličinou v případě integrační koule je tzv. fotoproud, který je přímo úměrný množství dopadajícího světla na okénko s fotočlánekem. Celkový světelný tok je obvykle měřen substituční metodou při použití známého etalonu světelného toku. [46]



Obr. 7.20: Závislost zářivého toku na proudu LED.

#### d) Vyzařovací charakteristika

Měření vyzařovacího úhlu  $2\Theta_{1/2}$  a úplného vyzařovacího úhlu  $\Theta_{0,9V}$  (úhel, při kterém poklesne relativní intenzita na hodnotu 10 %) bylo realizováno ve fotometrické laboratoři Katedry elektroenergetiky FEL ČVUT v Praze. Fotometrická laboratoř je uzpůsobena k měření fotometrických parametrů světelných zdrojů a svítidel, tedy vlastnostmi světelných zdrojů, které jsou spojeny s vnímáním světla lidským okem. Laboratoř disponuje modernizovaným goniofotometrem s přesně řízeným natáčecím ramenem. Princip goniofotometru ilustruje obr. 7.21. Zkoušený světelný zdroj se umístí v ose otáčení ramene. Polovina se nastavuje natočením měřeného svítidla. Ve zvolené polovině se pro každý úhel  $\gamma$  změří luxmetrem osvětlenost. [47]

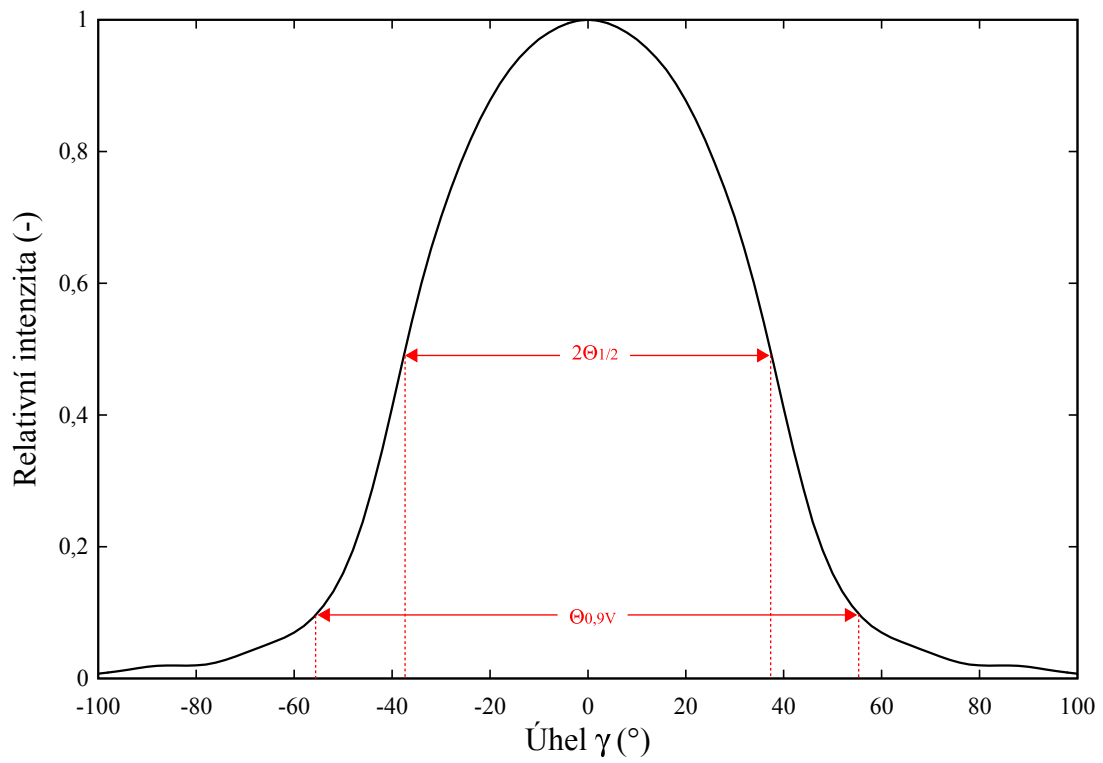


**Obr. 7.21:** Princip goniofotometru (vlevo) a orientace světelného zdroje v soustavě C-rovín (vpravo). [Převzato s úpravami z: [47]]

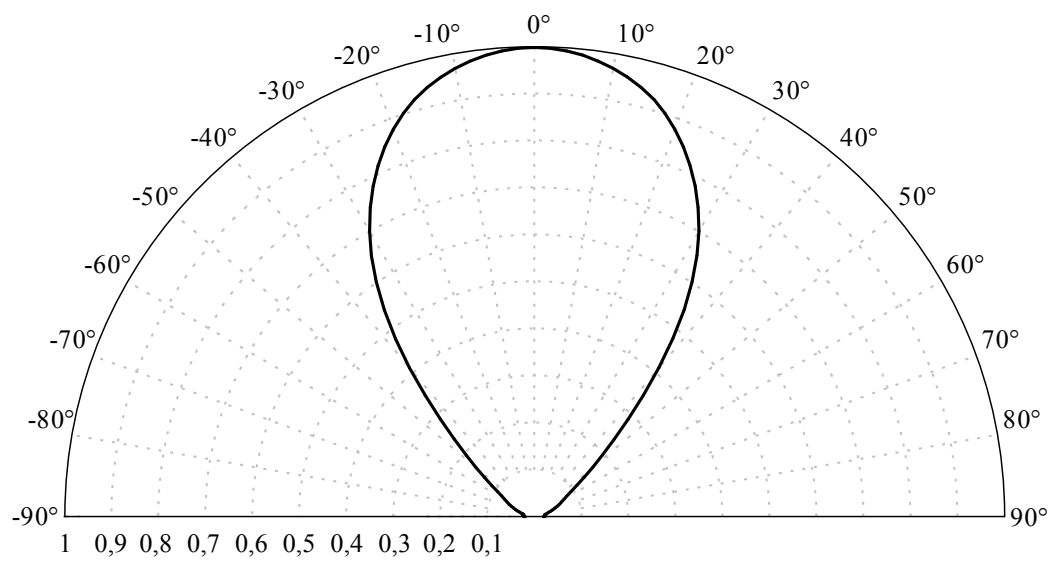
LED na hliníkovém chladiči  $60 \times 60 \times 40$  cm byla pevně umístěna do fotometrické soustavy a byly změřeny hodnoty osvětlenosti v rovinách  $C_0$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{45}$ ,  $C_{60}$ ,  $C_{75}$  a  $C_{90}$ . Proud LED byl nastaven na hodnotu 1 000 mA. Dioda byla protékána proudem po dobu 60 minut před samotným měřením z důvodu ustálení teploty. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány ze všech rovin a normalizovány.

**Závěr** Z obr. 7.22 byl stanoven vyzařovací úhel  $2\Theta_{1/2} = 76^\circ$  a celkový vyzařovací úhel  $\Theta_{0,9V} = 110^\circ$ .





Obr. 7.22: Normalizovaná vyzařovací charakteristika diody.



Obr. 7.23: Normalizovaná vyzařovací charakteristika diody v polárních souřadnicích.

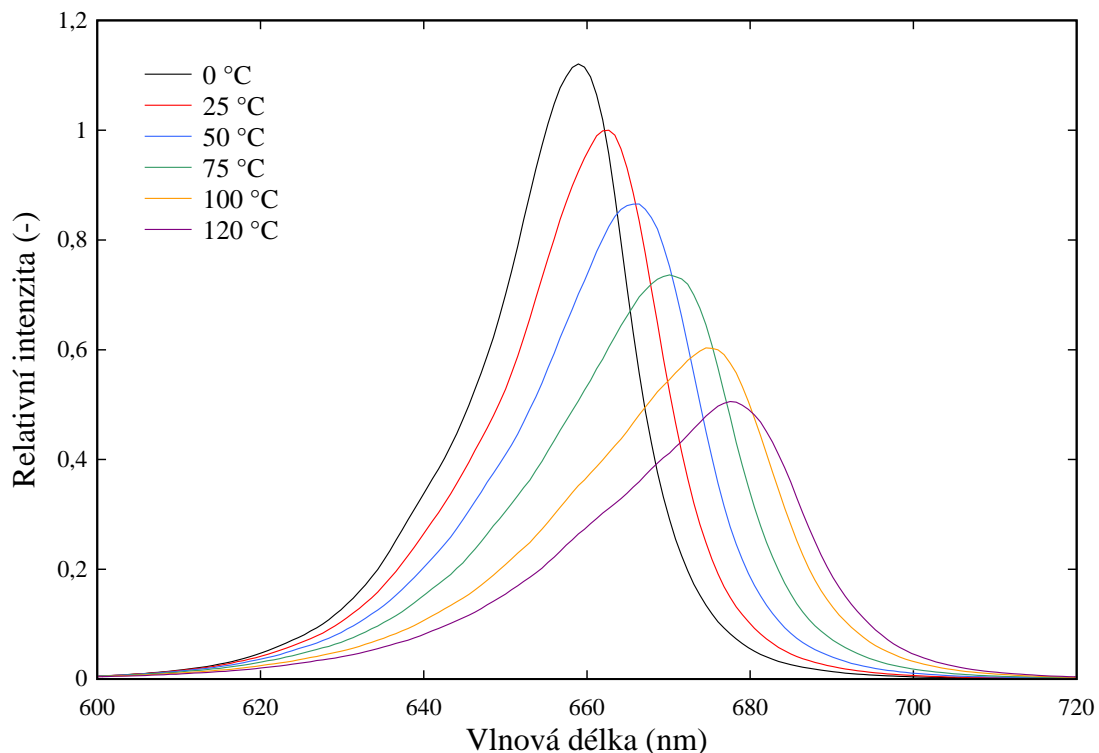
### e) Teplotní závislost parametrů LED

LED založené na AlGaInP a GaN v dnešní době pokrývají celé viditelné spektrum a můžeme se s nimi setkat v nesčetně aplikacích. Vysoce svítivé diody (High Brightness) začaly nahrazovat konvenční žárovky a zářivky. Představují tak další významný krok v historii světelného průmyslu. S nárůstem výkonnějších LED a s rozšiřováním pole možných aplikací, vlastnosti elektroluminiscenčních diod musí splňovat několik požadavků včetně provozního režimu při různých teplotách. Snahou výrobců LED je co největší účinnost přeměny elektron  $\rightarrow$  foton na dané vlnové délce. [48]

Kritickým parametrem u elektroluminiscenčních diod je teplota p-n přechodu, která ovlivňuje několik parametrů [44]: vnitřní kvantovou účinnost, intenzitu vyzařovaného světla, vlnovou délku vyzařovaného světla, degradaci čipu diody a v neposlední řadě také životnost. Pro stanovení optimálního provozního režimu LED je nezbytné zjistit chování dané diody při různých teplotách pouzdra.

#### i) Emisní spektrum

Pro měření spektrální charakteristiky byly použity stejné přístroje a uspořádání jako na obr. 7.14. Dioda byla umístěna na Peltierově článku. Teplota byla nastavována v rozsahu od 0 °C do 120 °C s krokem 5 °C. Proud LED byl nastaven na konstantní hodnotu 1 000 mA.



**Obr. 7.24:** Spektrální charakteristika LED pro různé teploty pouzdra. Měřeno v rozsahu teplot 0–120 °C s krokem 5 °C. Hodnoty byly normalizovány pro teplotu 25 °C.

Z obr. 7.24 je patrné, že relativní intenzita diody s rostoucí teplotou klesá. To je způsobeno zejména rekombinací na hlubších úrovních, povrchovou rekombinací a ztrátou

nosičů v heterostruktuře. Při teplotě 25 °C lze teplotní závislost intenzity záření stanovit jako [44]:

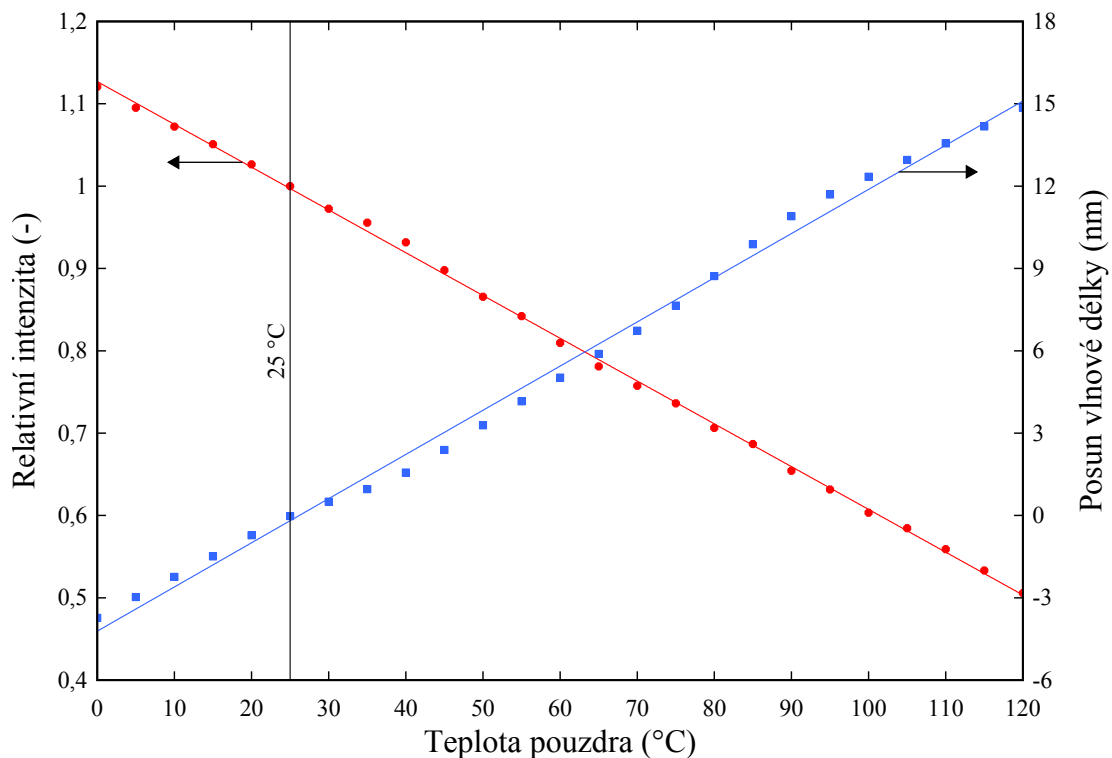
$$I_e = I_e |_{T=0K} \exp \frac{T}{T_1} \quad (7.14)$$

kde  $I_e |_{T=0K}$  je intenzita při teplotě 0 K,  $T_1$  je charakteristická teplota, pro kterou platí, že čím nižší je její hodnota, tím výraznější je změna intenzity na teplotě. Experimentálně bylo zjištěno, že nejvyšších hodnot dosahuje modrá LED s materiálem GaN, a sice  $T_1 = 1600$  K. Zatímco červená LED s materiálem AlGaInP dosahuje hodnot pouze  $T_1 = 95$  K, pokles intenzity je tedy značně strmější než u modré LED. Tento jev byl potvrzen v publikaci Guo a kol. [48]

Druhým jevem, který je možné pozorovat, je posun vrcholové vlnové délky směrem k vyšším hodnotám. Tento jev je způsoben změnou šířky zakázaného pásu  $E_g$  – s rostoucí teplotou  $E_g$  klesá. V literatuře bývá tento posun označován jako červený posun (Red Shift). Teplotní závislost šířky zakázaného pásu lze vyjádřit jako [44]:

$$E_g = E_g |_{T=0K} - \frac{\alpha T^2}{T + \beta} \quad (7.15)$$

kde  $E_g |_{T=0K}$  je šířka zakázaného pásu při teplotě 0 K,  $\alpha$  a  $\beta$  jsou látkové konstanty polovodičového materiálu a  $T$  je termodynamická teplota. Parametry  $\alpha$  a  $\beta$  pro použitý polovodičový materiál lze nalézt v literatuře [44]. Jelikož s šířkou zakázaného pásu je úzce spjata vlnová délka vyzařovaného světla (rov. 7.10), může docházet při velkých změnách teploty ke změně vyzařované barvy.



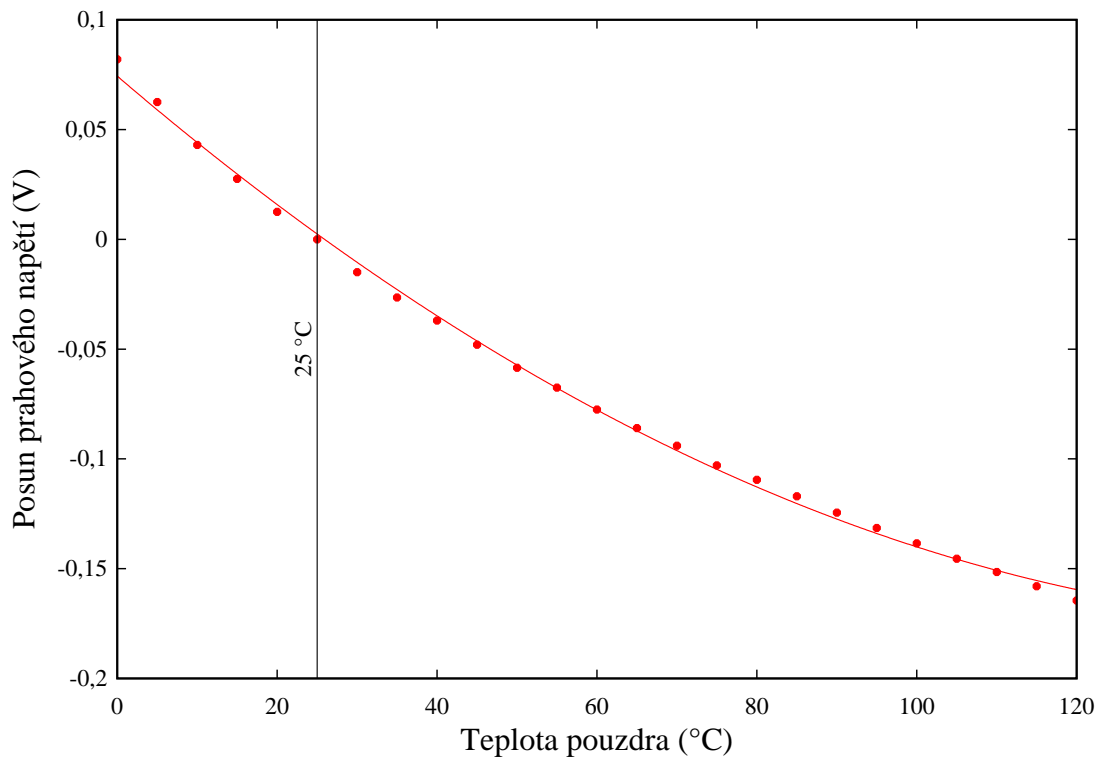
**Obr. 7.25:** Závislost relativní intenzity a posunu vlnové délky LED na teplotě pouzdra. Měřeno v rozsahu teplot 0–120 °C s krokem 5 °C. Hodnoty byly normalizovány pro teplotu 25 °C.

Na obr. 7.25 jsou zobrazeny výše diskutované jevy názorněji. Pomocí lineární regrese byly stanoveny změny parametrů LED s teplotou jako:

- Pokles relativní intenzity =  $-0,52 \text{ } \%/^{\circ}\text{C}$ .
- Posun vlnové délky =  $+0,16 \text{ nm}/^{\circ}\text{C}$ .

### ii) Prahové napětí

Prahové napětí je závislé na šířce zakázaného pásu  $E_g$  (rov. 7.12). S rostoucí teplotou lze tedy pozorovat pokles prahového napětí. Rychlost poklesu závisí zejména na použitém polovodičovém materiálu.



**Obr. 7.26:** Posun prahového napětí v závislosti na teplotě pouzdra při konstantním proudu. Měřeno v rozsahu teplot 0–120 °C s krokem 5 °C při provozním proudu  $I_F = 1 \text{ A}$ . Hodnoty byly normalizovány pro teplotu 25 °C.

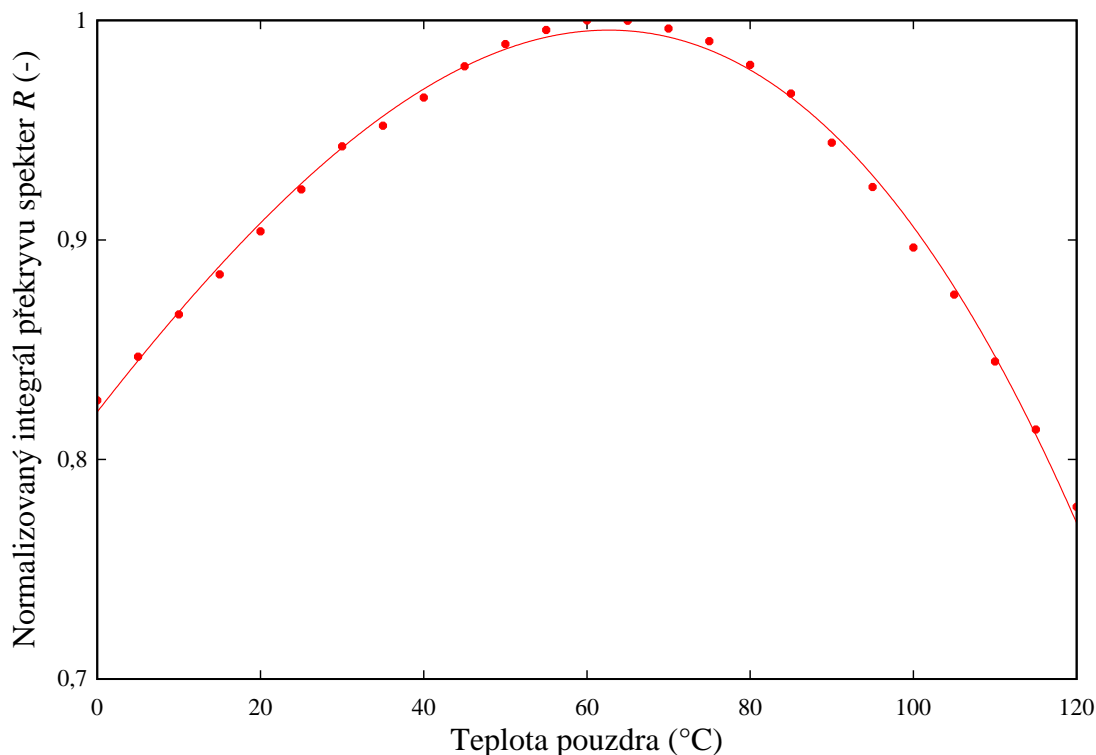
### 7.2.4 Účinnost světelné absorpce fotosenzibilizátorem

Ke stanovení účinnosti absorpce světla fotosenzibilizátorem lze v literatuře najít jednoduchou metodu, která spočívá v integraci absorpčního a emisního spektra podle vlnové délky. Integrál překryvu spekter  $R$  se stanoví jako [49]:

$$R = \int ABS_{PS}(\lambda) E_{LED}(\lambda) d\lambda \quad (7.16)$$

kde  $ABS_{PS}$  je absorpce fotosenzibilizátoru a  $E_{LED}$  emise LED.

Ke stanovení účinnosti světelné absorpce fotosenzibilizátorem byla použita naměřená data emisního spektra z obr. 7.24 a normalizované absorpční spektrum AlOHFTC ve vodě z obr. 7.3.



**Obr. 7.27:** Závislost teploty pouzdra LED na integrálu překryvu spekter  $R$ .

**Závěr** Dle obr. 7.27 byla stanovena pracovní oblast diody s nejvyšší účinností světelné absorpce fotosenzibilizátorem v rozmezí teplot pouzdra 50–70 °C s optimem při 60 °C.

### 7.2.5 Návrh optimálního provozního režimu LED

Provedené experimenty vedly k návrhu optimálního provozního režimu LED:

- Provozní proud  $I_f = 1\,000\text{ mA}$ .
- Provozní napětí  $U_f$  při proudu  $1\,000\text{ mA}$  a teplotě  $25\text{ °C} = 2,5\text{ V}$ .
- Zářivý tok  $\phi_e$  při proudu  $1\,000\text{ mA}$  a teplotě  $25\text{ °C} = 661\text{ mW}$ .
- Rozsah provozních teplot LED (teplota pouzdra) =  $50\text{--}70\text{ °C}$  (teplota p-n přechodu<sup>5</sup>  $\approx 69\text{--}89\text{ °C}$ )

---

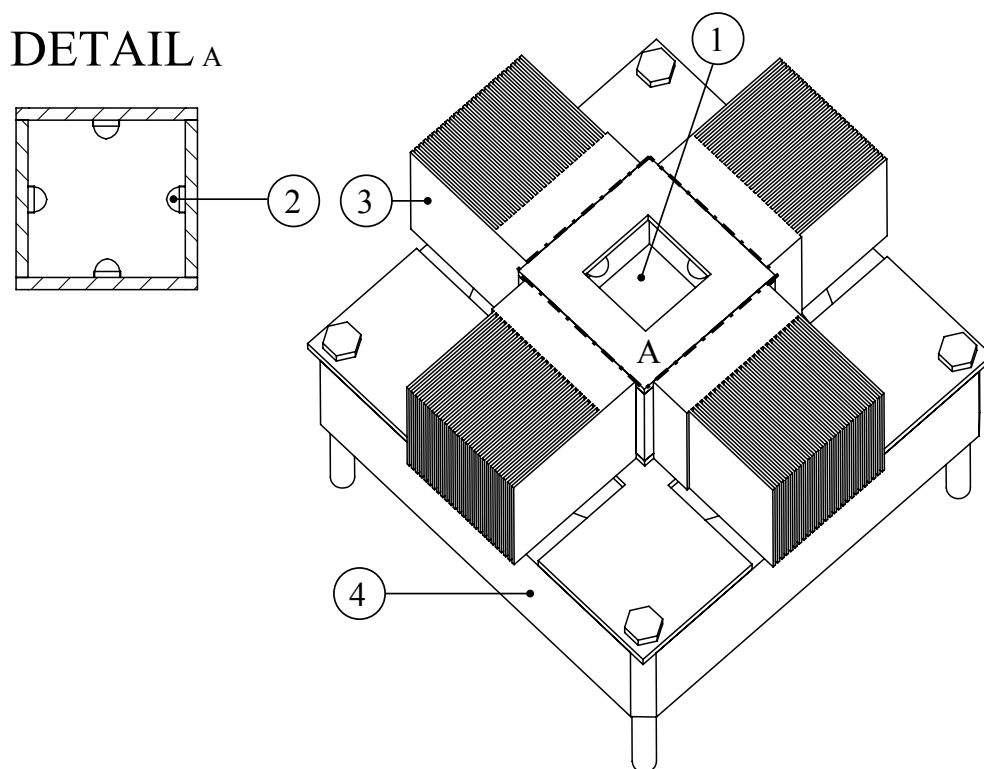
<sup>5</sup>V katalogovém listu diody je uveden tepelný odpor mezi p-n přechodem a pouzdrém diody jako  $R_{\theta J-C} = 10,5\text{ °C/W}$ . Teplotu p-n přechodu poté lze stanovit jako:  $T_J = T_C + (R_{\theta J-C} \cdot P_T)$ , kde  $T_J$  je teplota přechodu,  $T_C$  teplota pouzdra a  $P_T$  je ztrátový (tepelný) výkon.

## 7.3 Systémy pro ověření fotosenzibilizačních reakcí

### 7.3.1 Laboratorní fotoreaktor GSO-1

Laboratorní fotoreaktor GSO-1 byl navržen a zkonstruován pro otestování vhodnosti vzájemné kombinace fotosenzibilizátoru a elektroluminiscenční diody.

Konstrukce zařízení je ilustrována na obr. 7.28. Ozařovací jednotka je navržena jako malá reakční komora pro osvit standardní spektrometrické kyvety (1) o půdorysných rozměrech 10×10 mm. Rozměry celého zařízení jsou 80×80×82 mm a rozměry reakční komory 15×15×30 mm. Tělo reakční komory je tvořeno čtyřmi moduly. Každý modul obsahuje oboustranný plošný spoj s LED (2). Plošný spoj je pomocí teplovodivé pásky nalepen na hliníkový chladič (3). Moduly s LED jsou výměnné a jsou připevněny pomocí šroubu k základně. Vzhledem k předpokládanému použití výkonných diod s příkonem v řádu jednotek wattů je celý blok modulů usazen na ventilátoru 80×80 mm (4), zajišťující odpovídající chlazení celého zařízení. Uvnitř reakční komory jsou umístěny čtyři výkonové diody LZ1-00R200.

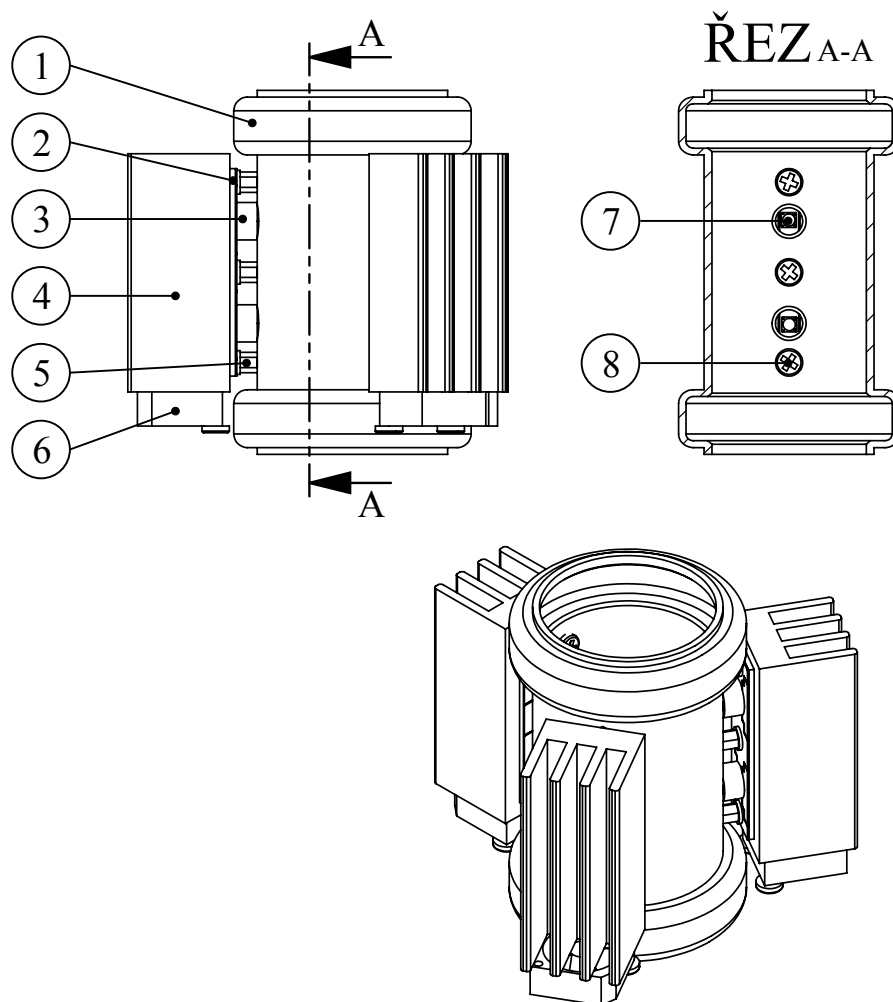


Obr. 7.28: Laboratorní fotoreaktor GSO-1.

### 7.3.2 Kruhový fotoreaktor

Kruhový fotoreaktor byl navržen a zkonstruován pro účely dlouhodobého osvětlení většího množství fotosenzibilizátoru umístěného v chemické baňce o průměru 50 mm. Prostřednictvím tohoto fotoreaktoru lze stanovit nejen úroveň generace  $^1\text{O}_2$ , ale také míru degradace daného materiálu.

Konstrukce zařízení je ilustrována na obr. 7.29. Nosným elementem je plastový válec (1) o vnitřním průměru 50 mm a výšce 100 mm. Po jeho obvodu jsou rozmístěny tři totožné moduly jejichž osy svírají úhel  $120^\circ$ . Každý modul sestává z desky plošného spoje (2), na kterém je umístěn pár výkonových LED (7). Opačná strana desky plošného spoje je opatřena hliníkovým chladičem (4), který je ofukován vzduchem z ventilátoru o rozměrech  $20 \times 20$  mm připojeném ze spodní strany chladiče (6). Aby nedocházelo k úniku světla z jednotlivých LED diod do okolí, je kolem každé diody umístěn teflonový prsteneček (3). Jednotlivé moduly jsou ke stěně válce přišroubovány třemi šrouby (8) a vzdálenost od pláště byla vymezena pomocí distančních sloupků (2).



Obr. 7.29: Kruhový fotoreaktor.



### 7.3.3 Univerzální řídicí jednotka

Obsahem této kapitoly je návrh univerzální řídicí jednotky pro napájení a ovládání výkonu LED. Pro návrh jednotky byly stanoveny následující požadavky:

1. Efektivní napájení a regulace několik LED v sérii.
2. Nastavení doby osvitů a regulace výkonu světelné expozice.
3. Přehledné zobrazení nastavených parametrů.
4. Kompaktní rozměry.
5. Intuitivní ovládání.

Pro napájení výkonových LED s příkonem v řádu jednotek wattů je nejvýhodnější volbou použití spínaného proudového zdroje, neboť nedochází ke ztrátě výkonu na předřadném nebo regulačním prvku. Optimální provozní proud je nejčastěji uveden v katalogovém listu LED (v případě LZ1-00R200 je doporučena hodnota proudu 1 000 mA). Spínaný proudový zdroj je možné realizovat pomocí specializovaných integrovaných obvodů s několika externími součástkami, druhou možností je použití certifikovaných monolitických DC-DC měničů obsahující pouze vstupní, výstupní, popř. regulační piny. Pro napájení a řízení výkonu LED byl využit monolitický DC-DC spínaný zdroj MeanWell LDD-1000H s konstantním proudovým výstupem 1 000 mA (Constant Current LED Driver).

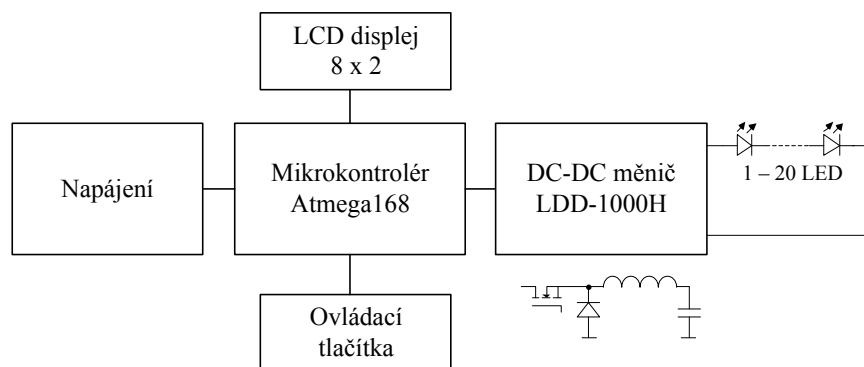
Parametry měniče LDD-1000H:

- Topologie: Step-Down (snižující měnič).
- Výstupní proud: 1 000 mA (konstantní).
- Rozsah vstupního napětí: 9–59 V (DC).
- Rozsah výstupního napětí: 2–52 V (DC).
- Účinnost: až 97 %.
- Interní ochrany: proti zkratu, přehřátí, interní EMI filtr.
- Interní regulace: PWM (100–1 kHz, amplituda 2,5–6 V, střída 10–90 %).
- Krytí: IP67.
- Cena: 140 Kč.



Z pohledu zmíněných parametrů a ceny je použití tohoto měniče výhodným a elegantním řešením. V případě poruchy zdroje se celý modul fyzicky vymění a zařízení je schopné rychle fungovat dál. Při poruše spínaného zdroje s externími součástkami je nutná detailní a časově náročná diagnostika závady, která ve výsledku může být finančně náročnější než v případě výměny monolitického zdroje.

Jádrem jednotky je 8bitový mikrokontrolér ATMEL AVR ATmega168, který obstarává řízení LCD displeje, generuje požadovaný PWM signál, detekuje změny stavu tlačítek a řídí interní časovače.



**Obr. 7.30:** Blokové schéma řídicí jednotky.

Parametry univerzální řídicí jednotky:

- Možnost připojit 1–20 LED LZ1-00R200.
- Nastavitelný výkon připojených LED od 0 do 100 %.
- Nastavitelná doba světelné expozice od 100 ms po desítky hodin.
- Uložení nastavených hodnot do paměti EEPROM.
- Zobrazení nastavených hodnot na LCD displeji.
- Nastavení parametrů pomocí tlačítek na předním panelu.



**Obr. 7.31:** Univerzální řídicí jednotka a detail předního panelu.

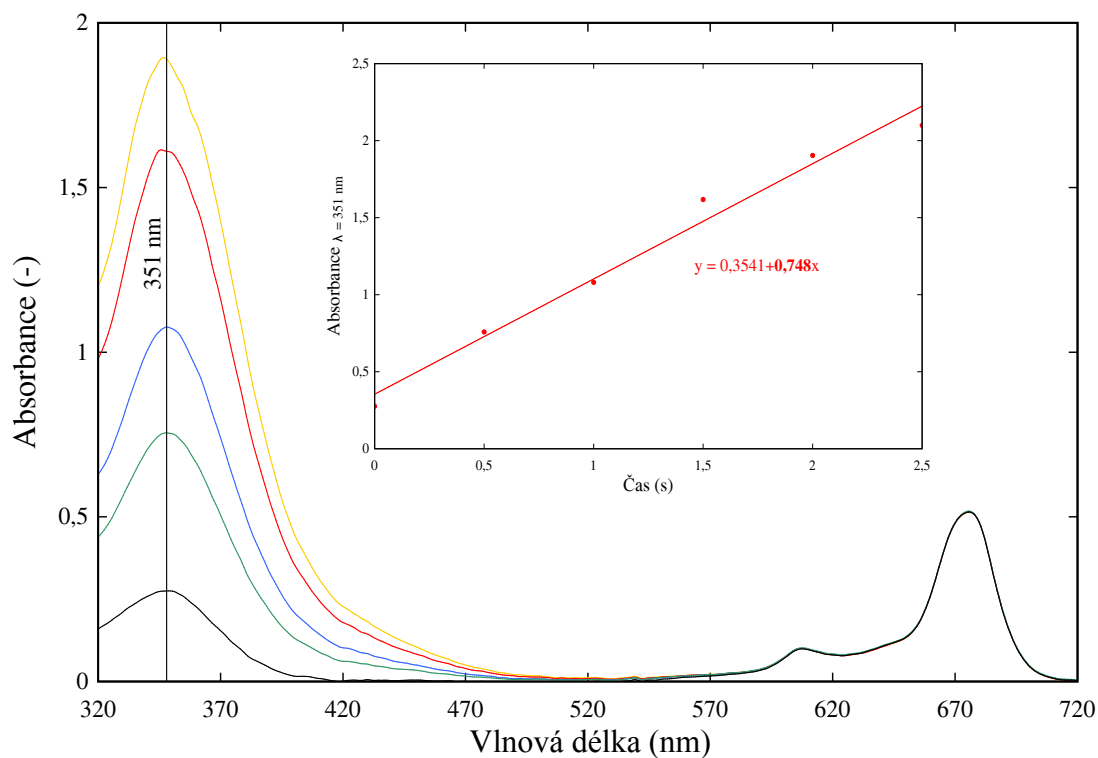
Navržená a zkonstruovaná řídicí jednotka splňuje všechny stanovené požadavky a umožňuje precizně řídit světelnou dávku.

## 7.4 Interakce světelného zdroje a fotosenzibilizátoru

### 7.4.1 Závislost produkce $^1\text{O}_2$ na době osvitu

K měření byl použit vzorek ftalocyaninu FTC03 o koncentraci 4 mg/l rozpuštěný v jodidovém činidle. Měření probíhalo za stálého míchání v křemenné kyvetě, do které byly nadávkovány 2 ml zásobního roztoku. Kyveta byla ozářena v laboratorním fotoreaktoru GSO-1 při provozním proudu 1 000 mA. Délka pulzu byla nastavena na 500 ms a měření probíhalo, dokud hodnota absorbance trijodidového aniontu nedosáhla hodnoty 2.

Z výsledného grafu (obr. 7.32) lze konstatovat, že závislost přeměny trijodidového aniontu ( $\lambda = 351 \text{ nm}$ ) na době osvitu je lineární. Rychlost této přeměny je přímo úměrná generaci singletového kyslíku. Pomocí lineární regrese byla stanovena směrnice přímky:  $y = 0,3541 + 0,748x$  s korelačním koeficientem  $R^2 = 0,991$ . Hodnota směrnice představuje rychlostní konstantu  $k$  ( $\text{s}^{-1}$ ) potřebnou pro stanovení kvantového výtěžku fotosenzibilizátoru.



Obr. 7.32: Závislost absorbance trijodidového pásu na době osvitu vzorku FTC03 v jodidovém činidle.

### 7.4.2 Stanovení kvantového výtěžku

Kvantový výtěžek je pro daný materiál a použité rozpouštědlo stejný, bez ohledu na použitou metodiku pro jeho zjištění. Pro stanovení kvantového výtěžku ftalocyaninového fotosenzibilizátoru  $\phi_{\Delta}$  byla využita porovnávací metoda, kde se použila známá hodnota kvantového výtěžku  $\phi_{*}$  a rychlostní konstanty  $k_{*}$  tetrasulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu z literatury ( $\phi_{*} = 0,38$ ;  $k_{*} = 0,812 \text{ s}^{-1}$ , cit. [3]). Hledaný kvantový výtěžek se následně stanoví jako:

$$\phi_{\Delta} = \frac{k}{k_*} \cdot \phi_* \quad (7.17)$$

kde  $k$  je rychlostní konstanta stanovená v předchozí kapitole (obr. 7.32). Pro hodnotu proudu 1 000 mA byl vypočítán kvantový výtěžek disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu:

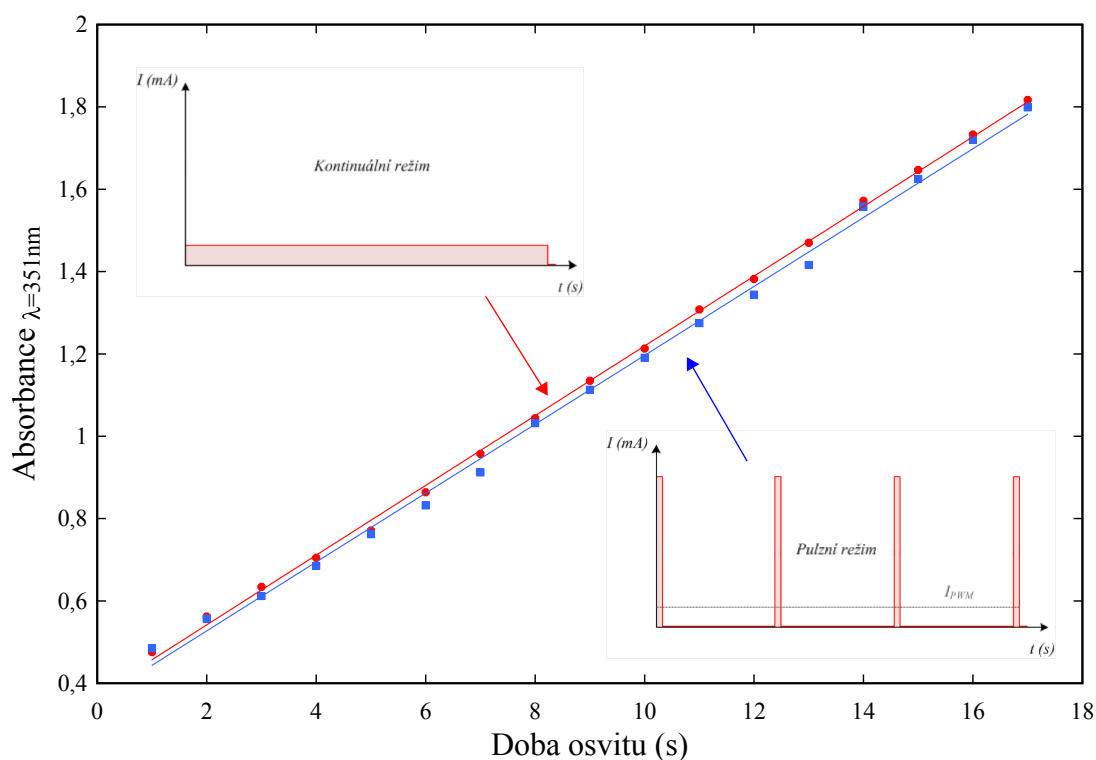
$$\phi_{\Delta} = \frac{0,748}{0,812} \cdot 0,38 = 0,35 \quad (7.18)$$

což je vzhledem k typu rozpouštědla ( $\text{H}_2\text{O}$ , ve kterém je obecně dosahováno nízkých kvantových výtěžků) velmi dobrý výsledek.

### 7.4.3 Porovnání režimů osvětlení

Tato kapitola si klade za cíl porovnat vliv kontinuálního a pulzního režimu na účinnost produkce singletového kyslíku. Byly navrženy dva režimy, které za jednotku času dodají do měřeného vzorku stejnou energii :

1. Kontinuální režim – proud 100 mA
2. Pulzní režim – proud 1 000 mA, frekvence 490 Hz, střída 10 % (střední hodnota proudu  $I_{PWM} = 100$  mA)



Obr. 7.33: Účinnosti generace singletového kyslíku dle použitého režimu osvětlení.

K měření byl použit vzorek ftalocyaninu FTC03 o koncentraci 4 mg/l rozpuštěný v jodidovém činidle. Měření probíhalo za stálého míchání v křemenné kyvetě, do které byly nadávkovány 2 ml zásobního roztoku. Kyveta byla ozářena v laboratorním fotoreaktoru GSO-1 nejprve v kontinuálním režimu a poté v pulzním režimu.

Z výsledného grafu (obr. 7.33) je patrné, že oba režimy jsou z pohledu produkce singletového kyslíku srovnatelné. To ovšem ještě neznamená, že v dané aplikaci budou vykazovat stejnou účinnost. Barolet a kol. experimentálně ověřil, že pulzní režim dokáže efektivněji stimulovat produkci kolagenu než kontinuální režim. Dále bylo zjištěno, že ultrakrátké pulzy jsou schopny prostupovat do tkáně hlouběji než v kontinuálním režimu. Barolet a kol. to vysvětlují tím, že první výkonné pulzy obsahují dostatek fotonů, které excitují veškeré molekuly chromoforů v horních vrstvách tkáně, které se následně další absorpce neúčastní a tím se zprůchodní cesta do hlubších vrstev. [5]

Zde je nutné podotknout, že detailní studie vlivu kontinuálního a pulzního režimu osvitů s ftalocyaninovými fotosenzibilizátory nebyla doposud provedena.

## 8 Aplikace

Následující kapitola se věnuje několika aplikačním oblastem, ve kterých byl využit potenciál fotosenzibilizačních reakcí zvoleného fotosenzibilizátoru a zvoleného světelného LED zdroje ve spolupráci s těmito subjekty:

1. Centrum organické chemie (COC) (Rybitví) – Oblast syntézy ftalocyaninových derivátů.
2. PVGROUP CZ (Pardubice) – Oblast čištění procesních kapalin.
3. Lékařská fakulta UK (Hradec Králové) – Oblast fotodynamické dezinfekce ve stomatologii.
4. Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK (Praha) – Oblast fotodynamické terapie maligních nádorů.
5. Ústav biofyziky a informatiky, 1. LF UK (Praha) – Oblast fotodynamické inaktivace prionových proteinů.
6. ASIO (Brno) – Oblast čištění odpadních vod.

Systém pro fotodynamickou inaktivaci mikroorganismů v procesních kapalinách (kapitola 8.1) byl celý realizován a testován na pracovištích ZČU a v laboratořích Centra organické chemie. V ostatních aplikacích (kapitoly 8.2–8.5) byl řešen návrh, konstrukce a stanovení provozních parametrů světelných LED zdrojů v kooperaci s daným pracovištěm.

## 8.1 Fotodynamická inaktivace mikroorganismů v procesních kapalinách

Procesní kapaliny (řezné, či chladicí emulze) představují vhodné prostředí pro výskyt a množení mikroorganismů, převážně bakterií, hub a plísní. Přítomnost bakterií negativně ovlivňuje fyzikálně-chemické a senzorické vlastnosti kapaliny:

- Pokles pH – ztráta ochranných vlastností kapaliny, která způsobuje vznik koroze obráběných materiálů, obráběcích nástrojů a konstrukčních částí stroje.
- Nestabilita kapaliny – ztráta mazacích vlastností.
- Mikrobiální rozklad kapaliny – zápach kapaliny, tvorba shluků.
- Zkrácení životnosti kapaliny a částí stroje.
- Zvýšení nákladů na provoz.

V současné době se pro účely desinfekce a antimikrobiální ochrany řezných a chladicích kapalin používají *biocidní přípravky*, nejčastěji baktericidy s fungicidními účinky. Průmyslové biocidy používané pro ochranu řezných a chladicích kapalin představují svou toxicitou a spotřebou značné zdravotní riziko pro pracovníky, kteří s těmito kapalinami pracují a silnou zátěž pro životní prostředí.

Koncentraci mikroorganismů v kapalině je třeba během provozu průběžně sledovat a v případě jejich přemnožení provést dodatečný zásah biocidním prostředkem. Biocidní přípravky se do řezných a chladicích kapalin standardně přidávají v nižších koncentracích i během dlouhodobého provozu – jedná se o tzv. preventivní doplňování biocidních přípravků. Celý proces vyčištění kapaliny (snížení koncentrace mikroorganismů na povolenou mez) trvá pak v provozu i několik týdnů. Kontinuální preventivní dávkování nízkých koncentrací biocidů často způsobuje vznik rezistentní kultury mikroorganismů. V případě chladicích okruhů, kde se používají biocidní preparáty, bylo mikroskopickými rozbory zjištěno, že vysoké dávky biocidů mají možný dopad na morfologické a teratologické útvary u řas. Uvedené skutečnosti vedou ke studiu možností uplatnění ekologicky šetrné inhibice mikroorganismů. [34]

Problémy s používáním biocidních preparátů:

- Není zajištěn širokopásmový účinek biocidů – nutnost používat směsi biocidních látek.
- Nutnost průběžného doplňování biocidních látek – omezená stabilita biocidů.
- Obtížně kontrolovatelná koncentrace biocidních látek v kapalině – obtížné nalezení optimální koncentrace vzhledem k účinnosti a ekonomice provozu.
- Rezistence mikroorganismů – nutno používat směsi různých biocidů včetně nutnosti aplikovat nové typy biocidů.
- Značné zdravotní riziko pro obsluhu při styku s pokožkou a vdechování aerosolu – alergické reakce, dermatózy a respirační onemocnění.
- Silná zátěž pro životní prostředí – problém především pro půdní a vodní ekosystém, ekonomická zátěž pro uživatele při ekologické likvidaci.

## 8.1.1 Konvenční biocidní přípravky pro procesní kapaliny

### Legislativní rámec

Obecně pro všechny biocidní přípravky platí „Nařízení evropského parlamentu a rady (EU) č. 528/2012“ ze dne 22. května 2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání. Tento zákon stanoví podmínky, za kterých je možno biocidní přípravky uvádět na trh, které jsou platné pro výrobce i distributory. Nařízení rozděluje biocidní přípravky do několika tříd, přičemž pro ochranu procesních kapalin se jedná o:

*Typ přípravku 13: Konzervanty pro kapaliny používané při obrábění nebo řezání Přípravky na potlačování mikrobiální kontaminace v kapalinách používaných při obrábění nebo řezání kovů, skla nebo dalších materiálů. (str. 106, nařízení č. 528/2012).*

V České republice byl ke dni 11. 10. 2013 schválen následující seznam látek povolených používat k ochraně rezných kapalin před mikrobiálním napadením:

**Tab. 8.1:** Seznam látek povolených k ochraně rezných kapalin před mikrobiální kontaminací.

Účinná látka	CAS	ES	Typ látky
1,2-benzoisothiazol-3(2H)-on	2634-33-5	220-120-9	A
směs:5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolin-3-one (EC: 247-500-7) a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (EC: 220-239-6) (3:1)	55965-84-9	směs	A
glutaraldehyd	111-30-8	203-856-5	C
2-oktyltetrahydroisothiazol-3-on	26530-20-1	247-761-7	A
2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol; bronopol (WHO INN)	52-51-7	200-143-0	B
(ethylenedioxy)dimethanol	3586-55-8	222-720-6	D
Hexahydro-1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-2-triazine	4.4.4719	225-208-0	C
Sodium pyrithione (pyridin-2-thiol-(1-oxid))	3811-73-2	223-296-5	C
3-jod-2-propinyl-N-butylkarbamát (IPBC)	55406-53-6	259-627-5	B
N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin	2372-82-9	219-145-8	C
2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide	10222-01-2	233-539-7	B
tetramethylol acetylen dimočovina	5395-50-6	226-408-0	D
morpholin, 4,4'-methylenebis	5625-90-1	227-062-3	C
chlorid stříbrný	7783-90-6	232-033-3	C
3,3'-Methylenebis(5-methyloxazolidine)	66204-44-2	266-235-8	C
2-Phenoxyethanol	122-99-6	204-589-7	C
4-(2-Nitrobutyl)morfolin	2224-44-4	218-748-3	C
2-brom-2-(brommethyl)pentandinitril	35691-65-7	252-681-0	B

*Pokračování na další straně ...*



Tab. 8.1 – Pokračování

Účinná látka	CAS	ES	Typ látky
n-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	4.7.4299	420-590-7	A
O-fenylfenolát sodný	132-27-4	205-055-6	C
Bifenyl-2-ol	90-43-7	201-993-5	C
2-methyl-2,3-dihydrogenisothiazol-3-on	2682-20-4	220-239-6	A
Alfa,alfa,alfa-trimethylhexahydro-1,3,5-triazin-1, 3,5-triethanol	25254-50-6	246-764-0	C
N-alkyl(C12-C16)dimethyl- benzylamoniumchlorid	68424-85-1	270-325-2	C
1,3,4,6-tetrakis(hydroxymethyl)hexahydro- imidazo[4,5-d]imidazol-2,5-dion	5395-50-6	226-408-0	C
4-Chloro-3-methylphenol	59-50-7	200-431-6	C
(benzyloxy)methanol	14548-60-8	238-588-8	C

Jednotlivé přípravky lze rozdělit do těchto skupin:

### Skupina A

Isothiazolinové deriváty jsou širokopásmové velmi účinné biocidní látky, které jsou široce využívány v oblasti rezných kapalin. Hlavní zastoupení mají 1,2-benzisothiazol-3(2H)-on a směs: 5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolin-3-one (EC: 247-500-7) a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (EC: 220-239-6) (3:1). Oba deriváty se používají pro následnou antimikrobiální úpravu. Deriváty mají problém v tom, že vytváří silné dermatózy, obzvláště ve vyšších koncentracích. Látky jsou také v prostředí rezných kapalin omezeně stabilní. V posledních letech je silný tlak tento typ derivátů vyloučit z aplikací, kde mohou přijít do přímého kontaktu s lidskou kůží.

### Skupina B

Deriváty, které obsahují v molekule halogen. Velmi účinné deriváty, které mají do značné míry i dezinfekční účinky. Jejich stabilita při pH vyšším než 8,0 je nízká a dochází k jejich rychlé degradaci. Obecně je velký tlak na omezení používání všech halogenovaných organických sloučenin. V případě rezných kapalin se tyto po dosloužení vypouští do kanalizace.

### Skupina C

Méně sourodá skupina látek založena na fenolech, aldehydech, stříbru, kvarterních amoniových solích atd. Z hlediska bezpečnosti nejméně ohrožená skupina biocidů, nicméně přináší problémy v podobě nižší účinnosti. Látky nejsou širokopásmové a v uzavřených okruzích dochází k častému výskytu rezistentních kmenů, jejichž odstranění je velmi komplikované — často je třeba použít látky ze skupiny B.

## Skupina D

Skupina látek tzv. formaldehydových donorů. Tyto látky samy o sobě vykazují velmi nízkou biocidní účinnost. Jejich funkční vlastnosti jsou postaveny na jejich schopnosti uvolňovat formaldehyd jako velmi účinný biocid. Koncentrace formaldehydu ve směsi je však legislativně omezena a tato skupina látek musí být používána ve směsi s jinými biocidy. Velmi oblíbená je směs 5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolin-3-one (EC: 247-500-7) a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (EC: 220-239-6) (3:1), kterou uvolňující se formaldehyd do značné míry stabilizuje.

V souvislosti s legislativním tlakem a snahou zvýšit účinnost biocidních přípravků se stále více používají směsi biocidních látek bez ohledu na to, z jaké skupiny pocházejí. Jednotliví výrobci takto docilují synergických účinků a současně snížení dávkování biocidních látek z kritických skupin. Ani použití fotoaktivních ftalocyaninových derivátů nezamezí nutnosti používat konzervanty pro koncentráty řezných kapalin, aby nedocházelo k jejich mikrobiálnímu napadení ještě před jejich nařazením do aplikačních emulzí.

Na Katedře technologií a měření FEL ZČU probíhá v současné době projekt, který se problematikou šetrné inhibice mikroorganismů zabývá. Projekt nese označení *Technologický systém pro fotodynamickou inaktivaci mikroorganismů (CZ.1.05/3.1.00/14.0297)* a byl poskytnut z Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace (OPVaVpI) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT).

Úkolem technického řešení projektu je vytvoření takového systému pro likvidaci nežádoucích mikroorganismů v řezných a chladicích kapalinách, který zajistí dlouhodobě účinnou likvidaci mikroorganismů bez rizika vzniku rezistence, bez toxicity a bez nežádoucích vedlejších účinků a alergických reakcí u obsluhy zařízení. Inovace navrhovaného řešení spočívá v antimikrobiálních účincích reaktivních forem kyslíku produkovaných pomocí fotosenzibilizátorů na bázi derivátů ftalocyaninu. Tento způsob řešení antimikrobiální ochrany je v oblasti průmyslových aplikací zcela nový a odstraňuje nedostatky a rizika dosud používaných systémů s biocidy.

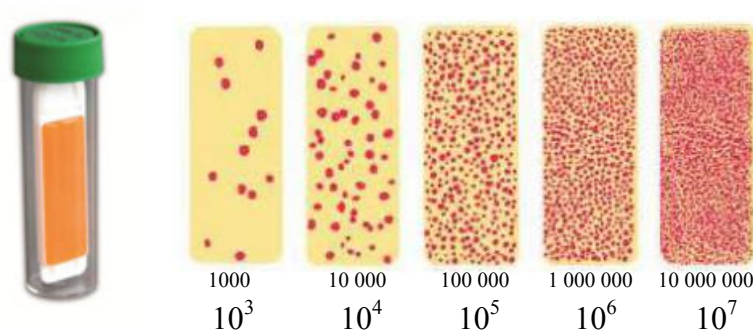
Hlavními přínosy pro uživatele navrhovaných systémů ochrany řezných kapalin jsou: (a) provoz zařízení bez biocidních přípravků, (b) minimalizace negativních vlivů na zdraví obsluhy zařízení, (c) eliminace toxikologického rizika, (d) splnění nejpřísnějších bezpečnostních předpisů, (e) materiálové úspory, (f) minimalizace negativních vlivů na životní prostředí (tzn. eliminace biocidů v odpadních vodách a půdě, eliminace ekologického rizika při filtraci, čištění a likvidaci řezných kapalin).

Nutno podotknout, že celý systém je natolik unikátní a nový, že je třeba jej legislativně chránit. Z tohoto důvodu byl na systém fotodynamické inaktivace mikroorganismů v procesních kapalinách vypsán *užitný vzor*, jehož celá dokumentace je součástí přílohy B.

### 8.1.2 Určení mikrobiální kontaminace

Pro určení mikrobiální kontaminace v procesních kapalinách bylo nutné vybrat vhodnou screeningovou metodu. Z hlediska jednoduchosti, rychlosti a ceny byly zvoleny univerzální kultivační *lopatkové testery* (angl. *Dip Slide*). Jedná se o plastovou destičku s definovanými rozměry, na které je výrobcem nanášena kultivační půda. Destička je umístěna ve sterilní nádobě. Odběr vzorku spočívá v otisku vzorku na povrch destičky nebo přímým ponořením lopatkového testeru do zkoumané kapaliny. Po odběru se nosič zpět uzavře do krycí nádoby, ve které může být bezpečně transportován v nezměněném stavu. Testery se po určitou dobu, danou typem testeru, kultivují ve tmě při definovaných teplotách (20 °C,

22 °C, 25 °C, 36 °C). Následně se plocha testeru s narostlými koloniemi porovná s ilustračními tabulkami dodávanými výrobcem testeru. Množství mikrobiální kontaminace se stanovuje v jednotkách *KTJ* – kolonie tvořící jednotka (angl. *CFU* – Colony Formy Unit). Typů lopatkových testerů existuje celá řada, liší se od sebe použitým médiem na nosiči (pro selektivní detekci např. enterobakterií, koliformních bakterií, kvasinek nebo plísní). Destička testeru obsahuje dvě strany (rub a líc), které nejčastěji slouží pro záchyt dvou specifických skupin organismů (např. na jedné ploše se detekují aerobní bakterie a na druhé ploše plísně a kvasinky).

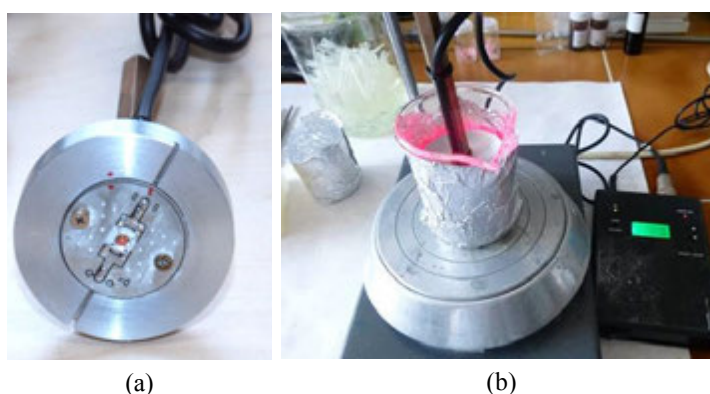


**Obr. 8.1:** Lopatkový tester Cult-Dip Combi (Merck) s ilustračními úrovněmi kultivace. Udávané hodnoty jsou v jednotkách *KTJ*/1 ml.

### 8.1.3 Fotoreaktor pro laboratorní testy

#### 1. generace

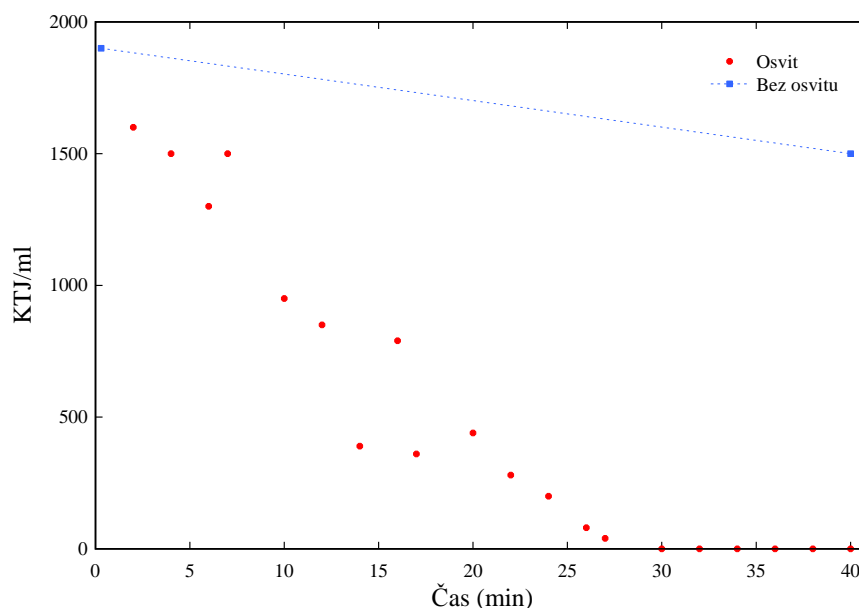
Pro prvotní ověření inhibice mikroorganismů byl navržen a zkonstruován jednoduchý zdroj s jednou LED umožňující osvit ve standardní chemické kádince s vnitřním průměrem 4 cm, na kterém byl proveden test inhibice bakterií *Escherichia coli* ve vztahu k procesním kapalinám.



**Obr. 8.2:** Laboratorní fotoreaktor 1. generace. (a) Detail umístění LED; (b) Aktivní fotoreaktor s řídicí jednotkou.

Do 100 ml kádinky obalené odrazivým materiálem bylo předloženo 20 ml kontaminované procesní kapaliny. Kontaminovaná kapalina byla ozařována světelným zdrojem po

dobu 40 minut a v minutových intervalech byly odebrány vzorky k mikrobiálnímu testování. Společně s tímto experimentem probíhal také tzv. *slépý test* bez osvitů pro eliminaci chybného vyhodnocení.



**Obr. 8.3:** Mikrobiální inhibice *Escherichia coli* pomocí laboratorního fotoreaktoru 1. generace. 100 ml *Escherichia coli*  $10^3$  KTJ/ml + 100  $\mu$ l 10% roztok AlOHFTC.

**Závěr** Výsledek experimentu ukázal, že po 30 minutách osvitů ve fotoreaktoru nebyly již bakterie *Escherichia coli* přítomny.

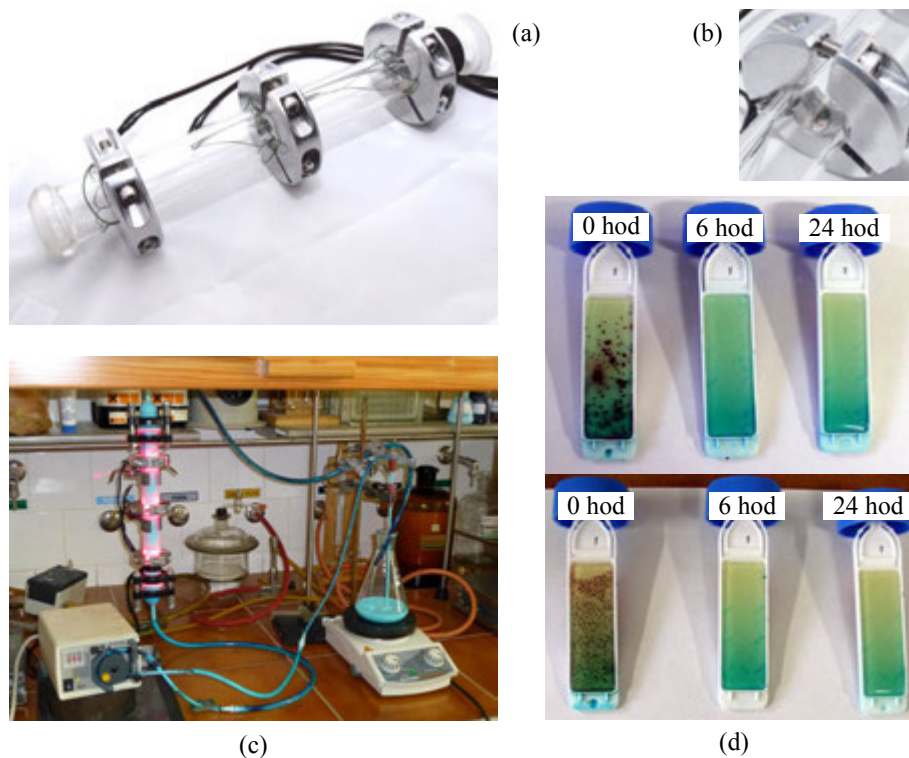
## 2. generace

Aby bylo možné více se přiblížit reálným průmyslovým podmínkám, bylo nutné provést laboratorní testy ve větším měřítku. Byl navržen trubkový laboratorní fotoreaktor 2. generace, který obsahuje celkem 9 elektroluminiscenčních diod o celkovém vyzáření výkonu 5 900 mW. Diody jsou po trojicích umístěny ve speciálních hliníkových prstencích umožňující pasivní chlazení (obr. 8.4 (b)). V reaktoru byl uskutečněn laboratorní experiment, při kterém se ověřovala nejnižší možná koncentrace fotosenzibilizátoru:

- Objem fotoreaktoru – 250 ml.
- Výkon čerpadla – 140 ml/min, 230 ml/min.
- Procesní kapalina – objem 350 ml, 5% koncentrát, kontaminace kapaliny stanovena na  $10^6$  KTJ/ml.
- Použité koncentráty řezných kapalin
  - SEMIX FA 4080LC (semisyntetický - obsah vody 58 %)
  - EMULKAT UNI 101P (univerzální mikroemulze bez vody)
- Koncentrace fotosenzibilizátoru – 0,5 %; 0,25 %; 0,125 %; 0,05 %; 0,025 %; 0,01 %; 0,005 %.

- Testovací podmínky – 230 ml/min průtok, doba světelné expozice 24 hodin.

**Závěr** Dostačující koncentrace fotosenzibilizátoru pro potlačení mikrobiální kontaminace z  $10^6$  KTJ/ml o čtyři řády byla stanovena na 0,01 %.



**Obr. 8.4:** Laboratorní fotoreaktor 2. generace. (a) Uspořádání prstenců, (b) Detail umístění LED, (c) Aktivní fotoreaktor s oběhem procesní kapaliny, (d) Mikrobiální testy.

### 8.1.4 Fotoreaktor pro průmyslové aplikace

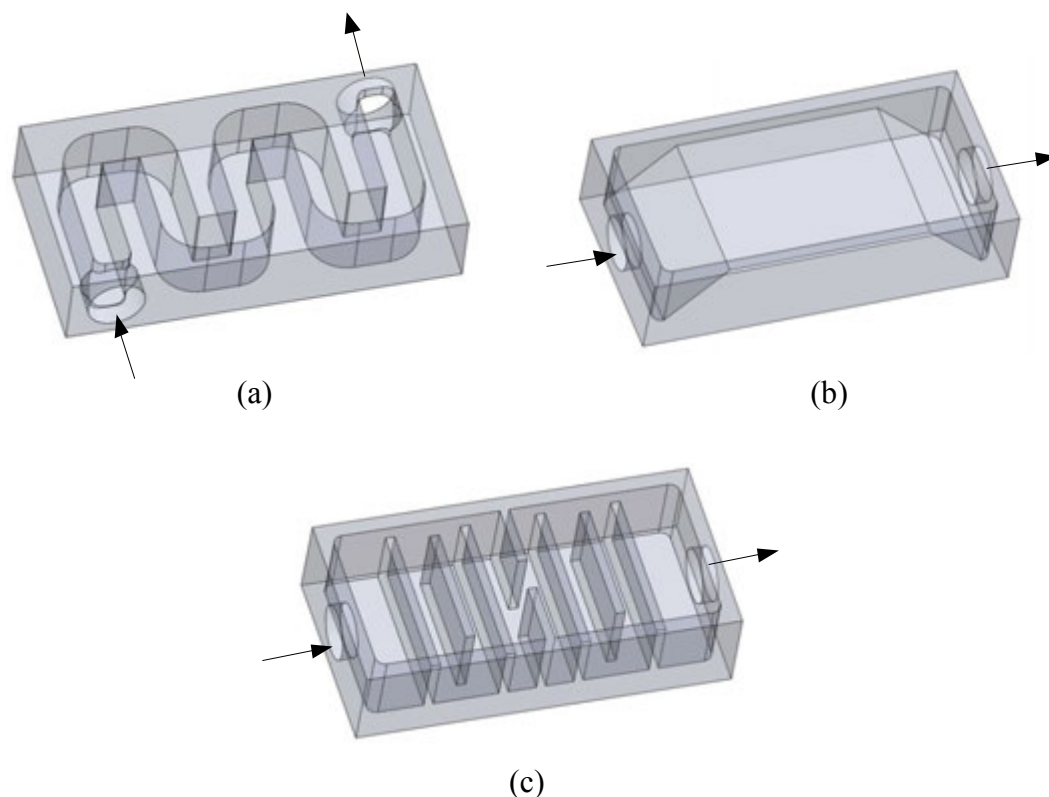
Kapitola se zabývá návrhem a konečnou realizací průmyslového fotoreaktoru s ověřením funkce během několikátýdenních experimentů fotodynamické inhibice.

#### a) Geometrie aktivního prostoru

Nejdůležitější částí fotoreaktoru je jeho *aktivní prostor* – místo, kudy bude protékat procesní kapalina s danou rychlostí při daném tlaku, a kde bude docházet k fotoexcitaci v kapalině rozpuštěného fotosenzibilizátoru prostřednictvím světelného zdroje. Byly navrženy tři geometrie aktivního kanálu, které jsou zobrazeny na obr. 8.5. U všech navržených geometrií byl aktivní prostor navržen tak, aby jeho průřez byl totožný s průměrem vstupního/výstupního otvoru.

Typ (a) má aktivní prostor proveden jako kanál v podobě meandru zajišťující laminární proudění procesní kapaliny bez vzniku víření, které by způsobilo tlakové ztráty v prostoru fotoreaktoru. Aktivní prostor u typu (b) je navržen jako úzká štěrbina. Geometrie tohoto tvaru je velmi výhodná v případě použití nedostatečně opticky propustné procesní kapaliny, neboť s tloušťkou vrstvy se snižuje hloubka vniku záření do kapaliny.

Z hlediska maximálního promíchání procesní kapaliny byl navržen typ (c), který obsahuje různě vysoké přepážky umožňující promíchávání kapaliny jak v horizontálním tak i ve vertikálním směru.



**Obr. 8.5:** Navržené geometrie aktivního kanálu. (a) Meandr; (b) Štěrba; (c) Přepážky.

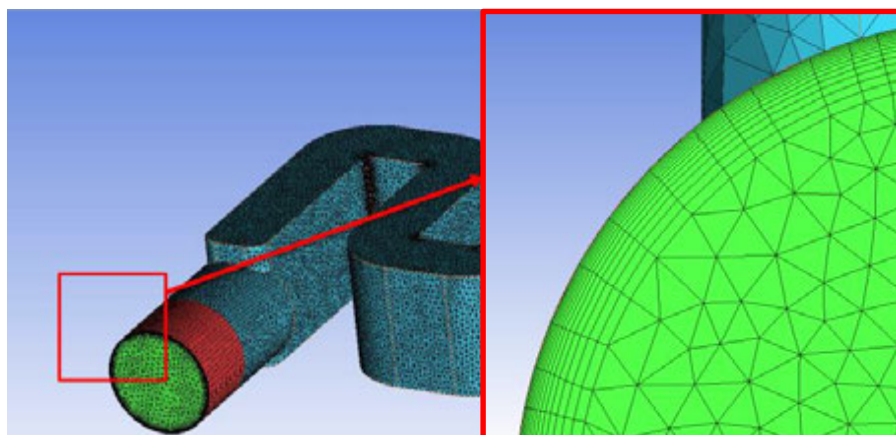
## b) Simulace proudění kapaliny

Z pohledu složitosti výrobních operací v prototypovém množství byla pro návrh průmyslového fotoreaktoru zvolena geometrie aktivního prostoru ve tvaru meandru (obr. 8.5 (a)). Simulace proudění kapaliny byla realizována ve spolupráci s Katedrou energetických strojů a zařízení FST ZČU. Cílem simulace je numerický výpočet tlakových a teplotních ztrát ve fotoreaktoru a stanovit charakter a rychlost proudění ve fotoreaktoru.

Turbulence a její vznik jsou jevy, které je velmi komplikované předpovědět. V minulosti proto vzniklo několik metod, jak turbulenci, její vznik a vlastnosti řešit. Hovoříme o tzv. *turbulentních modelech*. Turbulentní model představuje soustavu rovnic založenou na metodě konečných prvků (FEM - Finite Elements Method). K nejznámějším dvourovnicovým turbulentním modelům z nadřazené skupiny RANS<sup>1</sup> patří standardní model  $k-\varepsilon$  a model  $k-\omega$ . Turbulentní model  $k-\varepsilon$  se vyznačuje jednoduchostí a dostatečnou přesností uprostřed řešené geometrie, model  $k-\omega$  je stabilnější a přesnější v blízkosti stěn. Pro řešení výpočtu průtokové části fotoreaktoru byl využit velmi přesný turbulentní model SST (Shear Stress Transport) kombinující výhody obou modelů  $k-\varepsilon$  a  $k-\omega$ .

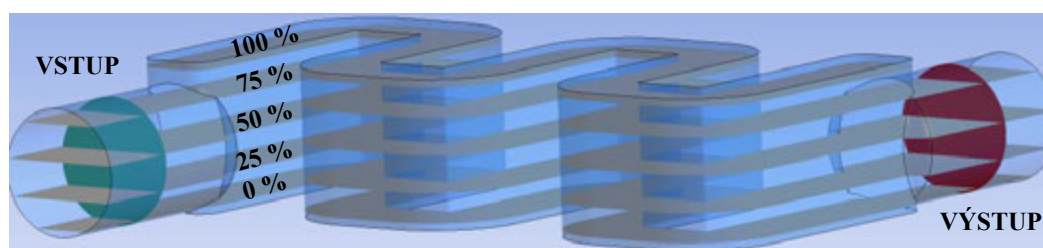
Simulace byla provedena v programu ANSYS s modulem CFX a FLUENT představující špičku v oblasti dynamiky tekutin. Po „vysítování“ průtočné části (obr. 8.6) byl

<sup>1</sup>Turbulentní modely vycházející z Reynoldsova průměrování Navier-Stokesových rovnic.



Obr. 8.6: Síť průtokové části a detail stěny.

stanoven celkový počet elementů na 1 676 603. Jako kapalina byla uvažována voda v tekutém stavu. Výpočet proběhl pro tři průtoková množství: 5, 15 a 40 l/min<sup>-1</sup>. Hodnoty vycházejí z charakteristiky čerpadla, které bude použito pro oběh kapaliny skrze fotoreaktor v nezávislém okruhu.

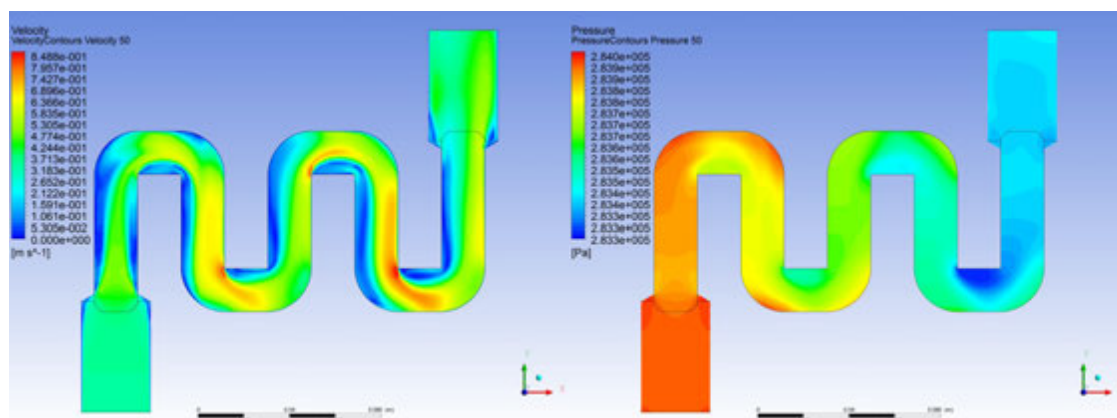


Obr. 8.7: Řezy meandrem.

Tab. 8.2: Simulace proudění – vypočtené hodnoty.

Parametr	Průtokové množství		
	5 l/min <sup>-1</sup>	15 l/min <sup>-1</sup>	40 l/min <sup>-1</sup>
Tlak vstup (Pa)	$3,72 \times 10^5$	$2,84 \times 10^5$	$4,85 \times 10^4$
Tlak výstup (Pa)	$3,72 \times 10^5$	$2,83 \times 10^5$	$4,49 \times 10^4$
Tlaková ztráta (Pa)	$6,00 \times 10^1$	$5,39 \times 10^2$	$3,60 \times 10^3$
Rychlost proudění vstup (m.s <sup>-1</sup> )	$1,18 \times 10^{-1}$	$3,48 \times 10^2$	$9,06 \times 10^3$
Rychlost proudění výstup (m.s <sup>-1</sup> )	$1,39 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^2$	$1,05 \times 10^3$
Teplota vstup (K)	$3,03 \times 10^2$	$3,03 \times 10^2$	$3,03 \times 10^2$
Teplota výstup (K)	$3,03 \times 10^2$	$3,03 \times 10^2$	$3,03 \times 10^2$
Teplotní ztráta (K)	$-2,44 \times 10^{-4}$	$7,11 \times 10^{-3}$	$3,05 \times 10^{-5}$

**Závěr** Provedené simulace ukázaly, že uvnitř fotoreaktoru nedochází k turbulentnímu proudění a nevznikají znatelné tlakové ani teplotní ztráty.



**Obr. 8.8:** Výsledky simulace proudění kapaliny v 50% řezu meandru pro průtok  $15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ . V levé části je rychlost proudění, vpravo rozložení tlaku.

### c) Konstrukce fotoreaktoru

Fotoreaktor, který bude umístěn u obráběcího stroje, musí být dostatečně robustní a ideálně vodotěsný. Jako výchozí materiál pro jednotlivé části fotoreaktoru byl vybrán hliník. Fotoreaktor sestává celkem ze sedmi částí (obr. 8.9): spodní díl s aktivním prostorem (1), těsnění (2), opticky propustná přepážka (3), horní díl (4), deska plošného spoje (5), přední panel (6) a krycí víko (7).

**Spodní díl s aktivním prostorem** Rozměry základny reaktoru s aktivním prostorem byly v první iteraci stanoveny na  $100 \times 200 \text{ mm}$ . Ukázalo se, že z hlediska očekávaných velkých tlaků (jednotky barů) v systému dodávky procesní kapaliny bylo žádoucí zvětšit prostor kolem aktivního meandru pro pevnější uchycení k hornímu dílu fotoreaktoru. Výsledné rozměry základny jsou  $130 \times 220 \text{ mm}$ . Objem aktivního prostoru je 330 ml. Vstup a výstup je opatřen šroubením s průměrem G 1", pomocí kterého lze fotoreaktor připojit do okruhu procesní kapaliny. Konstrukční výkres této části je v příloze A2 (obr. A.4).

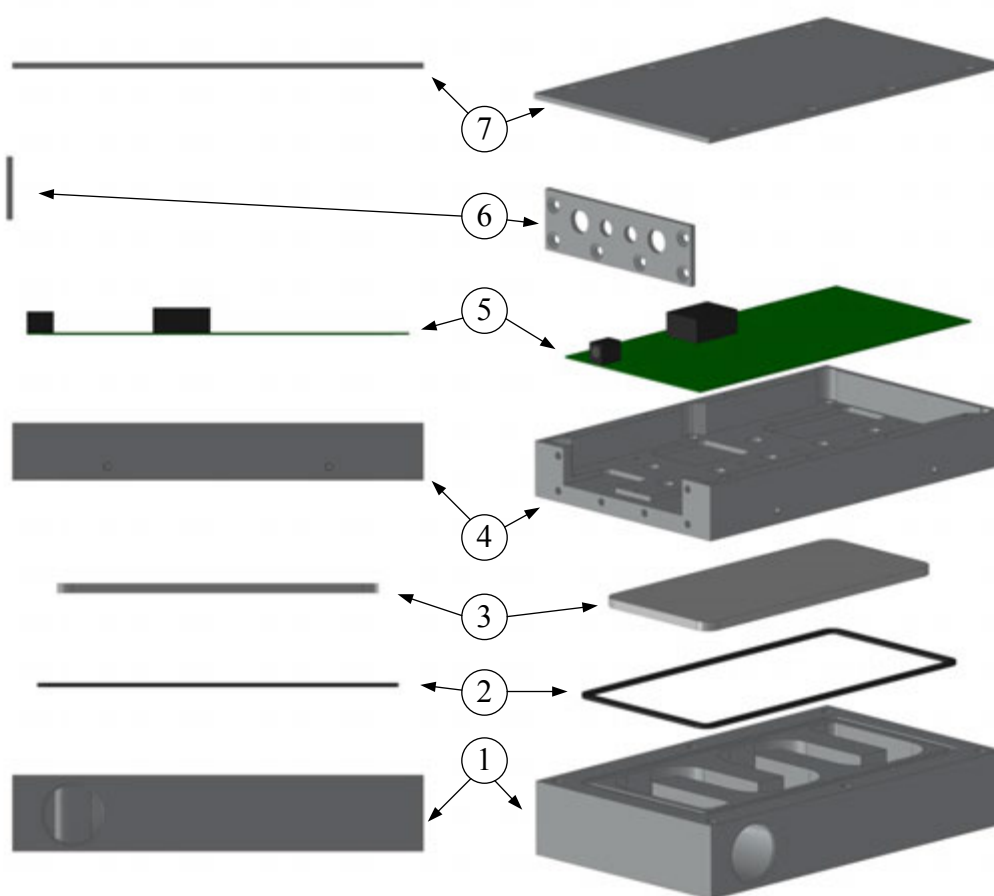
**Těsnění a opticky propustná přepážka** Těsnění mezi aktivním prostorem a horním dílem bylo zhotoveno přesným vyražením dle navržené těsnící drážky. Jako opticky propustná přepážka bylo zvoleno tvrzené sklo, které bylo testováno na tlak až 8 bar. Nevýhodou použitého skla je nezanedbatelný útlum procházejícího světla ( $\sim 14 \%$ ). Tvrzené sklo bylo do horního dílu vlepeno pomocí silikonu.

**Horní díl a deska plošného spoje** Horní díl slouží k utěsnění aktivního prostoru a zároveň odvádí přebytečné teplo z diod. Ve vrchní části jsou vyfrézované drážky pro přesné usazení desky plošného spoje. Konstrukční výkres této části je v příloze A2 (obr. A.5).

**Přední panel a krycí víko** V předním panelu jsou umístěny dva vodotěsné konektory (napájecí a servisní/komunikační) a dvojice indikačních LED. Zelená dioda indikuje přítomnost napájení, červená indikuje zapnuté výkonové LED. Přerušovaným svitem červené LED diody je indikován poruchový stav. Krycí víko slouží k ochraně desky plošného spoje před stříkající vodou a prachem.



**Deska plošného spoje** Deska plošného spoje představuje nosný prvek pro výkonové LED. Jako napájecí napětí fotoreaktoru bylo zvoleno stejnosměrné napětí 24 V, které je standardně dostupné na svorkovnicích obráběcího stroje. K napájení diod byl použit měnič LDD-1000H, který při vstupním napětí 24 V dokáže napájet a regulovat až 9 LED. Jelikož má být fotoreaktor plně autonomní a bezpečný pro trvalý provoz v průmyslu, je nutné monitorovat teplotu jednotlivých LED a v případě překročení stanovené teploty snížit jas diod nebo fotoreaktor úplně vypnout. K tomuto účelu byly zvoleny teplotní čidla TMP175 od Texas Instruments, které komunikují prostřednictvím sériové sběrnice IIC využívající pouze dva vodiče. Regulaci jasu diod a komunikaci s teplotními čidly obstarává 8bitový mikrokontrolér Atmel AVR ATmega168. V návrhu DPS je také zahrnuta ochrana proti zkratu, proti přepětí a proti přepólování. Mikrokontrolér umožňuje posílat data do PC pomocí sériové sběrnice UART. Zároveň je také možné pomocí tohoto rozhraní nahrávat firmware v mikrokontroléru pomocí programové zaváděcí sekce (bootloader). Servisní/komunikační piny jsou z důvodu možného rušení opticky oddělené. Výchozí materiál pro DPS byl zvolen oboustranný skloepoxidový laminát Isola IS410 pro prostředí s vysokou teplotou o tloušťce 1,5 mm. Výška mědi byla zvolena 35  $\mu\text{m}$ . Na spodní straně DPS jsou umístěné výkonové LED, okolo kterých byl navržen definovaný chladič vzor, který je v kontaktu s hliníkovým horním dílem a umožňuje tak pasivní chlazení diod. Schéma DPS je obsahem přílohy A1 (obr. A.1).



Obr. 8.9: Průmyslový fotoreaktor – 3D návrh.

#### d) Ovládací software

Fotoreaktor je vybaven servisním/komunikačním rozhraním, pomocí kterého lze pomocí jednoduchých příkazů (tab. 8.3) zjistit aktuální stav zařízení, aktuální teploty z jednotlivých teplotních čidel a měnit jas diod. Komunikace probíhá prostřednictvím sériové sběrnice UART.

**Tab. 8.3:** Navržené komunikační příkazy.

Příkaz	Dotaz	Odpověď
Aktuální teplota z čidla č.1	>T1	<T1:40 (40 °C)
Aktuální nastavení PWM regulace	>PR	<PR:50 (50 %)
Nastavení hodnoty PWM na 70 %	>PS:70	<PR:70 (potvrzení)
Aktuální nastavení teplotního limitu	>LR	<LR:80 (80 °C)
Nastavení teplotního limitu na 60 °C	>LS:60	<LR:60 (potvrzení)
Pošli počet chyb u čidla č. 3	>E3	<E3:5 (5 chyb)

Navržený program v mikrokontroléru monitoruje v reálném čase aktuální teploty na jednotlivých LED a v případě překročení nastaveného teplotního limitu sníží jas LED diod nebo fotoreaktor úplně vypne.

Během prvních testů prototypu zapojeného u obráběcího stroje bylo potřeba monitorovat stav fotoreaktoru a teploty jednotlivých LED v závislosti na denní době, aktivitě obráběcího stroje a během obměny procesní kapaliny.



**Obr. 8.10:** Ovládací software fotoreaktoru.

V programovacím jazyku LabView byl navržen software (obr. 8.10), který umožňuje: v reálném čase zobrazovat hodnoty z teplotních čidel (1); upozornit uživatele na překročení nastaveného teplotního limitu (2); nastavit jas diod a teplotní limit (3); ukládání hodnot do csv souboru (4) a na konci pracovního dne odešle email s příloženými hodnotami a snímkem obrazovky (5). Hodnoty jsou vykreslovány do přehledného grafu (6), ze kterého lze okamžitě diagnostikovat stav fotoreaktoru.

### e) Parametry fotoreaktoru

Voděodolný fotoreaktor s meandrem pro průchod procesní kapaliny v průmyslovém hliníkovém provedení (obr. 8.11). Parametry fotoreaktoru:

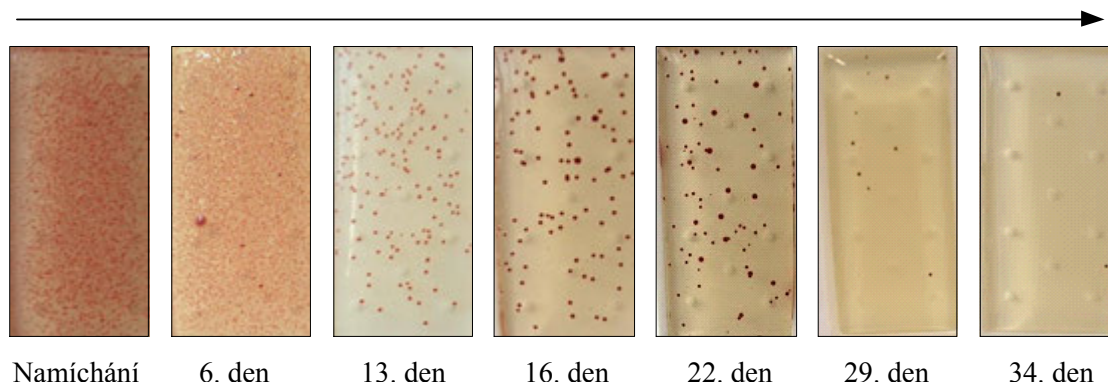
- Osvit kapaliny prostřednictvím 9 LED s vlnovou délkou 660 nm (celkový zářivý tok 5 940 mW).
- Nezávislé měření teploty všech LED s možností záznamu do PC.
- Možnost PWM regulace výkonu LED pomocí mikrokontroléru.
- Možnost vzdálené správy fotoreaktoru přes PC.
- Odolná hliníková konstrukce vhodná pro průmyslová prostředí.
- Připojení pomocí G 1" potrubí.
- Napájecí napětí 24 V stejnosměrné.
- Spotřeba 23 W.
- Ochrana proti přepětí, přepólování a zkratu.
- Rozměry (V×Š×H) 73×130×220 mm.
- Objem aktivního prostoru 330 ml.
- Hmotnost 3,5 kg.
- Maximální tlak 8 bar.



**Obr. 8.11:** Fotografie průmyslového fotoreaktoru.

### f) Testování inhibice mikroorganismů

Pro reálné otestování účinnosti fotodynamické inhibice mikroorganismů pomocí navrženého průmyslového fotoreaktoru byly provedeny dlouhodobé experimenty, při kterých byla použita mikroorganismy kontaminovaná kapalina z reálného obráběcího stroje v Regionálním technologickém institutu (RTI) FST ZČU. Bylo sestaveno 5 kompletních sad fotoreaktor-čerpadlo s připojenými nádobami o objemu 10 litrů. Každý systém obsahoval kapalinu o vstupním mikrobiálním znečištění cca  $10^7$  KTJ/1 ml. Dlouhodobě bylo otestováno několik provozních režimů dle vzájemné kombinace koncentrace fotosenzibilizátoru, doby osvitů a průtoku kapaliny.



**Obr. 8.12:** Dlouhodobé testy fotodynamické inhibice mikroorganismů v řezné emulzi. Objem kapaliny 10 litrů; průtok 40 l/min; doba osvitů 15 s/60 min; koncentrace fotosenzibilizátoru 20 ppm; počáteční mikrobiální znečištění  $10^7$  KTJ/1 ml.

Jednotlivé systémy byly nastaveny tak, aby simulovaly inhibici mikroorganismů v nádrži s procesní kapalinou o objemu 2 400 l, které jsou v průmyslu běžně dostupné (při maximálním výkonu čerpadla 40 l/min trvá přečerpání této nádrže 60 minut). Průtok fotoreaktorem a doba osvitů byly nastaveny tak, aby jednotkový element kapaliny obdržel za 60 minut stejnou energetickou dávku (objem kapaliny 10 litrů, průtok 40 l/min., doba osvitů 15 s/60 min.).

**Závěr** V případě systému s koncentrací fotosenzibilizátoru 20 ppm (obr. 8.12) se podařilo počáteční kontaminaci mikroorganismů  $10^7$  KTJ/1 ml eliminovat o 5 řádů (na cca  $10^2$  KTJ/1 ml) za 30 dní.

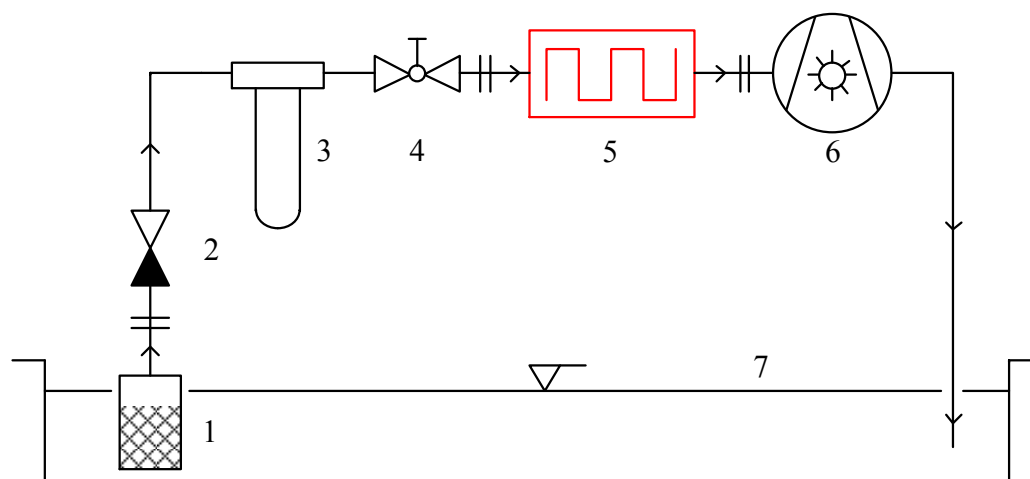
### g) Zapojení fotoreaktoru k obráběcímu stroji

Fotoreaktor lze k obráběcímu stroji připojit přímo do stávajícího čerpacího okruhu procesní kapaliny a nebo do nezávislého okruhu s vlastním čerpadlem. První varianta je nevhodná z pohledu aktivity stroje, neboť při nečinnosti stroje nebude docházet k eliminaci mikroorganismů. Druhým problémem může být provozní tlak, který u větších obráběcích strojů dosahuje až stovek bar. Na takto vysoký tlak je návrh fotoreaktoru značně problematický.

Pro fyzické umístění fotoreaktoru byl tedy zvolen nezávislý okruh s vlastním čerpadlem. Schéma okruhu je naznačeno na obr. 8.13. Nasávání procesní kapaliny začíná sacím

košem (1) přes zpětnou klapku (2), následuje filtr mechanických nečistot (3), který má výměnné patrony s různou úrovní filtrace. Regulace průtoku procesní kapaliny přes meandr fotoreaktoru (5) je řešena prostřednictvím kulového kohoutu (4). Čerpání procesní kapaliny zajišťuje kompaktní monoblokové čerpadlo *Pedrollo PKm60* (6), které vrací kapalinu zpět do zásobního rezervoáru procesní kapaliny v obráběcím stroji (7).

V současné době se dokončuje montáž fotoreaktoru k CNC soustruhu Masturn 50 v Regionálním technologickém institutu FST ZČU (obr. 8.14).



Obr. 8.13: Schéma zapojení fotoreaktoru v nezávislém okruhu s vlastním čerpadlem.



(a)



(b)

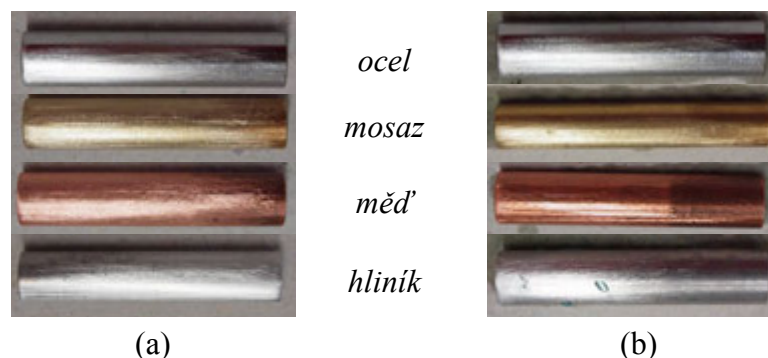
Obr. 8.14: Umístění průmyslového fotoreaktoru u obráběcího stroje. (a) CNC soustruh Masturn 50; (b) Fotografie reálné montáže.

## 8.1.5 Parametry fotosenzibilizátoru pro procesní kapaliny

### a) Vliv přídavku fotosenzibilizátoru na povrch obráběných materiálů

Žádná přidaná látka do procesní kapaliny nesmí způsobovat korozi obráběných materiálů ani jejich trvalé obarvení. Rovněž nesmí způsobovat korozi vnitřních částí stroje. Pro ověření vlivu fotosenzibilizátoru na povrch obráběných materiálů byl připraven mix řezné emulze EM50-120 smícháním 20 ml koncentráту emulze a 400 ml demineralizované vody. Směs byla promíchána 5 minut na magnetické míchače při 650 ot/min. Do vzniklé

kapaliny bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  10% roztoku AIOHFTC. Jednotlivé vzorky byly do řezné kapaliny ponořeny po dobu 60 sekund.

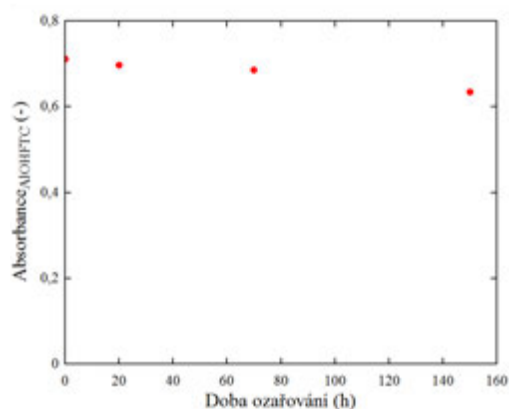


**Obr. 8.15:** Vliv přidavku fotosenzibilizátoru na povrch obráběných materiálů. (a) Před vložením do emulze; (b) Po vyjmutí z emulze.

**Závěr** Po přidání fotosenzibilizátoru do řezné emulze EM50-120 nezanechává emulze na materiálech žádné trvalé stopy.

#### b) Stabilita fotosenzibilizátoru

Pro praktické použití je nutné zajistit dostatečnou stabilitu fotosenzibilizátoru během provozu. Stabilita fotosenzibilizátoru vůči fotodegradaci při provozu byla ověřena v testovací nádrži o objemu 50 l při dávce 0,01 % fotosenzibilizátoru do 5% procesní kapaliny při průtoku 5,5 l/min.



**Obr. 8.16:** Testování stability fotosenzibilizátoru v řezné emulzi. (a) Závislost absorbance AIOHFTC na době ozařování; (b) Experiment.

**Závěr** Nebyl prokázán výrazný rozpad fotosenzibilizátoru vlivem dlouhodobého kontinuálního ozařování.

### c) Katalogový list

**Aplikační forma** 10% vodný roztok sodné soli fotoaktivní substance (pH roztoku 9–11).

**Dávkování** 1 l do 1 000 l obráběcí emulze (5–7% emulze ve vodě) nebo 20 ml do 1 l koncentrátu, který je následně ředěn vodou. Průběžné doplňování do okruhu dle objemu koncentrátu do systému dodaného. Fotosenzibilizátor je rozpustný ve všech běžných typech obráběcích kapalin. Podmínkou je pH vyšší než 7,5 (při poklesu pH dochází k vylučování fotosenzibilizátoru z roztoku).

**Účinný osvit** Viditelné světlo, optimální červené světlo 660–680 nm.

**Stabilita** Obsah fotosenzibilizátoru je nutno kontrolovat 1× týdně spektrofotometricky. Vzorek emulze se naředí přesně: 2 ml do 50 ml odměrné baňky a měří se absorbance při 675 nm. Za základ je brána absorbance při 675 nm u čerstvě připravené emulze. Pokud klesne absorbance na 80 % výchozí hodnoty, je nutno přidat 20 ml roztoku fotosenzibilizátoru na 100 litrů emulze.

**Antimikrobiální účinnost** Fotoaktivní princip působí širokopásmově na všechny typy bakterií, kvasinek a plísní. Dlouhodobé měření prokázalo, že v daném prostředí nedochází u mikroorganismů běžných v prostředí obráběcích kapalin k vytváření rezistencí.

**Toxicita** Antimikrobiální funkce systému je založena na principu interakce fotosenzibilizátoru, světla vhodné vlnové délky a vzdušného kyslíku. Takto se tvoří reaktivní formy kyslíku, které působí antimikrobiálně. Samotný fotosenzibilizátor nevykazuje žádné antimikrobiální účinky, nebyly u něj prokázány žádné toxické účinky na vyšší organismy, stejně jako u jeho rozkladných produktů.



Obr. 8.17: Koncentrát AIOHFTC.

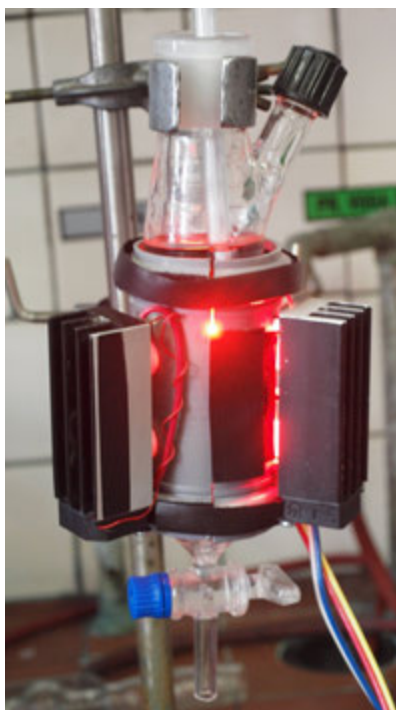
## 8.2 Rozklad nečistot v odpadních vodách

Z pohledu ochrany životního prostředí je znečištění odpadních vod perzistentními organickými látkami velký problém. Hlavními zdroji znečištění jsou především textilní, papírenský a tiskařský průmysl, kde je používáno velké množství syntetických barviv. Syntetická barviva jsou z průmyslových podniků vypouštěna do odpadních vod, kde mohou způsobit vážné ekologické škody. Přítomnost těchto barviv ve vodě snižuje prostupnost slunečního světla přes vodní hladinu a tím narušuje přirozený růst vodních organismů. Některá barviva včetně jejich rozkladných produktů jsou toxická a karcinogenní. Představují tak značné nebezpečí pro vodní živočichy, ale také pro lidi, kteří se znečištěnou vodou přijdou do styku. Odpadní vody obsahující syntetická barviva by proto měly být adekvátně ošetřeny před jejich vypouštěním do okolního prostředí. [50]

Jednou z nepočetnějších skupin organických syntetických barviv představují azobarviva. Molekula azobarviv obsahuje jednu nebo několik azoskupin, které poutají dva i více radikálů pomocí azovazby. Azovazba není pro přírodní látky příliš typická a je velmi rezistentní k biologickému ataku. Z tohoto důvodu je dekolizace azobarviv v odpadních vodách pomocí konvenčních čisticích technik poměrně málo účinná. Průmyslové odpadní vody většinou obsahují různé další sloučeniny, které tento problém ještě více komplikují. [51, 52]

Proto byla v této oblasti navázána spolupráce s pracovištěm COC V Rybitví, kde byly provedeny testy fotooxidačních rozkladů azobarviva Oranž I prostřednictvím ftalocyaninových fotosenzibilizátorů. Pro experimenty byl využit dříve navržený kruhový fotoreaktor (obr. 8.18) s univerzální řídicí jednotkou (kap. 7.3.3).

Rozklad azobarviv probíhal velmi rychle a efektivně a indikuje tak značný potenciál fotosenzibilizačních reakcí jako alternativní metody pro eliminaci organických látek v odpadních vodách. Souhrnná zpráva je obsahem přílohy C1.

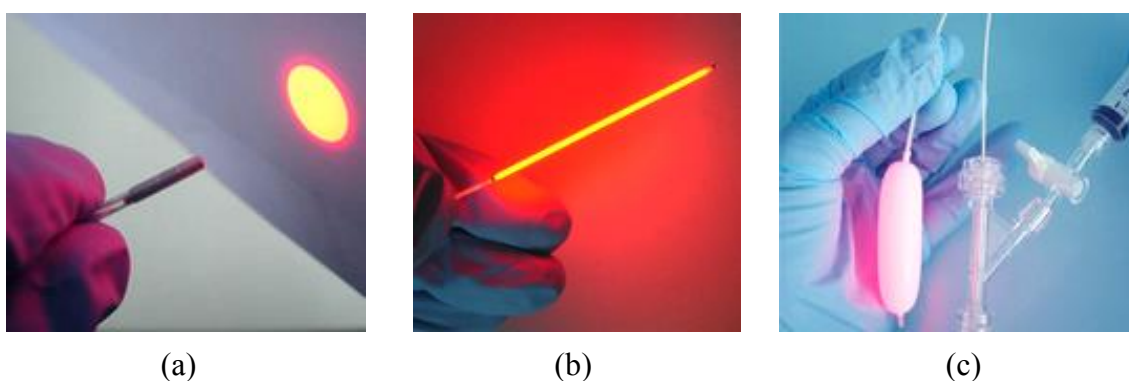


**Obr. 8.18:** Rozklad polutantu Oranž I prostřednictvím ftalocyaninových fotosenzibilizátorů v kruhovém fotoreaktoru.



### 8.3 Fotodynamická terapie maligních nádorů

Fotodynamická terapie (z angl. *Photodynamic Therapy – PDT*) představuje novou metodu léčby kožních a nádorových onemocnění. Jedná se o neinvazivní selektivní fotochemoterapii využívající kombinaci fotodynamicky aktivní látky (fotosenzibilizátor<sup>2</sup>), viditelného světla a přítomnosti kyslíku. Fotosenzibilizátor se v případě léčby maligních nádorů zavádí do krevního řečiště. Následně dochází k selektivní akumulaci fotosenzibilizátoru v neoplastických tkáních. Na retenci fotosenzibilizátorů v tumorech se podílí vedle jejich zvýšené afinity k rychle rostoucím tkáním řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismu tumorů. Tumorová tkáň s akumulovaným fotosenzibilizátorem je ozářena světlem o vhodné vlnové délce shodné s absorpcí maximem fotosenzibilizátoru. U vnitřních nádorů je nutné vést světlo k tumorové tkáni pomocí optických vláken (obr. 8.19 (b)). Po ozáření přenáší excitovaný fotosenzibilizátor absorbovanou energii na volně rozpuštěný kyslík v tkáních za vzniku jeho singletové formy, která způsobuje oxidaci membránových lipidů a proteinů (oxidativní atak), což se projevuje cytolýzou<sup>3</sup> a tumorózní destrukcí. Poškození tumorových cév omezuje vyživování nádoru. Excitovaná forma fotosenzibilizátoru může jiným mechanismem reagovat přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu. Tyto volné radikály jsou pak příčinou destrukce nádoru. Relativní podíl obou mechanismů na destrukci nádoru závisí na typu a koncentraci fotosenzibilizátoru, na koncentraci kyslíku v nádoru a na vazbě mezi fotosenzibilizátorem a substrátem. Oba mechanismy mohou při fotodynamické terapii probíhat současně (vysvětlení mechanismů je v kapitole 3.2). Výsledným terapeutickým efektem je nekróza současně s apoptózou<sup>4</sup> nádorových buněk. Poměrné zastoupení apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí zejména na typu nádoru, na koncentraci fotosenzibilizátoru a také na dávce ozáření. Obrovskou výhodou této léčebné metody je její selektivnost. Oxidativní atak probíhá pouze u nádorových nebo rychle se dělících buněk, které absorbují fotosenzibilizátor rychleji a ve větším množství než okolní zdravé buňky. V současnosti je fotodynamická terapie předmětem studia na řadě špičkových pracovištích ve světě. [2, 9, 54]



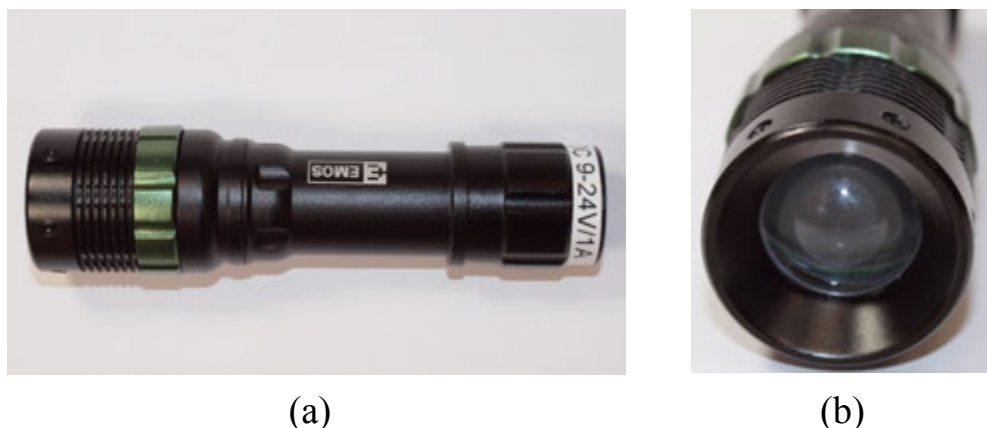
**Obr. 8.19:** Ukázka světelných katetrů pro PDT. (a) Katetr pro plošný osvit; (b) Válcový difuzér; (c) Balónkový katetr. |Převzato s úpravami z: [www.medlight.com](http://www.medlight.com)|

<sup>2</sup>Podrobný popis fotosenzibilizátorů používaných ve fotodynamické terapii v onkologii lze nalézt v literatuře [53].

<sup>3</sup>Rozpad buňky.

<sup>4</sup>Programovaná buněčná smrt.

V této oblasti byla navázána spolupráce s Ústavem biofyziky a informatiky 1. LF UK, kde se problematikou maligních nádorů podrobně zabývají. Účinnost fotodynamické terapie maligních nádorů ověřují na nunu myších<sup>5</sup>. Pro potřeby osvětlení zhoubných nádorů u myši byl navržen jednoduchý světelný LED zdroj s jednou diodou LZ1-00R200. Vzhledem k tomu, že nádor může dosahovat různých velikostí, bylo nutné vyzářovací světelný kužel vhodně zaostřovat. Proto byla LED zabudována do hliníkového těla obsahující v přední části posuvnou čočku (obr. 8.20). LED je umístěna na hliníkovém IMS substrátu. Napájení je řešeno pomocí DC-DC měničem s konstantním proudovým výstupem LDD-1000H a DC adaptéru 9–24 V.



**Obr. 8.20:** Světelný zdroj pro PDT. (a) Hliníkové tělo; (b) Přední zaostřovací čočka.

V provedených pokusech bylo zjištěno, že přenosný diodový zdroj společně s ftalocyaninovým fotosenzibilizátorem je účinný pro fotodynamickou terapii maligních nádorů. Získané výsledky byly dokonce lepší než ty, které byly získány při použití xenonové lampy. Hlavní výhodou je šetrný způsob ozařování tkáně bez nežádoucího zahřívání a možnost snadného a rychlého přenosu přístroje – rozměry světelného zdroje jsou 34×134 mm. Souhrnná zpráva o provedených pokusech je umístěna v příloze C2.

<sup>5</sup>Speciální bezsrsté myši selektivně šlechtěné v laboratořích v různých kmenech. Využívají se hojně k léčbě rakoviny, neboť u holé kůže se dříve projeví eventuální anomálie než u myši osrstěných normálně.

## 8.4 Eliminace vadných bílkovin (prionový protein)

Prionový protein (z angl. *PRoteinaceous Infectious Particles*, označován jako PrP<sup>C</sup>) je přirozený protein ze zvířecích buněk. Je přítomen ve všech savčích buňkách a je exprimován zvláště v nervových buňkách a buňkách imunitního systému. Jeho fyziologická funkce je nejasná, zřejmě se podílí na synaptickém přenosu a diferenciaci buněk. Tento protein se může stát vysoce infekčním – hovoříme o vadném prionovém proteinu (PrP<sup>Sc</sup> nebo PrP<sup>TSE</sup>). Tato mutovaná forma je vysoce odolná vůči degradačním procesům uvnitř buňky, může se vázat na další PrP<sup>C</sup> proteiny a vyvolávat i u nich konformační změnu na PrP<sup>Sc</sup>. Toxické působení špatně odbouratelného PrP<sup>Sc</sup> a nedostatek fyziologického PrP<sup>C</sup> se poté spolupodílejí na vzniku prionových onemocnění (transmisivní spongiformní encefalopatie – TSE). Celkem je známo 9 hlavních onemocnění způsobených priony. Nejčastější chorobou u lidí (85 %) je Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJN). U zvířat je nejznámější nemocí bovinní spongiformní encefalopatie – tzv. nemoc šílených krav. Patologická forma prionového proteinu je rezistentní vůči proteasam<sup>6</sup> a konvenčním dezinfekčním procesům. Hromadění agregátů zmutovaných forem prionových proteinů v centrální nervové soustavě způsobuje neurodegenerativní poruchy končící smrtí jedince. [55, 56]

Ačkoliv doposud nebyla nalezena účinná terapie, byly nalezeny látky s inhibiční anti-prionovou aktivitou – ftalocyaniny a jejich deriváty. Ve spolupráci s Prionovou laboratoří Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK bylo prokázáno, že patologickou formu prionového proteinu lze účinně fotodynamicky inaktivovat ftalocyaninovým fotosenzibilizátorem s námi navrženými osvitovými LED jednotkami. První jednotka je verze kruhového fotoreaktoru (obr. 8.21 (a)), který byl podrobně popsán v kapitole 7.3.2. Obsahuje celkem šest elektroluminiscenčních diod LZ1-00R200, řízení osvitů je realizováno opět prostřednictvím navržené řídicí jednotky (kap. 7.3.3). Pro realizaci rozsáhlejších experimentů byla navržena osvitová jednotka pro osvit prionových proteinů v mikrotitračních destičkách 96jamkového formátu (obr. 8.21 (b)). Pro osvit jednotlivých jamek byly v tomto případě použity elektroluminiscenční diody KingBright W53SRC/E.

Získané výsledky experimentů indikují potenciál pro využití fotodynamické inaktivace vadných prionových proteinů ke sterilizaci priony kontaminovaných biologických a chirurgických nástrojů. Souhrnná výzkumná zpráva je obsahem přílohy C3.



(a)



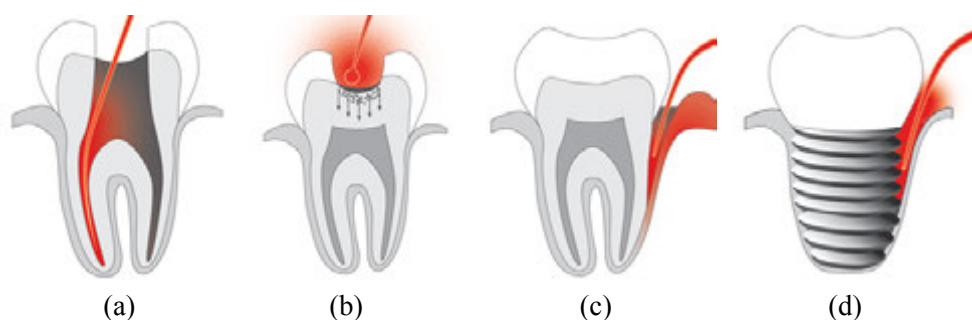
(b)

**Obr. 8.21:** Osvitové jednotky pro Prionovou laboratoř. (a) Kruhový fotoreaktor; (b) 96diodový světelný zdroj.

<sup>6</sup>Skupina enzymů, které způsobují degradaci nepotřebných nebo poškozených proteinů.

## 8.5 Fotodynamická inaktivace mikroorganismů ve stomatologii

Zubní kazy, paradentóza, infekce kořenových kanálků, záněty okolo implantátů nebo nekróza zubní dřeně (pulpy) jsou bakteriální infekční onemocnění, se kterými se lze běžně setkat v oblasti zubního lékařství. Základem ošetření těchto onemocnění je účinné odstranění mikroorganismů, které jsou původci zánětu, a zabránění dalšímu napadení zdravé tkáně. V současné době proto velmi vzrostl zájem o fotodynamickou antimikrobiální terapii (PACT) jako alternativní metodu k chemickým antibakteriálním látkám – dezinfekčním prostředkům a antibiotikům, u kterých může vzniknout nežádoucí rezistence. [57]

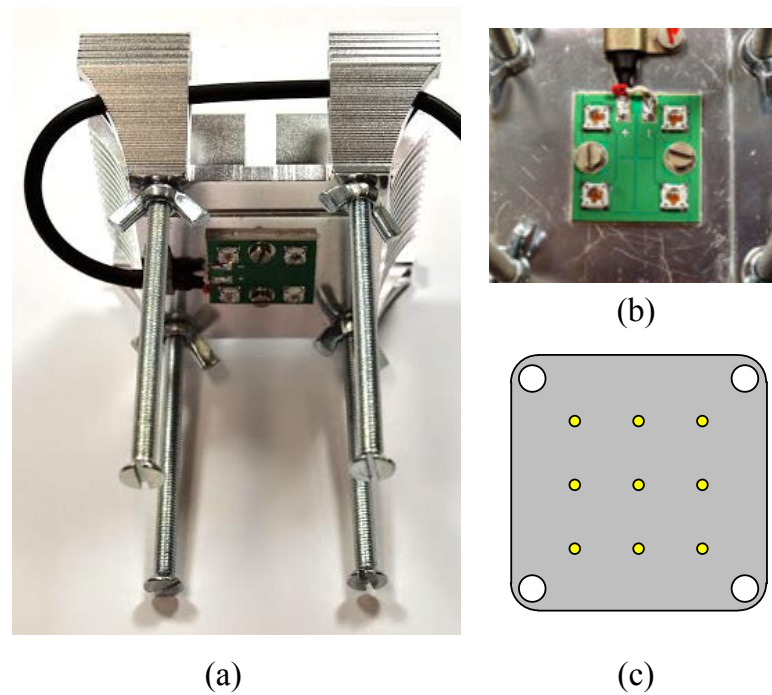


**Obr. 8.22:** Fotodynamická antimikrobiální terapie ve stomatologii. (a) Léčba kořenového kanálku; (b) Léčba zubního kazu; (c) Léčba paradentózy; (d) Léčba zánětu okolo zubního implantátu. [Převzato s úpravami z: [58]]

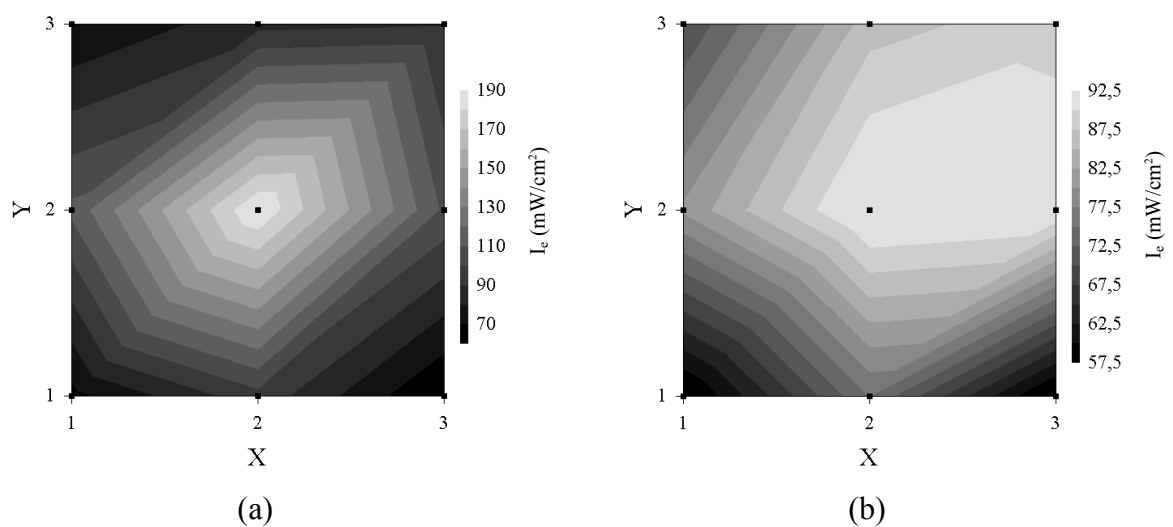
V rámci spolupráce s Centrem organické chemie a Fakultní nemocnicí v Hradci Králové byl navržen systém pro ověření účinku fotodynamické antimikrobiální terapie pomocí ftalocyaninových fotosenzibilizátorů a světelného LED zdroje. Systém obsahuje čtyři elektroluminiscenční diody LZ1-00R200 a je koncipován tak, aby bylo možné měnit vzdálenost LED od ozařované plochy (obr. 8.23 (a)). Jako nosný substrát pro elektroluminiscenční diody byl zvolen hliníkový IMS substrát o rozměrech 25×25 mm, který je umístěn na hliníkovém chladiči. Pro nastavení doby osvětlení a výkonu LED byla použita dříve navržená řídicí jednotka (detailnější popis viz kap. 7.3.3). Optimální vzdálenost diod od ozařovaného povrchu byla na základě měření homogenity (obr. 8.24) stanovena na 3,5 cm. Systém byl pojmenován Stomaset.

Fotoinaktivační efektivita navrženého systému byla pomocí kmenů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* a *Trichophyton mentagrophytes* porovnána s komerčně dostupným systémem Fotosan. Na základě přežívání počtu mikrobů po ozáření k počtu mikrobů v kontrolních vzorcích (tzv. survival fraction) na skarifikované prasečí kůži vykazoval námi navržený systém Stomaset větší účinnost než systém Fotosan. Souhrnná výzkumná zpráva je obsahem přílohy C4.

V současné době se vyvinutý systém Stomaset přizpůsobuje pro reálné nasazení ve stomatologii.



**Obr. 8.23:** Laboratorní zařízení Stomaset. (a) Fotografie osvitového systému; (b) Detail umístění LED; (c) Navržená clonka pro měření homogenity osvitu.



**Obr. 8.24:** Homogenita osvitu. (a) Vzdálenost 2,5 cm; (b) Vzdálenost 3,5 cm.

## 9 Závěr

Předložená práce shrnuje klíčové poznatky z oblasti fotosenzibilizačních reakcí kyslíku a jejich praktických aplikací v průmyslu, zdravotnictví a ochraně životního prostředí. Princip těchto reakcí je založen na ozáření fotodynamicky aktivní látky (fotosenzibilizátoru), která v excitovaném stavu přenáší absorbovanou energii na přítomný molekulární kyslík za vzniku jeho vysoce reaktivních forem způsobujících oxidativní destrukci mikroorganismů nebo rozklad nežádoucích chemických látek.

Za vědecký přínos této práce je možné považovat nalezení vhodné kombinace organického fotosenzibilizátoru a světelného LED zdroje pro efektivní generování reaktivních forem kyslíku prostřednictvím fotosenzibilizačních reakcí a stanovení optimálního režimu fotoiniciace.

Praktickým přínosem této práce je navržený laboratorní fotoreaktor GSO-1 s univerzální řídicí jednotkou, který v současné době využívá několik vědeckých týmů v České republice ke studiu fotosenzibilizačních reakcí z oblasti lékařství a ochrany vod. Pomocí tohoto fotoreaktoru lze také pomocí porovnávací metody rychle stanovit kvantový výtěžek libovolného fotosenzibilizátoru.

Dalším významným přínosem je také vyvinutí unikátního systému pro fotodynamickou inhibici mikroorganismů v procesních kapalinách. Systém se skládá z průmyslového fotoreaktoru s aktivním prostorem a vodného roztoku fotosenzibilizátoru. Využití fotodynamicky aktivních aditiv do procesních kapalin doposud nebylo nikde ve světě prakticky použito a tato technologie je legislativně chráněna užitným vzorem. Jedná se o novou alternativní metodu šetrné inhibice mikroorganismů v procesních kapalinách nahrazující konvenční biocidní preparáty. O uvedenou technologii projeví zájem dva komerční subjekty z oblasti strojírenského průmyslu zabývající se tvářením a obráběním kovů. V současné době probíhá testování systému v reálném výrobním provozu.

V rámci disertační práce byly splněny vytyčené cíle následovně:

### 1) Charakterizace a výběr organického materiálu schopného generovat reaktivní formy kyslíku.

V rámci úzké spolupráce s Centrem organické chemie byla syntetizována skupina organických látek na bázi ftalocyaninů a jejich derivátů, kde hlavním parametrem byla výrazná absorpce v oblasti červeného světla spojená s efektivní penetrací biologické tkáně, dále značná teplotní stabilita, odolnost vůči fotodegradaci a nízká toxicita. Výše zmíněné parametry byly experimentálně ověřeny u několika vzorků ftalocyaninů (viz kapitola 7.1). Dále byla diskutována také agregace ftalocyaninů a její potlačení. Z testovaných materiálů dosahovala nejlepších výsledků sodná sůl sulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu (AlOHFTC).

## 2) Návrh vhodného světelného LED zdroje a optimalizace režimu fotoiniciace.

V rámci tohoto cíle byla provedena rešerše výkonových elektroluminiscenčních diod s maximem emisního spektra odpovídajícím maximu absorpčního spektra fotosenzibilizátoru, což představuje důležitý parametr z pohledu účinnosti fotosenzibilizační reakce. Na základě emisních spekter byla pro další testy vybrána dioda LZ1-00R200 od výrobce LEDEngin, u které se podrobně změřily a stanovily elektrické i radiometrické parametry. Nejdůležitějším experimentem bylo určení účinnosti světelné absorpce fotosenzibilizátorem. Výše zmíněné parametry byly použity pro stanovení optimálního režimu světelné iniciace fotosenzibilizátoru.

## 3) Realizace a zhodnocení osvitových jednotek pro vybrané aplikace.

Závěry experimentální části, potvrzující schopnost zvoleného organického materiálu a světelného LED zdroje efektivně generovat reaktivní formy kyslíku, byly využity v několika reálných aplikacích. Organický fotosenzibilizátor a světelný LED zdroj se staly univerzálními základními elementy využívajícími fotodynamického efektu v oblasti průmyslu, zdravotnictví a ochrany životního prostředí:

### a) Fotodynamická inaktivace mikroorganismů v procesních kapalinách

V současnosti se používají pro potlačení mikrobiální kontaminace v procesních kapalinách biocidní preparáty, které představují značné zdravotní riziko pro obsluhu a pro životní prostředí. Při používání biocidů také vzniká nežádoucí rezistence mikroorganismů a je tedy nutné neustále zvyšovat dávky biocidních přípravků na bázi látek uvolňujících formaldehyd. Snahou je nahradit tyto chemické preparáty šetrnějšími látkami. Fotosenzibilizační reakce s ftalocyaninovými deriváty se ukázala být účinnou a šetrnou metodou inhibice mikroorganismů. V oblasti procesních kapalin se jedná o naprosto novou metodu, která nikdy předtím nebyla prakticky použita. Proto je navržený systém fotodynamické inaktivace mikroorganismů v prostředí procesních kapalin legislativně chráněn užitným vzorem, jehož celé znění je v příloze B. Účinnost systému byla potvrzena sérií experimentů (kapitola 8.1.4).

### b) Čištění odpadních vod

Znečištění odpadních vod perzistentními organickými látkami je v současnosti velký problém. Konvenční čisticí techniky pro odstranění těchto látek jsou málo účinné. Proto byla v této oblasti navázána spolupráce s pracovištěm Centra organické chemie, kde byly provedeny testy fotooxidačních rozkladů modelového polutantu Oranž I prostřednictvím ftalocyaninových fotosenzibilizátorů. Účinnost systému komentuje Ing. J. Rakušan, Ph.D. slovy: „Vzhledem k rychlosti a účinnosti popsaného fotooxidačního rozkladu modelového polutantu Oranže I lze oprávněně navrhnout další studium procesu, zaměřené na vývoj průtočného kontinuálního fotooxidačního reaktoru, vhodného k dekontaminaci barevných odpadních vod. Závěrem je rovněž vhodné konstatovat, že bez správně navrženého a zkonstruovaného kruhového, diodového reaktoru by výše uvedené výsledky nebylo možné získat.“ Souhrnná zpráva je umístěna v příloze C1.

### c) Fotodynamická terapie maligních nádorů

Ve fotodynamické terapii je v současné době snaha nahradit používané fotosenzibilizátory I. generace novými fotoaktivními látkami, které eliminují nevýhody látek I. generace. Jedná se zejména o kožní fotosenzitivitu a nutnost použití

krátkovlnného světelného záření pro excitaci fotosenzibilizátoru, které špatně proniká do tkání. V této oblasti byla navázána spolupráce s Ústavem biofyziky a informatiky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kde se problematikou maligních nádorů podrobně zabývají. Cituji zde závěry doc. RNDr. P. Poučkové, CSc.: „*V pokuse bylo zjištěno, že přenosný diodový zdroj je účinný pro fotodynamickou terapii maligních nádorů. Získané výsledky byly dokonce lepší než ty, které jsme získali při použití xenonové lampy. Výhodou je, že se jedná o šetrnější způsob ozařování, protože u xenonové lampy se uplatňuje i tepelný účinek záření, dále i možnost rychlého přenosu přístroje v laboratořích podle potřeby. Hlavní výhodou se může stát i možnost jeho zakoupení obvodními lékaři pro rychlé ošetření pacientů.*“ Souhrnná zpráva je umístěna v příloze C2.

**d) Fotodynamická inaktivace prionových proteinů**

V oblasti vadných bílkovin, tzv. prionových proteinů, se ukázala metoda fotodynamické inaktivace jako velmi účinná. Cituje zde závěry Mgr. M. Kostelanské z Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, se kterou byla navázaná spolupráce v této oblasti: „*Doposud získané výsledky indikují potenciál pro využití fotodynamické inaktivace Pr<sup>PTSE</sup> v přítomnosti FTC ke sterilizaci priony kontaminovaných biologických a chirurgických nástrojů, které jsou zdrojem iatrogenní CJD. Podaří-li se prokázat vyšší afinita ftalocyaninů k patologické formě prionového proteinu oproti jiným biomolekulám a biologickým strukturám, lze také uvažovat o využití fotodynamické inaktivace k šetrné sterilizaci biologických tekutin.*“ Souhrnná zpráva je umístěna v příloze C3.

**e) Fotodynamická inaktivace mikroorganismů ve stomatologii**

V této oblasti byla prostřednictvím Centra organické chemie navázána spolupráce s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové, kde byl experimentálně ověřen antimikrobiální účinek ftalocyaninových fotosenzibilizátorů ozářených navrženým systémem Stomaset v porovnání s komerčně dostupným přístrojem Fotosan. Dle Ing. J. Černého, Ph.D. z Centra organické chemie: „*Systém Stomaset byl účinnější než Fotosan; oba ftalocyaniny vykazovaly nejsilnější in vitro efekt proti kmenům hub *C. albicans* a *T. mentagrophytes*, z bakterií byla citlivější *E. coli* než *S. aureus*.*“ Souhrnná zpráva je umístěna v příloze C4.



# Literatura

- [1] LANG, K., MOSINGER, J., WAGNEROVÁ, D.M. Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, s. 211–221. ISSN 1213-7103.
- [2] KOLÁŘOVÁ, H. Fotodynamická terapie. In: *Klinická radiobiologie*. Praha: Manus, 2005, s. 171–175. ISBN 80-86571-09-2.
- [3] WÖHRLE, D., HIRTH, A., BOGDAHN-RAI, T., SCHNURPFEIL, G., SHOPOVA, M. Photodynamic therapy of cancer: Second and third generations of photosensitizers. *Russian Chemical Bulletin* [online]. 1998, roč. 47, č. 5, s. 807–816. ISSN 1066-5285, 1573-9171. Dostupné z: doi:10.1007/BF02498146
- [4] DEROSA, M.C., CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2002, roč. 233, s. 351–371. Dostupné z: doi:10.1016/S0010-8545(02)00034-6
- [5] BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* [online]. 2008, roč. 27, č. 4, s. 227–238. ISSN 10855629. Dostupné z: doi:10.1016/j.sder.2008.08.003
- [6] REDDY, V.N., K, R.R., G, C., SEHRAWAT, S. Photodynamic Therapy. *Indian Journal of Dental Advancements*. 2009, roč. 1, č. 1, s. 46–50.
- [7] BRANCALEON, L., MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*. 2002, roč. 17, č. 3, s. 173–186.
- [8] PIESLINGER, A., PLAETZER, K., OBERDANNER, C.B., BERLANDA, J., MAIR, H., KRAMMER, B., KIESSLICH, T. Characterization of a simple and homogeneous irradiation device based on light-emitting diodes: A possible low-cost supplement to conventional light sources for photodynamic treatment. *Medical Laser Application* [online]. 2006, roč. 21, č. 4, s. 277–283. ISSN 16151615. Dostupné z: doi:10.1016/j.mla.2006.07.004
- [9] LANG, K., MOSINGER, J., WAGNEROVÁ, D.M. Singletový kyslík v praxi - současnost a perspektiva. *Chemické listy*. 2006, roč. 100, s. 196–177. ISSN 1213-7103.
- [10] RYCHTÁRIKOVÁ, R., KUNCOVÁ, G. Imobilizované fotosensitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy. *Chemické listy*. 2009, roč. 103, s. 800–813. ISSN 1213-7103.
- [11] PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., PEČ, P. Oxidativní stres-Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degenerace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, s. 455–466.

- [12] MACIA, N., HEYNE, B. Using photochemistry to understand and control the production of reactive oxygen species in biological environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2015, roč. 306, s. 1–12. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2015.03.011
- [13] SCHMITT, F.-J., RENGER, G., FRIEDRICH, T., KRESLAVSKI, V.D., ZHAR-MUKHAMEDOV, S.K., LOS, D.A., KUZNETSOV, V.V., ALLAKHVERDIEV, S.I. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signalling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2014 [vid. 17. únor 2014]. ISSN 0005-2728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2014.02.005
- [14] PAVELKOVÁ, A. *Využití chemiluminiscence při studiu fotodynamické produkce reaktivních forem kyslíku*. Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [15] DOSTÁLOVÁ, K. *Reaktivní volné radikály, kalciový signál a kalciová hypotéza*. Učební text. Univerzita Palackého. Olomouc, 2008.
- [16] GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J.L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2005, roč. 65, č. 2–3, s. 45–80. ISSN 0165-022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003
- [17] COXON, J.M., HALTON, B. *Organic Photochemistry*. Cambridge University Press, 1987. ISBN 978-0-521-32067-2.
- [18] KLÁN, P. *Organická fotochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-210-2526-3.
- [19] MIN, D.B., BOFF, J.M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002, roč. 1, č. 2, s. 58–72.
- [20] PAPAGNI, A. Organic Photochemistry. *Encyclopedia of life support systems (EOLSS)*. 2011. Organic and Biomolecular Chemistry.
- [21] ZAHRADNÍKOVÁ, H. *Barva v organických molekulách*. Vysoké učení technické v Brně. 2004
- [22] TÁBORSKÝ, P., PREISLER, J. *Molekulová luminiscence*. Ústav chemie, Masarykova univerzita Brno. 2014.
- [23] ČERNÝ, J., KARÁSKOVÁ, M., RAKUŠAN, J., NEŠPŮREK, S. Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2010, roč. 210, č. 1, s. 82–88. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2009.11.016
- [24] WU, H., SONG, Q., RAN, G., LU, X., XU, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, roč. 30, č. 1, Characterization, Analysis and Risks of Nanomaterials in Environmental and Food Samples, s. 133–141. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.08.009

- [25] NARDI, G., MANET, I., MONTI, S., MIRANDA, M.A., LHIAUBET-VALLET, V. Scope and limitations of the TEMPO/EPR method for singlet oxygen detection: the misleading role of electron transfer. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2014, roč. 77, s. 64–70. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.020
- [26] MOSINGER, J., MOSINGER, B. Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia*. 1995, roč. 51, č. 2, s. 106–109. ISSN 0014-4754.
- [27] CHANG, C.-C., YANG, Y.-T., YANG, J.-C., WU, H.-D., TSAI, T. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dyes and Pigments* [online]. 2008, roč. 79, č. 2, s. 170–175. ISSN 01437208. Dostupné z: doi:10.1016/j.dyepig.2008.02.003
- [28] JI, Z., ISMAIL, M.N., CALLAHAN, D.M., WARZYWODA, J., SACCO, A. Transition metal ion substitution in titanosilicate ETS-10 for enhanced UV light photodegradation of methylene blue. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2011, roč. 221, č. 1, s. 77–83. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2011.04.027
- [29] BRAHIMI, R., BESSEKHOUD, Y., BOUGUELIA, A., TRARI, M. Improvement of eosin visible light degradation using PbS-sensitized TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2008, roč. 194, č. 2-3, s. 173–180. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2007.08.008
- [30] UTTAMLAL, M., SHEILA HOLMES-SMITH, A. The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. *Chemical Physics Letters* [online]. 2008, roč. 454, č. 4–6, s. 223–228. ISSN 0009-2614. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2008.02.012
- [31] KLUSON, P., DROBEK, M., KALAJI, A., ZARUBOVA, S., KRYSA, J., RAKUSAN, J. Singlet oxygen photogeneration efficiencies of a series of phthalocyanines in well-defined spectral regions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2008, roč. 199, č. 2–3, s. 267–273. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2008.06.003
- [32] PLÍŠTILOVÁ, L. *Syntéza a fyzikální vlastnosti tetrapiperazinopyrazinoporfyrazinů*. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [33] ISHII, K. Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2012, roč. 256, č. 15-16, s. 1556–1568. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2012.03.022
- [34] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., BEZDĚKOVÁ, E., LOUČKOVÁ, P., NEKOVÁŘOVÁ, J., KARÁSKOVÁ, M., RAKUŠAN, J., ČERNÝ, J., KOŘÍNKOVÁ, R. Využití ftalocyaninových preparátů šetrných k prostředí k ochraně okruhů chladicích vod před růstem řas a sinic. *Chemické listy*. 2007, roč. 101, s. 315–322. ISSN 1213-7103.
- [35] PALEWSKA, K., SUJKA, M., URASIŃSKA-WÓJCIK, B., SWORAKOWSKI, J., LIPIŃSKI, J., NEŠPŮREK, S., RAKUŠAN, J., KARÁSKOVÁ, M. Light-induced effects in sulfonated aluminum phthalocyanines — potential photosensitizers in the photodynamic therapy: Spectroscopic and kinetic study. *Journal of Photochemistry*

- and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2008, roč. 197, č. 1, s. 1–12. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2007.11.025
- [36] SPAGNUL, C., TURNER, L.C., BOYLE, R.W. Immobilized Photosensitisers for antimicrobial applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2015 [vid. 12. květen 2015]. ISSN 1011-1344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021
- [37] BIYIKLIOGLU, Z., ACAR, I. Peripheral and non-peripheral long-chain tetrasubstituted phthalocyanines - Synthesis spectroscopic characterization and aggregation properties. *Synthetic Metals* [online]. 2012, roč. 162, č. 13-14, s. 1156–1163. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2012.04.032
- [38] SKŘIVANOVÁ, K. *Studium potenciálního fotosenzibilizátoru indocyaninové zeleně in vitro*. Brno, 2006. Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [39] ZHU, T.C., FINLAY, J.C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics* [online]. 2008, roč. 35, č. 7, s. 3127–3136. ISSN 0094-2405. Dostupné z: doi:10.1118/1.2937440
- [40] NAGATA, J.Y., HIOKA, N., KIMURA, E., BATISTELA, V.R., TERADA, R.S.S., GRACIANO, A.X., BAESSO, M.L., HAYACIBARA, M.F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2012, roč. 9, č. 2, s. 122–131. ISSN 1572-1000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2011.11.006
- [41] WILSON, B.C., PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* [online]. 2008, roč. 53, č. 9, s. R61–R109. ISSN 0031-9155, 1361-6560. Dostupné z: doi:10.1088/0031-9155/53/9/R01
- [42] MOSINGER, J., MIČKA, Z. Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetrakis(sulphonatophenyl) porphine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 1997, roč. 107, č. 1–3, s. 77–82. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/S1010-6030(96)04613-8
- [43] LAPOK, L. *Synthesis and photocatalytic properties of new water-soluble phthalocyanines and related compounds*. 2006. Disertační práce. Universität Bremen.
- [44] SCHUBERT, E.F. *Light-emitting diodes*. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN 0-521-86538-7.
- [45] INTERNATIONAL COMMISSION ON ILLUMINATION, ed. *Measurement of LEDs*. 2. ed. Vienna: CIE, 2007. CIE technical report, 127. ISBN 978-3-901906-58-9.
- [46] SOKANSKÝ, K., NOVÁK, T., BÁLSKÝ, M., BLÁHA, Z., CARBOL, Z., DIVIŠ, D., SOCHA, B., ŠNOBL, J., ŠUMPICH, J., ZÁVADA, P. *Světelná technika*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2011. ISBN 978-80-01-04941-9.
- [47] BÁLSKÝ, M., HABEL, J. Modernizace goniofotometru. *Světlo*. 2009, roč. 2009, č. 4, s. 54–57.

- [48] GUO, W., JIA, X., YIN, F., CUI, B., GAO, W., LIU, Y., YAN, W. Characteristics of high power LEDs at high and low temperature. *Journal of Semiconductors* [online]. 2011, roč. 32, č. 4, s. 044007. ISSN 1674-4926. Dostupné z: doi:10.1088/1674-4926/32/4/044007
- [49] BONACIN, J.A., ENGELMANN, F.M., SEVERINO, D., TOMA, H.E., BAPTISTA, M.S. Singlet Oxygen Quantum Yields in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, roč. 20, č. 1, s. 31–36.
- [50] BAKHEET, B., YUAN, S., LI, Z., WANG, H., ZUO, J., KOMARNENI, S., WANG, Y. Electro-peroxone treatment of Orange II dye wastewater. *Water Research* [online]. 2013, roč. 47, č. 16, s. 6234–6243. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2013.07.042
- [51] ALLARD, A.-S., NEILSON, A.H. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. 1997, roč. 39, č. 4, s. 253–285. ISSN 0964-8305. Dostupné z: doi:10.1016/S0964-8305(97)00021-8
- [52] AVRAMOVA, T., STEFANOVA, L., ANGELOVA, B., MUTAFOV, S. Bacterial Decolorization of Acid Orange 7 in the Presence of Ionic and Non-Ionic Surfactants. *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2007, roč. 62, č. 1-2 [vid. 17. květen 2015]. ISSN 1865-7125, 0939-5075. Dostupné z: doi:10.1515/znc-2007-1-216
- [53] ALLISON, R.R., SIBATA, C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2010, roč. 7, č. 2, s. 61–75. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001
- [54] JIRÁSEK, L., JIRÁSKOVÁ, M. Kosmetické výhody terapie některých kožních nemocí pomocí fotodynamicky aktivních látek. *Dermatologie pro praxi.* 2007, roč. 1, č. 3, s. 107–109. ISSN 1803-5337.
- [55] JANOUSKOVA, O., RAKUSAN, J., KARASKOVA, M., HOLADA, K. Photodynamic inactivation of prions by disulfonated hydroxyaluminium phthalocyanine. *Journal of General Virology* [online]. 2012, roč. 93, č. Pt-11, s. 2512–2517. ISSN 0022-1317, 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.044727-0
- [56] Moderní metody detekce prionových proteinů. *Laboratoř metalomiky a nanotechnologií.* [online]. 10.8.2015. Dostupné z: <http://web2.mendelu.cz>
- [57] BOUILLAGUET, S., WATAHA, J.C., ZAPATA, O., CAMPO, M., LANGE, N., SCHRENZEL, J. Production of reactive oxygen species from photosensitizers activated with visible light sources available in dental offices. *Photomedicine and Laser Surgery* [online]. 2010, roč. 28, č. 4, s. 519–525. ISSN 1557-8550. Dostupné z: doi:10.1089/pho.2009.2505
- [58] The Photodynamic Therapy in the dentistry. *Medizinische Laser Technologie GmbH.* [online]. 10.8.2015. Dostupné z: <http://www.mlt-laser.com>

# Seznam publikací autora

## Publikace vztahující se k předmětu disertační práce

### Vysokoškolská kvalifikační práce (Teze disertační práce)

- [1] FREISLEBEN, J. *Využití singletových stavů kyslíku v biologických a průmyslových aplikacích*. Plzeň, Západočeská univerzita, 2013, 33 s.

### Stať ve sborníku

- [1] FREISLEBEN, J., HAMÁČEK, A., VIK, R., ČERNÝ, J., KROUPA, M., DŽUGAN, T. Design of a singlet oxygen generator based on LED emitters. In *35th International Spring Seminar on Electronics Technology - Power Electronics*. Piscataway: IEEE, 2012. s. 47–49. ISBN: 978-1-4673-2241-6 , ISSN: 2161-2528.  
★Obdrženo ocenění „Excellent Poster Award for Young Scientist“.
- [2] FREISLEBEN, J. Konstrukce generátoru pro tvorbu singletního kyslíku. In *Elektrotechnika a informatika 2012*. Část 2., Elektronika. Plzeň, Západočeská univerzita v Plzni, 2012. s. 37–38. ISBN: 978-80-261-0119-2
- [3] FREISLEBEN, J. Organické fotosenzitivní látky. In *Elektrotechnika a informatika 2013*. Část 1., Elektrotechnika. Plzeň, Západočeská univerzita v Plzni, 2013. s. 25–28. ISBN: 978-80-261-0233-5
- [4] FREISLEBEN, J. Reaktivní formy kyslíku. In *Elektrotechnika a informatika 2014*. Část 1., Elektrotechnika. Plzeň, Západočeská univerzita v Plzni, 2014. s. 17–20. ISBN: 978-80-261-0367-7
- [5] FREISLEBEN, J., DŽUGAN, T., HAMÁČEK, A. Comparative study of printed circuit board substrates used for thermal management of high power LEDs. In *Proceedings of the 2015 38th International Spring Seminar on Electronics Technology (ISSE 2015)*. Piscataway: IEEE, 2015. s. 1–5. ISBN: 978-963-313-177-0

### Užitný vzor

- [1] HAMÁČEK, A., ŘEBOUN, H., FREISLEBEN, J., PRETL, S., VIK, R., KUBÁČ, L., KARÁSKOVÁ, M. *Zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem*. 2015

**Funkční vzorek**

- [1] ŘEBOUN, J., HAMÁČEK, A., FREISLEBEN, J., KARÁSKOVÁ, M., RAKUŠAN, J., DŽUGAN, T., KROUPA, M. *Laboratorní fotoreaktor pro generaci singletních stavů GSO-1*. 2011.
- [2] HAMÁČEK, A., ŘEBOUN, J., FREISLEBEN, J., KROUPA, M., RAKUŠAN, J. *Osvětová jednotka pro aktivaci fotosenzitizátorů na mikrotitračních destičkách*. 2012.
- [3] ŘEBOUN, J., HAMÁČEK, A., FREISLEBEN, J., PRETL, S., VIK, R. *Fotoinic-  
ační systém pro ochranu řezných kapalin*. 2014.

**Ostatní publikace****Stat' ve sborníku**

- [1] KUBERSKÝ, P., HAMÁČEK, A., KROUPA, M., FREISLEBEN, J. Sensors Elements for Micro-calorimetric Measurements. In *ISSE 2011*. Piscataway, NJ: IEEE, 2011. s. 572-576. ISBN: 978-1-4577-2112-0 , ISSN: 2161-2528
- [2] FREISLEBEN, J., KROUPA, M. Zpracování signálů ze senzorů na bázi IDE struktur. In *Elektrotechnika a informatika 2011*. Část 2., Elektronika. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2011. s. 25-26. ISBN: 978-80-261-0015-7
- [3] KROUPA, M., KUBERSKÝ, P., FREISLEBEN, J., HAMÁČEK, A., ŘEBOUN, J. Data acquisition from microcalorimetric sensors. In *Electronic Devices and Systems IMAPS CS International Conference 2011*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2011. s. 223-228. ISBN: 978-80-214-4303-7
- [4] FREISLEBEN, J., HAMÁČEK, A., ŘEBOUN, J. Evaluation circuit for IDE sensor structures. In *Diagnostika '11*. Pilsen: University of West Bohemia, 2011. s. 65-68. ISBN: 978-80-261-0020-1
- [5] ŠALOM, R., KAŠPAR, P., BLECHA, T., FREISLEBEN, J., BARTOVSKÝ, J., KRIST, P., HAMÁČEK, A. Implementation of AODV Routing Protocol in Sensor Wireless Networks. In *20th Telecommunications Forum TELFOR 2012*. Bělehrad: IEEE, 2012. s. 194-197. ISBN: 978-1-4673-2984-2

**Užitný vzor**

- [1] ČENGERY, J., HAMÁČEK, A., PIHERA, J., FREISLEBEN, J., VIK, R., KOMÁREK, J. *Zařízení pro testování procesu vytvrzování pryskyřice v závislosti na jejím ohřevu*. Plzeň, Česká republika. Užitný vzor CZ 26641 U1. 26. 03. 2014.

**Funkční vzorek**

- [1] HAMÁČEK, A., ŘEBOUN, J., PRETL, S., FREISLEBEN, J. *Laboratorní zařízení pro depozici vrstev z roztoku ponorem*. 2011.
- [2] BLECHA, T., FREISLEBEN, J., HAMÁČEK, A., KAŠPAR, P., SOUKUP, R., JERHOT, J. *Univerzální komunikační modul bezdrátové senzorové sítě BAN*. 2012.

- [3] ŘEBOUN, J., HAMÁČEK, A., ZWIEFELHOFER, V., KROUPA, M., FREISLEBEN, J. *Pětikanálový záznamník teploty T5LOG-1*. 2012.
- [4] ŘEBOUN, J., HAMÁČEK, A., FREISLEBEN, J., SOUKUP, R., BLECHA, T. *Modul osobního alarmu zásahového obleku HZS*. 2012.
- [5] FREISLEBEN, J., ČENGERY, J., HAMÁČEK, A., PIHERA, J. *Zařízení pro sledování vytvrzování procesu pryskyřic s bezdrátovým přenosem dat*. 2013.
- [6] FREISLEBEN, J., ČENGERY, J., HAMÁČEK, A., PIHERA, J. *Senzorový systém pro sledování vytvrzování pryskyřice*. 2013.

### Prototyp

- [1] BLECHA, T., FREISLEBEN, J., HAMÁČEK, A., HEŘMANSKÝ, V., KAŠPAR, P., KUBERSKÝ, P., OZAŇÁK, P., ŘEBOUN, J., SOUKUP, R. *Chytrý hasičský zásahový oblek INTEX*. 2014.

### Technologie

- [1] HAMÁČEK, A., KOMÁREK, J., PIHERA, J., FREISLEBEN, J., SOUKUP, R., BLECHA, T., POLANSKÝ, R., PROSR, P., ČENGERY, J., BARTŮŇKOVÁ, M. *Technologie pro sledování průběhu polymerace in situ*. 2014.

### Software

- [1] FAIST, J., FREISLEBEN, J., ČENGERY, J., HAMÁČEK, A., PIHERA, J. *Data-Collector - software pro monitorování a vyhodnocování procesu vytvrzování pryskyřic*. 2013.



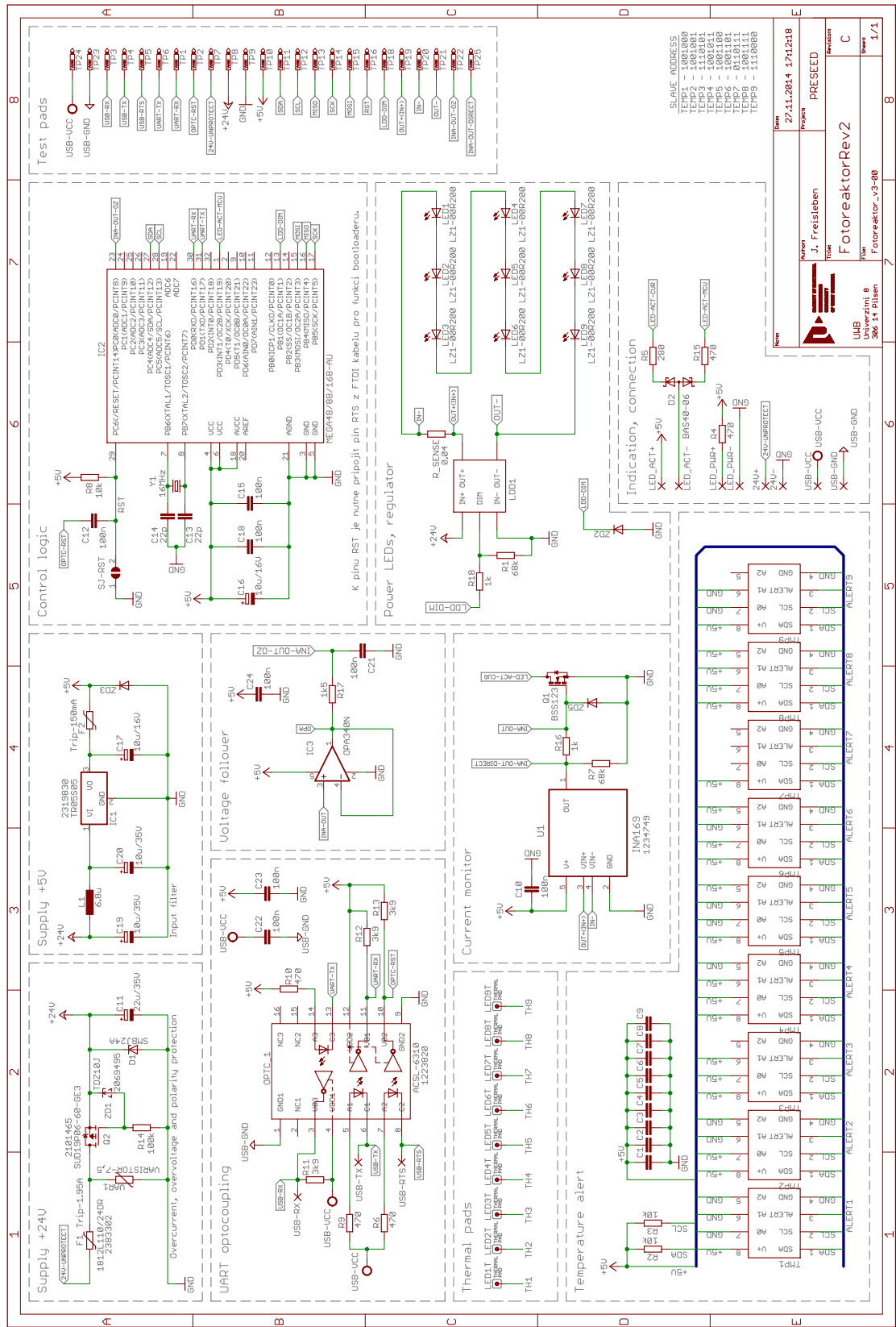
# PŘÍLOHY

# Příloha A

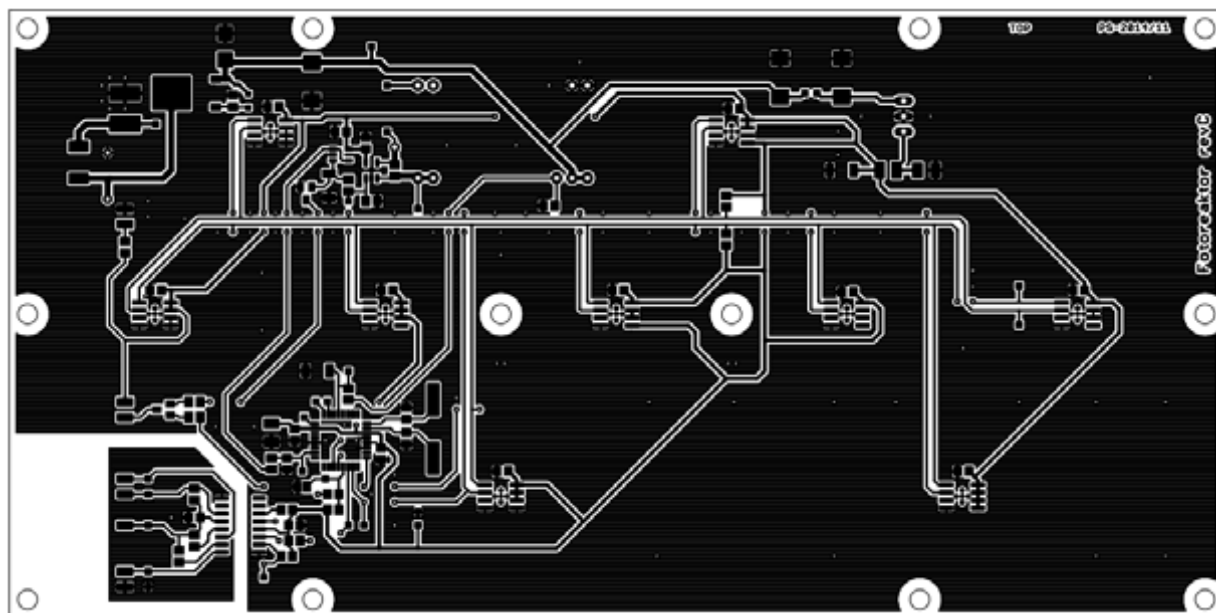
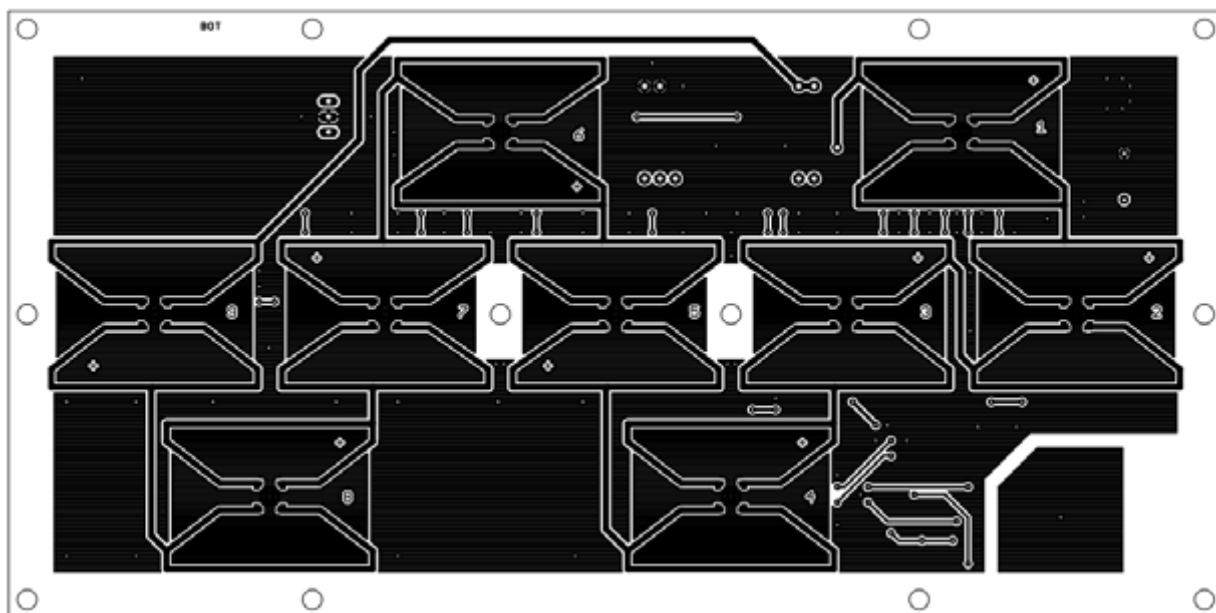
## Průmyslový fotoreaktor

A1 Deska plošného spoje

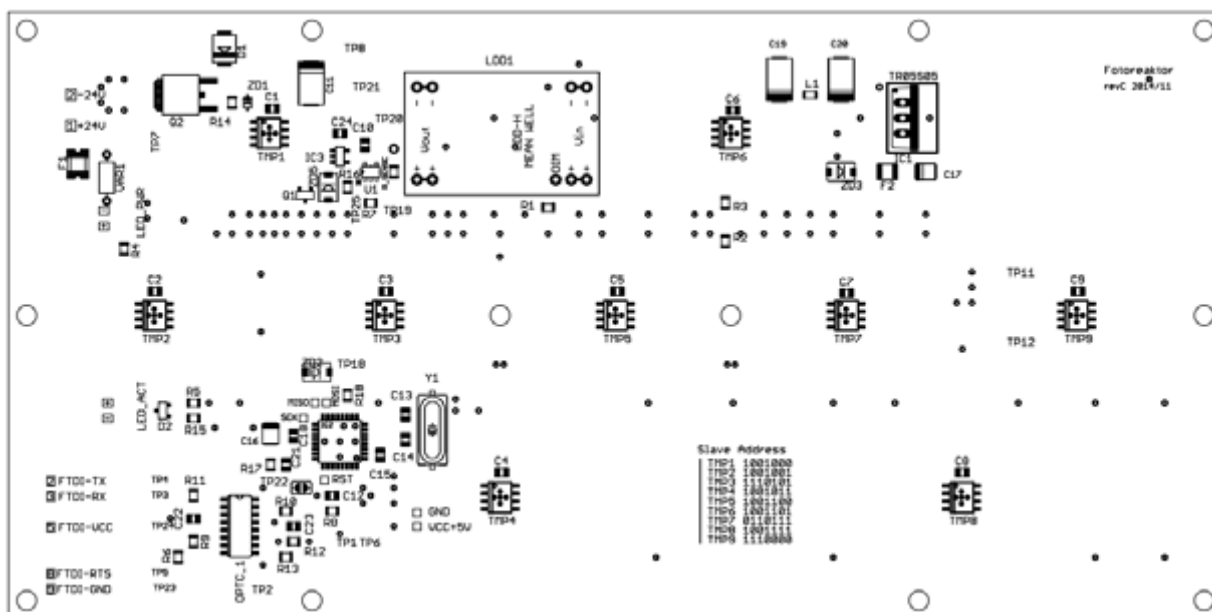
A2 Výkresy mechanických částí



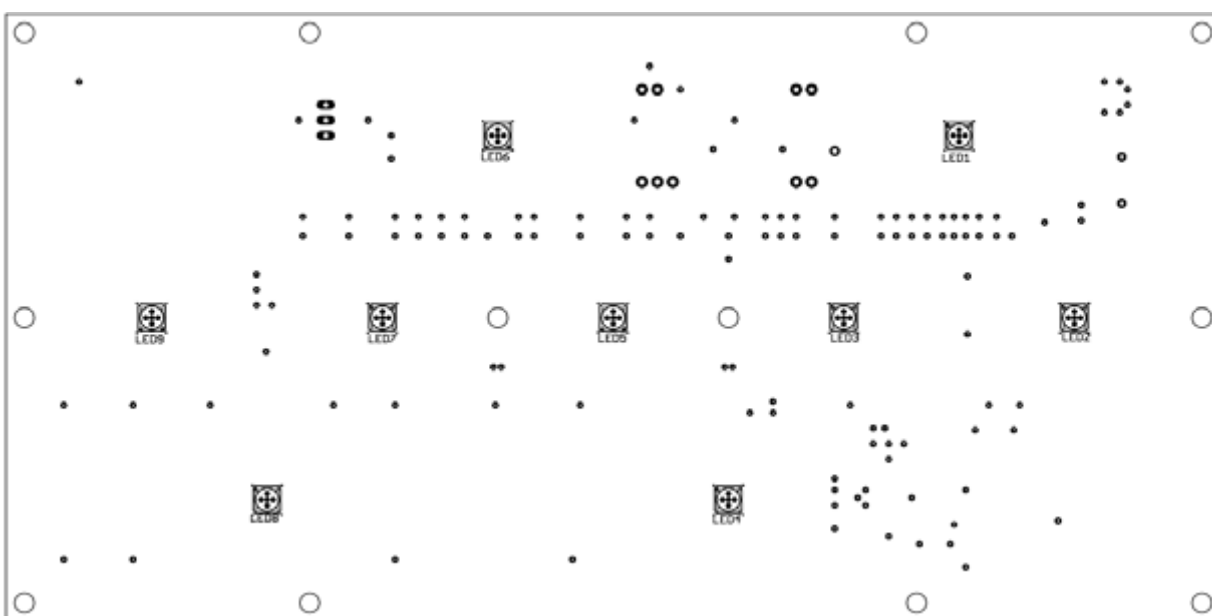
Obr. A.1: Schéma zapojení.

*Strana TOP**Strana BOT***Obr. A.2:** Deska plošného spoje.

Strana TOP

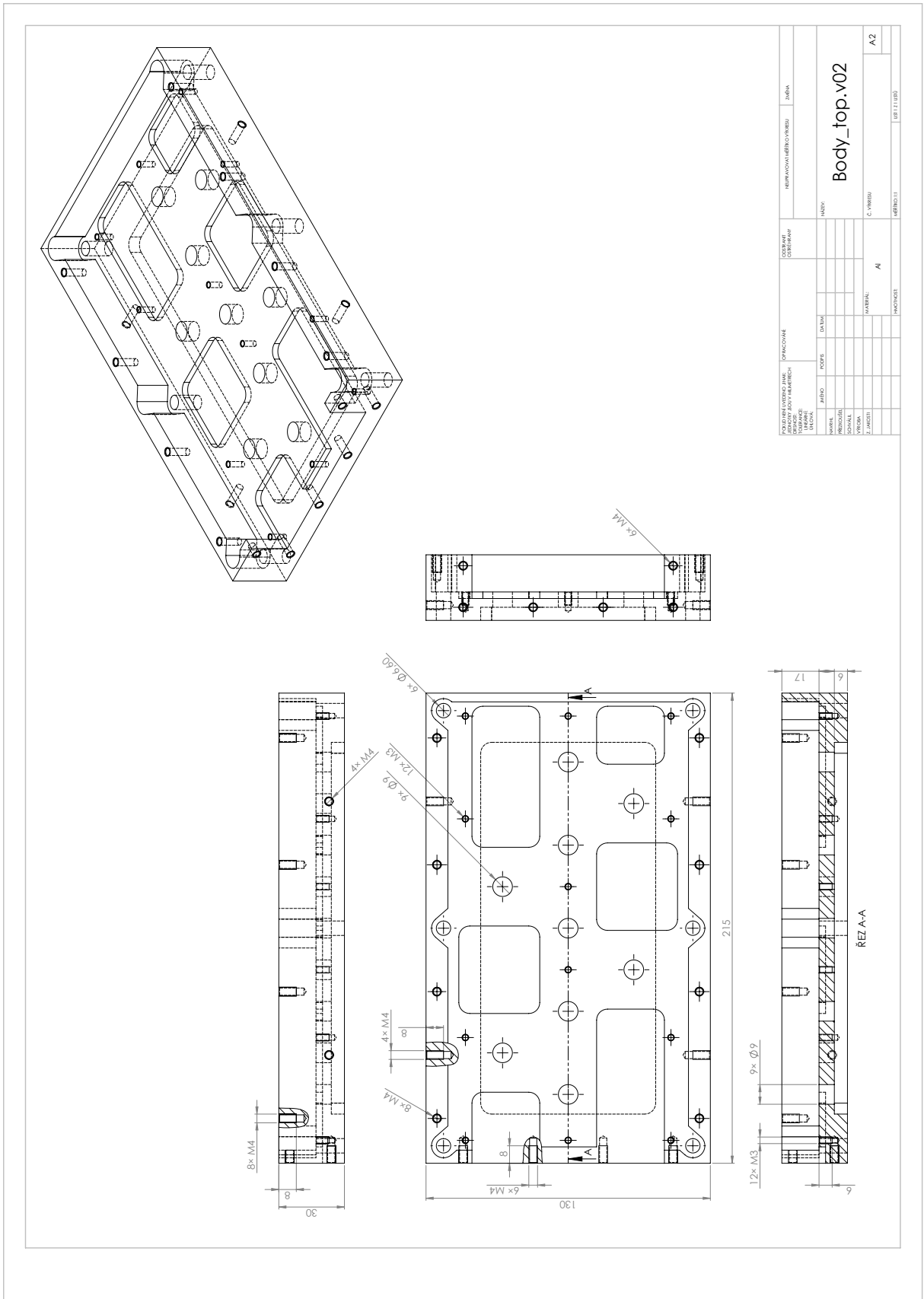


Strana BOT



Obr. A.3: Rozmístění součástek.





Obr. A.5: Horní díl.

# Příloha B

## Užitný vzor



## **Zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem**

### Oblast techniky

Technické řešení se týká zařízení s průtočnou komorou k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů v kapalinách tvořených alespoň částečně vodou a obsahující stopy až 0,5% hmotnostních fotosenzibilizační látky iniciované světlem.

### Dosavadní stav techniky

Konvenční obráběcí kapaliny a emulze obsahují velké množství aditiv. Jedná se především o různé inhibitory koroze, odpěňovače, dispergátory, změkčovadla, pasivátory barevných kovů nebo přípravky pro zvýšení pH. V současné době se pro účely desinfekce a antimikrobiální ochrany řezných a chladicích kapalin proti tvorbě bakterií, hub a plísní používají biocidní přípravky, nejčastěji baktericidy s fungicidními účinky. Průmyslové biocidy používané pro ochranu řezných a chladicích kapalin představují svou toxicitou a spotřebou značné zdravotní riziko pro pracovníky, kteří s těmito kapalinami pracují a silnou zátěž pro životní prostředí. Biocidní přípravky se do řezných a chladicích kapalin standardně přidávají v nižších koncentracích během dlouhodobého provozu - jedná se o tak zvané preventivní doplňování biocidních přípravků.

Koncentraci mikroorganismů v kapalině je třeba během provozu průběžně sledovat a v případě jejich přemnožení provést dodatečný zásah biocidním prostředkem. Celý proces vyčištění kapaliny vedoucí ke snížení koncentrace mikroorganismů na povolenou mez trvá pak v provozu i několik týdnů. Kontinuální preventivní dávkování nízkých koncentrací biocidů často způsobuje vznik rezistentní kultury mikroorganismů. V případě chladicích okruhů, kde se používají biocidní preparáty, bylo mikroskopickými rozbory zjištěno, že vysoké dávky biocidů mají možný

dopad na morfologické a teratologické útvary u řas. Uvedené skutečnosti vedou ke studiu možností uplatnění ekologicky šetrné inhibice mikroorganismů a růstu řas.

Cílem technického řešení je vytvoření účinného systému fotodynamické likvidace nežádoucích mikroorganismů v řezných a chladicích kapalinách, který zajistí dlouhodobě účinnou likvidaci mikroorganismů bez rizika vzniku rezistence, bez toxicity a bez nežádoucích vedlejších účinků a alergických reakcí u obsluhy zařízení. Technické řešení rovněž přináší oproti stávajícím řešením značné materiální úspory.

#### Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je zařízení s průtočnou komorou k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů v kapalinách tvořených alespoň částečně vodou a obsahující stopy až 0,5% hmotnostních fotosenzibilizační látky, kdy průtočná komora je alespoň z části uzpůsobená k prostupu světla.

Výhodné je, pokud je průtočná komora tvořena meandrem, který je alespoň z jedné stany přístupný působení světla, a tvoří aktivní prostor zařízení. Tvar kanálků v meandru je tvořen tak, aby docházelo k laminárnímu proudění kapaliny bez vzniku víření a nedocházelo k tlakovým ztrátám v aktivním prostoru zařízení.

Průtočná komora může být v místě působení světla zúžena štěrbinou ustavenou napříč působení světla.

Je rovněž výhodné, pokud je průtočná komora tvořená mezistěnou sestávající z dvojice soustředných těles, kde alespoň vnitřní těleso je zhotoveno z opticky propustného materiálu, ve které je umístěn světelný zdroj.

Výhodné je, pokud je těleso z vnější strany vnějšího soustředného tělesa opláštěno zrcadlovou plochou pro zvýšení světelného účinku ve vzdálenosti umožňující efektivním účinek odrazu světla.

#### Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněno příkladné provedení řešení průtočné komory se štěrbinou v řezu, na obr. 2 je boční pohled na toto řešení. Na obr. 3 je pohled na řešení komory s meandrem shora, na obr. 4 je řez A - A' vycházející z obr. 3. Na obr. 5 je znázorněno řešení komory s přepážkami v pohledu shora, na obr. 6 je řez A - A' vycházející z obr. 5. Na obr. 7 je v řezu pohled na komoru mezi soustřednými tělesy, na obr. 8 je podélný řez tímto řešením.

#### Příklady provedení technického řešení

Na obr. 1 a obr. 2 je znázorněno zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem iniciovanou reakcí, které je tvořeno tělesem I, v němž je uspořádána průtočná komora K. Část komory K tvoří štěrbinu 2. Proti štěrbině 2 je ustaven světelný zdroj 3. Štěrbina 2 je navržena tak, aby byl její průřez totožný s průměrem vstupního a výstupního otvoru Q.

Na obr. 3 a obr. 4 je znázorněno zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem iniciovanou reakcí, které je tvořeno tělesem I, v němž je uspořádána průtočná komora K. Průtočná komora K tvoří meandr 1. Proti meandru 1 je ustaven světelný zdroj 3.

Na obr. 5 a obr. 6 je znázorněno zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem iniciovanou reakcí, které je tvořeno tělesem I, v němž je uspořádána průtočná komora K tvořena přepážkami tvořící meandr 1. Výška přepážek je v aktivní části zařízení provedena variabilně výškově tak, aby docházelo k maximálnímu promíchání kapaliny. Proti meandru 1 je ustaven světelný zdroj 3. Tělesa I mohou být ve všech

příkladech opatřena světlopropustnou deskou. Tělesa I jsou ve všech případech opatřena alespoň jedním vstupním a výstupním otvorem O.

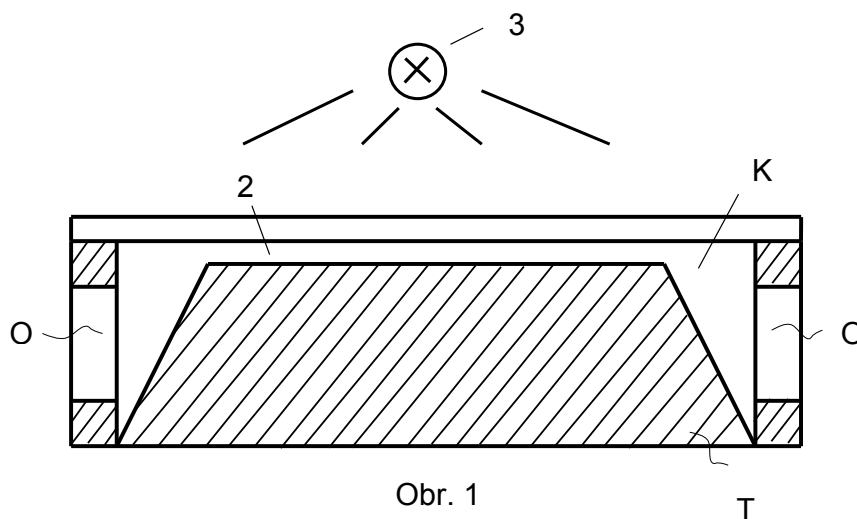
Zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem iniciovanou reakcí, kde průtočná komora K je tvořená mezistěnou sestávající z dvojice soustředných těles 4 a 5 je znázorněno na obr. 7 a v podélném řezu na obr. 8. Vnitřní těleso 4 a vnější těleso 5 jsou zhotoveny z opticky propustného materiálu, ve vnitřní tělese 4 je umístěn světelný zdroj 3. Vnější těleso 5 je z vnější strany opláštěno zrcadlovou plochou 6.

### Průmyslová využitelnost

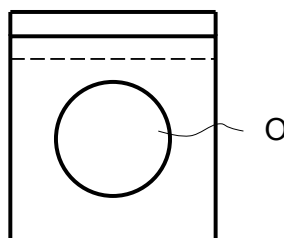
Zařízení k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů světlem iniciovanou reakcí nacházejí uplatnění zejména v pracovních okruzích výrobních strojů nebo v chladiřenských okruzích v energetickém a chemickém průmyslu, kde je žádoucí regulovat výskyt mikroorganismů, které mohou způsobovat zdravotní potíže uživatelům nebo napomáhat nebo napomáhat mechanickému poškození pracovních okruhů.

## NÁROKY NA OCHRANU

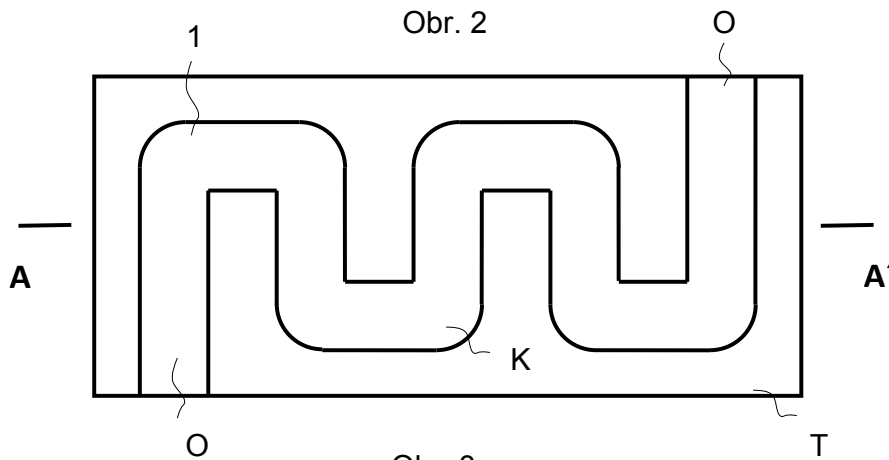
1. Zařízení s průtočnou komorou k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů v kapalinách tvořených alespoň částečně vodou a obsahující stopy až 0,5% hmotnostních fotosenzibilizační látky iniciované světlem, **vyznačující se tím, že** průtočná komora (K) je alespoň z části uzpůsobená k prostupu světla.
2. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** průtočná komora (K) je tvořena meandrem (1), který je alespoň z jedné strany přístupný působení světla.
3. Zařízení podle nárok 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** průtočná komora (K) je v místě působení světla zúžena štěrbinou (2) ustavenou napříč působení světla.
4. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** průtočná komora (K) je tvořena mezistěnou sestávající z dvojice soustředných těles (4) a (5), kde alespoň vnitřní těleso (4) je zhotoveno z opticky propustného materiálu, ve které je umístěn světelný zdroj (3).
5. Zařízení podle nároku 4, **vyznačující se tím, že** je vnější těleso (5) zhotovené z opticky propustného materiálu a je z vnější strany opláštěno zrcadlovou plochou (6).



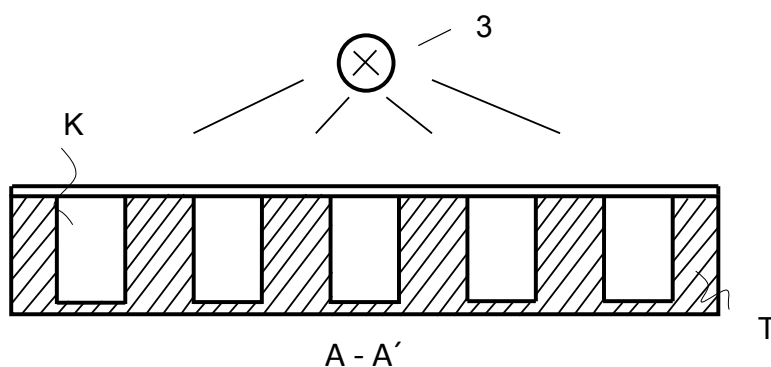
Obr. 1



Obr. 2

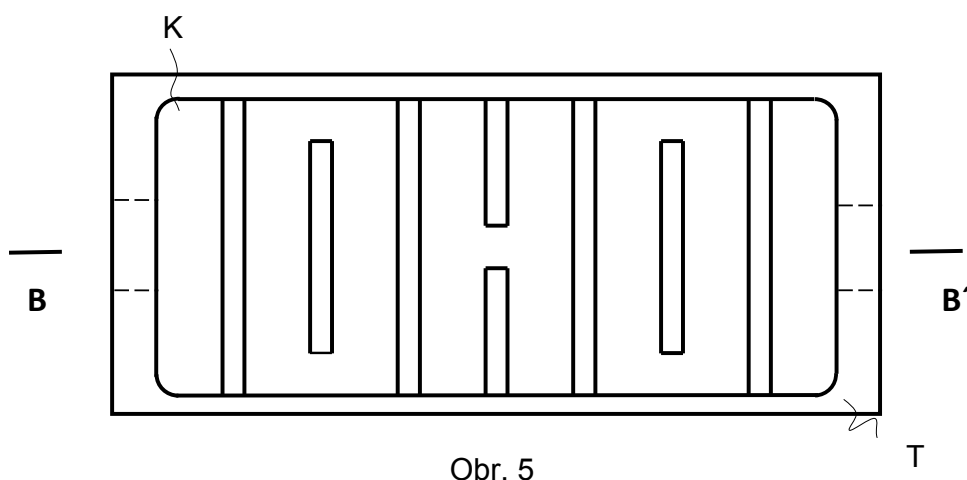


Obr. 3

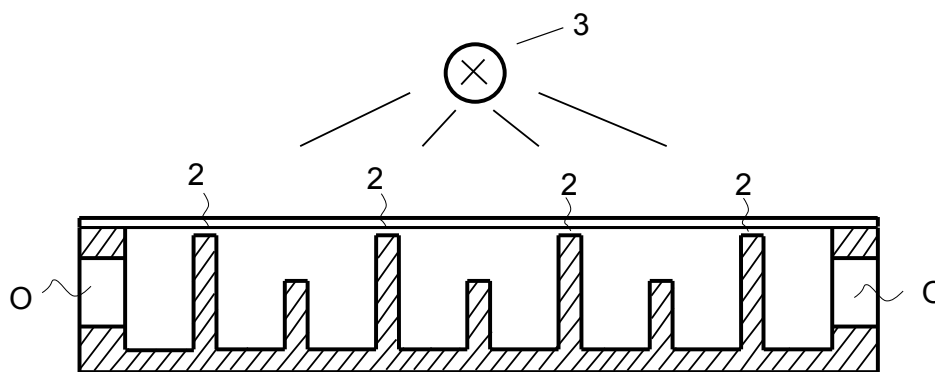


A - A'

Obr. 4

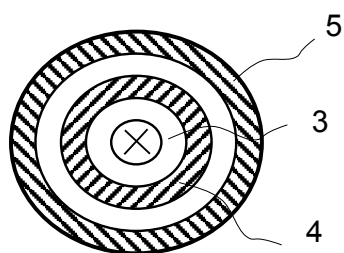


Obr. 5

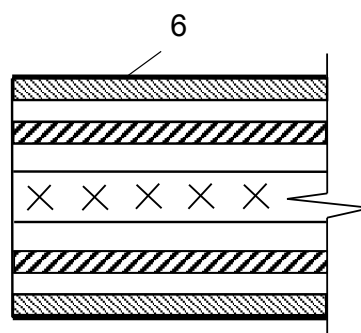


B - B'

Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8

# Příloha C

## Vyjádření spolupracujících pracovišť

- C1 Fotooxidační rozklady Oranže I
- C2 Fotodynamická terapie maligních nádorů
- C3 Fotodynamická inaktivace prionových proteinů
- C4 Fotodynamická dezinfekce ve stomatologii



**Fotooxidační rozklady modelového polutantu Oranže I, v kruhovém diodovém reaktoru, ve vodném roztoku, za přítomnosti ftalocyaninových fotosensitizerů HOAIFTS<sub>2</sub> a ZnFTCS<sub>2</sub>**

Vždy po 50 ml jednotlivých roztoků, obsahujících modelový polutant Oranž I v koncentracích mg/l a fotosensitizerů, sodné soli sulfonovaných ftalocyaninů hydroxyhlinitého (HOAIFTS<sub>2</sub>) či zinečnatého (ZnFTCS<sub>2</sub>) v koncentracích mg/l, bylo pipetováno do diodového reaktoru a za laboratorní teploty ozařováno červeným světlem 4 diod kruhového reaktoru světlem vlnové délky 660 nm. Interakcí světla uvedené vlnové délky s fotosensitizerů, sodnými solemi použitých ftalocyaninů a v roztocích rozpuštěným vzdušným, diatomickým kyslíkem, docházelo k jeho změně na vysoce reaktivní singletní kyslík, který oxidačně rozkládal modelový polutant Oranž I

Ve vzorcích ozařovaného roztoku, odebíraných průběžně v intervalech 0,5, 1, 1,5 2, 3 a 4 hod byl spektrofotometricky stanoven obsah Oranže I a sodné soli sulfonovaného HOAIFTC či sodné soli sulfonovaného ZnFTC. Podobně byly provedeny kontrolní pokusy rozkladu Oranže I, bez přítomnosti fotosensitizerů, sodných solí sulf. HOAIFTC resp. ZnFTC a kontrolní pokusy rozkladu samotných fotosensitizerů, sodných solí sulf. HOAIFTC, resp. ZnFTC bez přítomnosti Oranže I. Stejně pak byly prováděny pokusy rozkladu Oranže I za přítomnosti fotosensitizerů, sodných solí sulf. HOAIFTC, či ZnFTC. Všechny v tabulkách uváděné sulfonované HOAIFTC či ZnFTC byly tedy aplikovány ve formě jejich sodných solí, které jsou ve vodě dobře rozpustné. Výsledky všech pokusů jsou shrnuty v následujících tabulkách 1 -9.

**Tabulka 1:1129/199 Kontrolní pokus rozkladu Oranže I 15 mg/l, bez FTC**

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %			
0	1,269	100			
0,5	1,182	93,1			
1,0	1,091	86,0			
1,5	0,953	75,1			
2	0,860	67,8			
3	0,698	55,0			
4	0,565	44,5			

**Tabulka 2: 1129/177 Kontrolní pokus bez Oranže I, jen rozklad HOAIFTS<sub>2</sub> 5mg/l vzorek1009/267 III, sodná sůl disulfonovaného HOAIFTC**

Čas hod.			HOAIFTS <sub>2</sub> Abs.	HOAIFTS <sub>2</sub> Abs.%	
0			0,622	100	
0,5			0,617	99,2	
1,0			0,582	93,6	
1,5			0,544	87,4	
2			0,485	78,0	
3			0,411	66,1	
4			0,332	53,4	

**Tabulka 3: 1129/211 Kontrolní pokus bez Oranže I, jen rozklad ZnFTCS<sub>2</sub> 5mg/l vzorek 1129/158 sodná sůl disulfonovaného ZnFTC**

Čas hod.			ZnFTCS <sub>2</sub>	ZnFTCS <sub>2</sub> abs. %	A 674/ A605
0			0,381	100	
0,5			0,090	23,6	
1,0			0	0	
1,5			0	0	
2			0	0	
3			0	0	
4			0	0	

**Tabulka 4: pokus 1129/178 Rozklad Oranže I 15 mg / 5 mg HOAIFTCS<sub>2</sub> vzorek 1009/267 III**

FTC : Oranž I = 1 mol : 6,54 mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	HOAIFTCS <sub>2</sub> abs.	HOAIFTCS <sub>2</sub> abs. %	
0	0,621	100	0,667	100	
0,5	0,218	35,1	0,366	54,9	
1,0	0	0	0,318	47,7	
1,5	0	0	0,282	42,3	
2	0	0	0,249	37,3	
3	0,0	0	0,201	30,1	
4	0	0	0,147	22,0	

**Tabulka 5: pokus 1129/179 Rozklad Oranže I 10 mg / 5 mg HOAI FTCS<sub>2</sub> vzorek 1009/267 III**

FTC : Oranž I = 1 mol : 4,38 mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	HOAIFTCS <sub>2</sub> abs.	HOAIFTCS <sub>2</sub> abs. %	
0	0,797	100	0,673	100	
0,5	0,135	16,9	0,432	62,9	
1,0	0	0	0,379	56,3	
1,5	0	0	0,354	52,6	
2	0	0	0,321	48,0	
3	0	0	0,247	36,7	
4	0	0	0,152	22,6	

**Tabulka 6: pokus 1129/180 Rozklad Oranže I 5 mg / 5 mg HOAl FTCS<sub>2</sub> vzorek 1009/267 III**

FTC : Oranž I = 1 mol : 2,18 mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	HOAlFTCS <sub>2</sub> abs.	HOAlFTCS <sub>2</sub> abs.%	
0	0,400	100	0,713	100	
0,5	0	0	0,531	74,5	
1,0	0	0	0,506	71,0	
1,5	0	0	0,456	64,0	
2	0	0	0,412	57,8	
3	0	0	0,314	44,0	
4	0	0	0,164	23,0	

**Tabulka 7: pokus 1129/208 Rozklad Oranže I 15 mg / 5 mg ZnFTCS<sub>2</sub> vzorek 1129/158**

FTC : Oranž I 1 mol : 6,64mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	ZnFTC abs.	ZnFTC abs.%	
0	1,079	100	0,398	100	
0,5	0	0	0,125	31,4	
1,0	0	0	0,089	22,4	
1,5	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	

**Tabulka 8: pokus 1129/209 Rozklad Oranže I 15 mg / 2 mg/l ZnFTCS<sub>2</sub> vzorek 1129/158**

FTC : Oranž I 1 mol : 17mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	ZnFTC abs.	ZnFTC abs.%	
0	1,057	100	0	0	
0,5	0	0	0	0	
1,0	0	0	0	0	
1,5	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	

**Tabulka 9: pokus 1129/210 Rozklad Oranže I 15 mg / 1 mg/l ZnFTCS<sub>2</sub> vzorek 1129/158**  
odhadem ZnFTC(SO<sub>3</sub> Na)<sub>2</sub>

FTC : Oranž I 1 mol : 34 mol

Čas hod.	Oranž I abs.	Oranž I abs. %	ZnFTC abs.	ZnFTC abs. %	
0	1.081	100	0	0	
0,5	0	0	0	0	
1,0	0	0	0	0	
1,5	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	

Z kontrolních pokusů uvedených v tabulkách 1 – 3 je zřejmé, že k fotooxidačnímu rozkladu Oranže I dochází také bez přítomnosti sulfonovaných ftalocyaninů. Rozklad Oranže I je však pomalý, za čtyři hodiny se rozloží jen 55.5 % z původního nasazeného množství (viz tab.1). Podobně dochází také k fotooxidačnímu rozkladu samotných fotosensitizátorů, sodných solí sulfonovaných ftalocyaninů, bez přítomnosti Oranže I, přičemž rozklad sodné soli disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu probíhá výrazně rychleji než rozklad sodné soli disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu. (srovnej tab. 2 a 3). Vzhledem k tomu, že vedle fotooxidačního rozkladu modelového polutantu Oranže I mohou rozkládat také použité fotosensitizátory, sodné soli disulfonovaných hydroxyhlinitých a zinečnatých ftalocyaninů, byl v pokusech uvedených v tabulkách 4 – 9 sledován vedle rozkladu modelového polutantu Oranže I také rozklad použitých ftalocyaninových fotosensitizátorů. Z provedených pokusů je zřejmé, že při použití fotosensitizátoru, sodné soli disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu je pokles obsahu Oranže I závislý na molárním poměru použitého fotosensitizátoru. Při molární poměru FTC : Oranže I 1 : 6,54 je všechna Oranž rozložena za 1 hod ( viz tab.4). Při molárním poměru 1 : 2,18 je všechna Oranž rozložena za 0,5 hod. (viz tab. 6). Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo s fotosensitizátorem, sodnou solí disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu. Při molárním poměru FTC : Oranže I 1 : 6,54 je všechna Oranž I rozložena za 0,5 hod (viz tab. 7). Stejně rychlosti rozkladu bylo však dosaženo při molárních poměrech FTC : Oranže I 1 : 17 a dokonce i 1 : 34, (viz tab. 8 – 9) což v technické praxi znamená že na 1 m<sup>3</sup> vody, kontaminované 15 g modelového polutantu Oranže I (což je výrazně oranžově zabarvený roztok) při fotooxidačním rozkladu postačí k úplnému fotooxidačnímu odbarvení uvedeného roztoku pouze 1 g fotosensitizátoru, sodné soli disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu. Vzhledem k rychlosti a účinnosti popsaného fotooxidačního rozkladu modelového polutantu Oranže I, zejména za použití fotosensitizátoru sodné soli disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu, lze oprávněně navrhnout další studium procesu, zaměřené na vývoj průtočného kontinuálního fotooxidačního reaktoru, vhodného k dekontaminaci barevných odpadních vod. Závěrem je rovněž vhodné konstatovat, že bez správně navrženého a zkonstruovaného kruhového, diodového reaktoru by výše uvedené výsledky nebylo možné získat.

Vypracoval 10.4.15 Rakušan

## Testování účinnosti přenosného diodového zdroje pro fotodynamickou terapii maligních nádorů.

### 1. Cíl práce:

Cílem práce bylo, otestovat terapeutickou účinnost diodového přenosného zdroje pro fotodynamickou terapii maligních nádorů, ve srovnání s běžně používanou xenonovou lampou (výrobce: Preciosa a.s.).

### 2. Materiál a Metody:

K pokusu byly použity athymické nu/nu myši, samice, tělesné hmotnosti 18-20g (stáří cca 6-8 týdnů), kterým byly na pravý bok subkutánně aplikovány nádorové buňky lidského nepigmentovaného melanomu, linie C-32, v počtu  $10^7$  buněk, společně s 0,05 ml Matrigelu. Celkový aplikovaný objem byl 0,1ml. Když nádory dorostly do velikosti cca 1 x 1 cm, byla zahájena terapie.

Pokusná skupina 1:

6 nu/nu myši s s melanomem C-32, topicky aplikován hydroxyhlinitý ftc -fotosenzitizér v gelu s liposomy za 10 min. po aplikaci následovalo ozáření xenonovou lampou oblasti s nádorem.

Pokusná skupina 2:

6 nu/nu myši s melanomem C-32, topicky aplikován hydroxyhlinitý ftc - fotosenzitizér v gelu s liposomy za 10 min. po aplikaci následovalo ozáření přenosným diodovým zdrojem oblasti s nádorem.

Kontrolní skupina:

6 nu/nu myši – bez aplikace a bez ozáření

Podmínky ozařování: xenonová lampa: výkon 0,97W, doba záření 8 min., průměr kruhu 2,5 cm, hustota energie 95 J/cm<sup>2</sup>.

Podmínky ozařování: přenosný diodový zdroj: výkon 0,98W? doba záření 8 min., průměr kruhu 2,5 cm, hustota energie 96 J/cm<sup>2</sup>

### 3. Výsledky

U obou pokusných skupin se vyvinuly během 48 hodin po fotodynamické terapii nekrózy v oblasti s nádorem, které se postupně hojily. U kontrolní skupiny nádory pokračovaly v růstu.

počet myši  
ve skupině

6

xenonová lampa  
počet vyléčených/ celkový počet

3/6

přenosný diodový laser  
počet vyléčených/ celkový počet

4/6

#### 4. Závěr

V pokuse bylo zjištěno, že přenosný diodový zdroj je účinný pro fotodynamickou terapii maligních nádorů. Získané výsledky byly dokonce lepší než ty, které jsme získali při použití xenonové lampy. Výhodou je, že se jedná o šetrnější způsob ozařování, protože u xenonové lampy se uplatňuje i tepelný účinek záření, dále i možnost rychlého přenosu přístroje v laboratořích podle potřeby. Hlavní výhodou se může stát i možnost jeho zakoupení obvodními lékaři pro rychlé ošetření pacientů.



6.den po PDT, zářeno přenosným diodovým zdrojem



6. den po PDT, zářeno xenonovou lampou



12. den po PDT, hojící se nekróza, diodový zdroj



12. den po PDT, hojící se nekróza z okrajů rostoucí tumor,  
xenonová lampa

V Praze dne 15.6. 2015

doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc

## Použití diodových svítidel pro fotodynamickou inaktivaci prionů pomocí derivátů ftalocyaninu

Mgr. Marie Kostelanská, Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK Praha

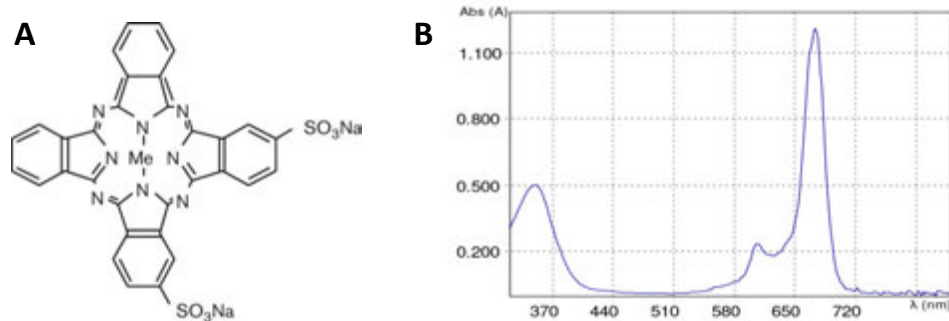
### Teoretická část

Buněčný prionový protein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) je mezidruhově rozšířený, proteasami štěpitelný glykoprotein se dvěma oligosacharidovými řetězci, které umožňují jeho elektroforetickou separaci podle stupně glykosylace. C-konec proteinu asociuje skrze glykosylfosfatidylinositolovou kotvu s plasmatickou membránou neuronů, na nichž je primárně exprimován. V nižší míře se vyskytuje v plicích, srdci nebo na buněčných elementech krevního řečiště. I přes takovéto zastoupení v organismu není zcela objasněna jeho funkce, nicméně se uvažuje o jeho významu při vzniku synapsí, ochraně neuronů či buněčné adhezi.

Patologická forma prionového proteinu ( $\text{PrP}^{\text{TSE}}$ ) se vyznačuje identickou aminokyselinovou sekvencí jako  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , liší se však v sekundární a terciární struktuře vyšším podílem  $\beta$ -listů, a tím získanou rezistencí vůči proteasám a konvenčním desinfekčním procesům. Autokatalytická konverze  $\text{PrP}^{\text{C}}$  v  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  je podstatou propagace prionových onemocnění, která vedou ke kumulaci agregátů  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  v centrální nervové soustavě, v jejímž důsledku dochází k neurodegenerativním poruchám končících smrtí jedince. K prionovým onemocněním se řadí bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) u skotu, chronické strádání jelenovitě zvěře (CWD) a u lidské populace Creutzfeldt-Jacobova choroba (CJD), která se dále dělí na variantní CJD – původcem je BSE, sporadická CJD – náhodná konverze  $\text{PrP}^{\text{C}}$  v  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  či iatrogenní CJD – vnesení infekčního inokula do organismu při krevních transfuzích či nedokonalé sterilizaci chirurgických nástrojů po operacích pacientů s latentní CJD.

Ačkoliv doposud nebyla objevena účinná terapie, byly nalezeny látky s inhibiční antiprionovou aktivitou, k nimž patří také námi používané ftalocyaniny (FTC) - cyklické tetrapyrrolové sloučeniny. Příklad disodné soli difulfonyvaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého je uveden na (Obr. 1, A). V Prionové laboratoři Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK bylo poprvé prokázáno, že patologickou formu prionového proteinu lze účinně fotodynamicky inaktivovat ftalocyaninem, který zde vystupuje jako fotosenzitizér. Zdrojem světla při samotné realizaci experimentu jsou aparatury osazené diodami emitujícími světlo o vlnové délce blízké 660 nm (červené světlo), která je blízká absorpčnímu maximu molekul FTC (Obr. 1, B) a umožňuje tak jejich efektivní excitaci oproti světlu bílému. Energeticky bohaté FTC mohou být zhášeny přenosem energie z excitovaného FTC na molekulární kyslík za vzniku reaktivního singletového kyslíku, který se vyznačuje oxidačně destruktivními vlastnostmi na své bezprostřední okolí. Specifická vazba FTC na  $\text{PrP}^{\text{TSE}}$  může tedy vést k odbourání primárně patologické formy prionu.

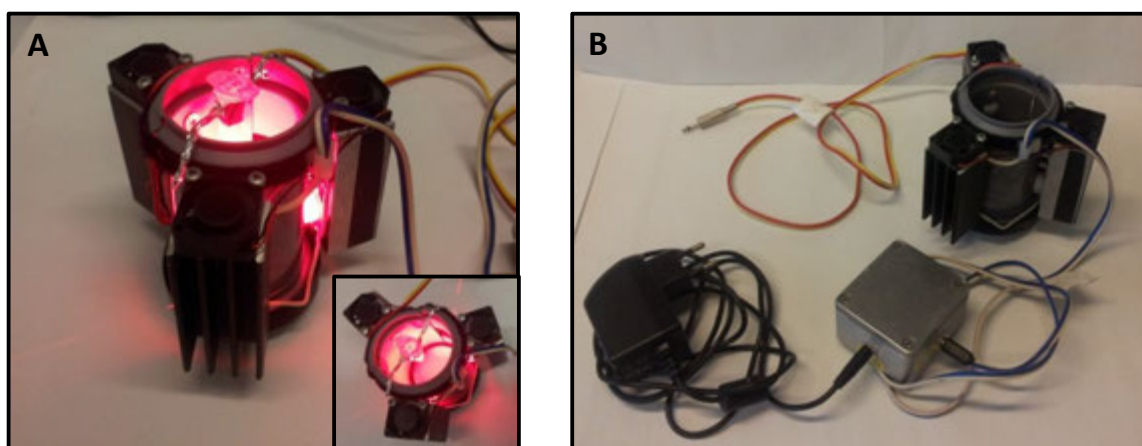




Obr. 1. (A) Disodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého, symbol Me značí (HO)Al (Janouskova et al., 2012). (B) Absorpční spektrum ftalocyaninu hydroxyhlinitého prezentující koncentraci 10 µg/ml ve vodném pufru.

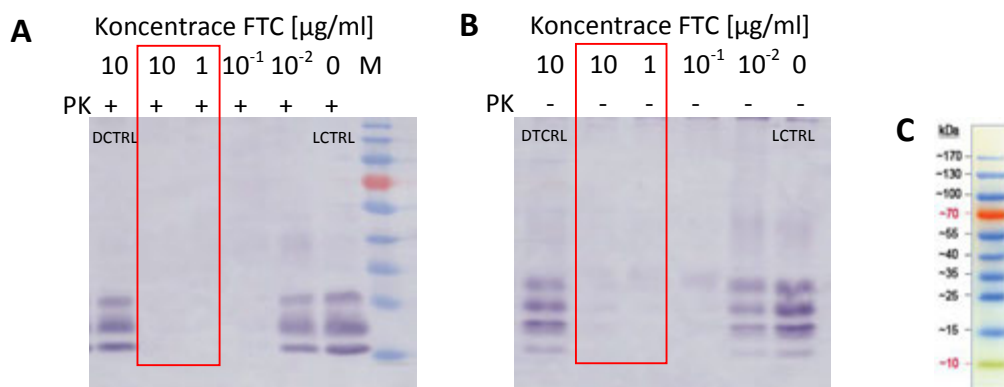
### Praktická část

Experimenty fotodynamické inaktivace prionů ftalocyaniny jsou prováděny v suspenzi infekčního mozkového homogenátu (MH), který pochází od CD1 myši infikovaných myším adaptovaným scrapie kmenem - RML (Rocky Mountain Laboratory). K alikvótům MH je přidán roztok FTC s klesající finální koncentrací (faktor ředění 10) a vzorky v Eppendorf mikrozkuvkách jsou následně exponovány červenému světlu (660 nm) ve světelné aparatuře (Obr. 2, A, B) po dobu 5 min. Po solubilizaci zbytků buněčných struktur detergenty jsou vzorky inkubovány s proteinasou K (pro detekci pouze PrP<sup>TSE</sup>) a paralelně jsou vedeny vzorky bez přídavku proteinasy K (detekce PrP<sup>TSE</sup> a zároveň PrP<sup>C</sup>). Kvůli vyloučení vlivu samotného červeného světla na odbourání prionů či vlivu FTC bez expozice světlu byly do experimentu zahrnuty kontroly - v prvním případě MH bez FTC exponovaný červenému světlu (LCTRL), ve druhém MH s FTC uchovávaný ve tmě (DCTRL).



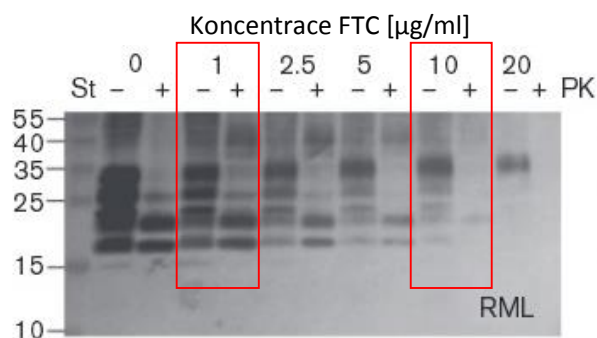
Obr. 2. (A) Světelná aparatura při fotodynamické inaktivaci prionů v mikrozkuvkách. (B) Celková struktura aparatury.

Di-, mono- a ne-glykosylované formy PrP<sup>TSE</sup>/PrP<sup>C</sup> jsou separovány s využitím SDS-PAGE (proteinová elektroforéza) a přeneseny (technika Western blot) na nitrocelulosovou membránu, na níž je realizována imunochemická detekce PrP<sup>TSE</sup>/PrP<sup>C</sup> pomocí protilátek specifických k prionovému proteinu. Obr. 3 ilustruje reprezentativní výsledek výše popsaného experimentu, při němž bylo se vzrůstající koncentrací FTC ve vzorku dosaženo vyšší účinnosti fotodynamické inaktivace prionů.



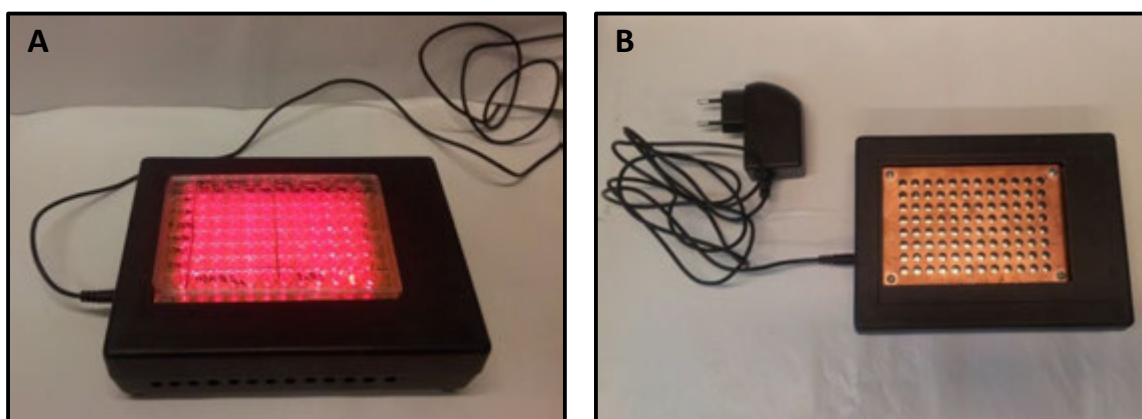
Obr. 3. (A) PrP<sup>TSE</sup> po fotodynamické (660 nm) inaktivaci ftalocyaniny a inkubaci s proteinasou K (PK+). (B) PrP<sup>TSE</sup> a PrP<sup>C</sup> po fotodynamické (660 nm) inaktivaci ftalocyaniny bez proteinasy K (PK-). (C) PageRuler Prestained Protein Ladder. LCTRL – MH bez FTC exponovaný červenému světlu, DCTRL – MH s FTC uchovávaný ve tmě, M – standard molekulových hmotností.

Dále bylo fotodynamickou inaktivací prionů po 5-ti minutové expozici červenému světlu (Obr. 3, červený rámeček) dosaženo při totožných finálních koncentracích FTC (10 μg/ml a 1 μg/ml) výrazně vyšší účinnosti v porovnání se vzorky, které byly vystaveny bílému světlu o délce osvitů 60 min (Obr. 4, červený rámeček).

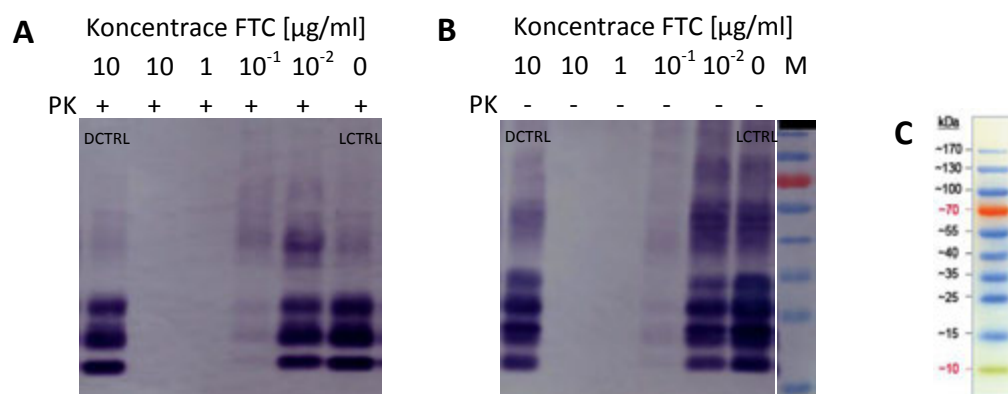


Obr. 4. PrP<sup>TSE</sup>/PrP<sup>C</sup> po fotodynamické inaktivaci ftalocyaniny na bílém světlu a štěpení proteinasou K (PK+) nebo bez proteinasy K (PK-). (Janouskova *et al.*, 2012)

Pro realizaci rozsáhlejších experimentů je fotodynamická inaktivace prionů prováděna v jamkách mikrotitrační destičky 96-jamkového formátu (s analogickým biochemickým uspořádáním pokusu jako ve výše popsanému postupu). Zdrojem červeného světla (660 nm) je v tomto případě aparatura (Obr. 5, A, B), jejíž diodové uspořádání poskytuje osvětlení každé jednotlivé jamce mikrotitrační destičky. Úspěšnost inaktivace prionů ftalocyaniny s využitím tohoto zdroje světla dokumentuje Obr. 6, A, B.



Obr. 5. (A) 96-diodový zdroj světla při fotodynamické inaktivaci prionů v mikrotitrační destičce. (B) Uspořádání diod v aparatuře.



Obr. 6. (A) PrP<sup>TSE</sup> po fotodynamické (660 nm) inaktivaci ftalocyaniny a inkubaci s proteinasou K. (B) PrP<sup>TSE</sup> a PrP<sup>C</sup> po fotodynamické (660 nm) inaktivaci ftalocyaniny bez proteinasy K. (C) PageRuler Prestained Protein Ladder. LCTRL – MH bez FTC exponovaný červenému světlu, DCTRL – MH s FTC uchovávaný ve tmě, M – standard molekulových hmotností.

**Cíle**

Doposud získané výsledky indikují potenciál pro využití fotodynamické inaktivace PrP<sup>TSE</sup> v přítomnosti FTC ke sterilizaci priony kontaminovaných biologických a chirurgických nástrojů, které jsou zdrojem iatrogenní CJD.

Podaří-li se prokázat vyšší afinita ftalocyaninů k patologické formě prionového proteinu oproti jiným biomolekulám a biologickým strukturám, lze také uvažovat o využití fotodynamické inaktivace k šetrné sterilizaci biologických tekutin.

**Literatura:**

Janouskova, O, Rakusan, J, Karaskova, M & Holada, K 2012 Photodynamic inactivation of prions by disulfonated hydroxyaluminium phthalocyanine, *The Journal of General Virology*, 93, 2512-17

**In vitro experimenty****Srovnání zdrojů světla Fotosan a Stomaset**

Pomocí kmenů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* a *Trichophyton mentagrophytes* (nově *Trichophyton Arthroderma benhamiae*) byla srovnána *in vitro* fotoinaktivační efektivita systému Fotosan (komerční přístroj využívající diodové světlo a toluidinovou modř) a porovnávána se systémem Stomaset (diodové světlo) u dvou ftalocyaninů Pc7 (kód. č. 1148/94) a Pc9 (kód. č. 1148/95B) v koncentracích 8 a 100 µg/ml.

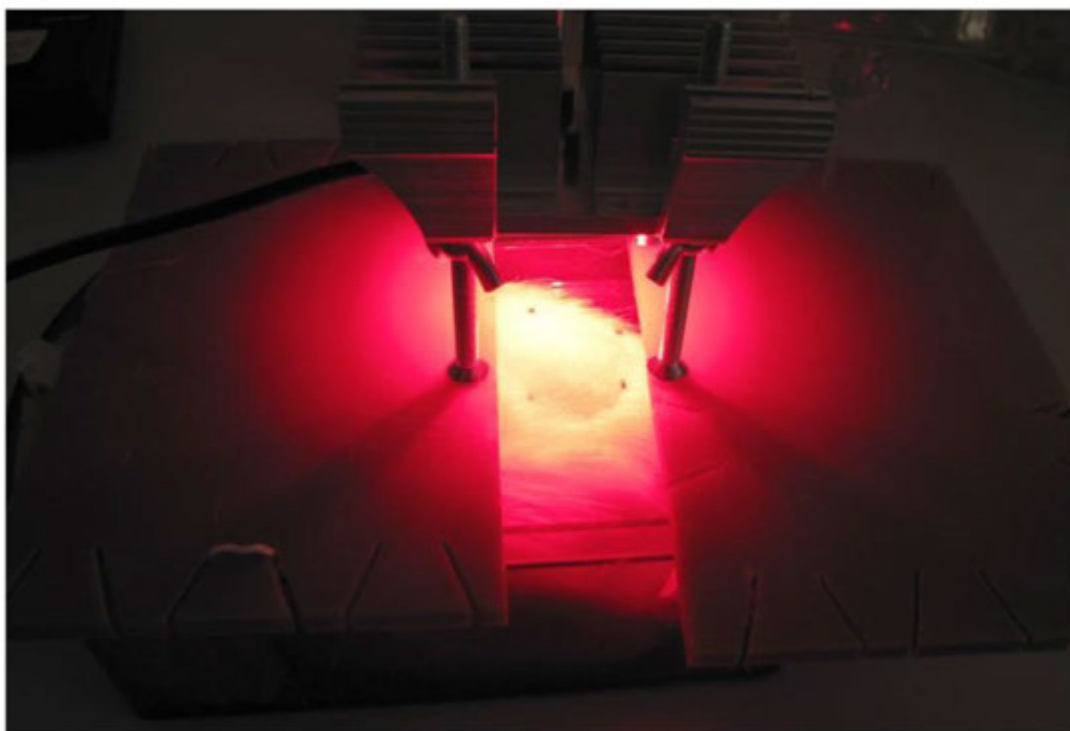
Účinek obou ftalocyaninových fotosenzibilizátorů byl hodnocen na základě přežívání počtu mikrobů po ozáření laserem k počtu mikrobů v kontrolních vzorcích (tzv. survival fraction). Látky byly testovány ve dvou pokusech, součástí pokusů byly i kontrolní testy pro zjištění vlivu samotné látky na mikrobiální kulturu bez ozáření a také pro vyhodnocení vlivu samotného ozáření bez přítomnosti testovaného ftalocyaninu.

Systém Stomaset byl účinnější než Fotosan; oba ftalocyaniny vykazovaly nejsilnější *in vitro* efekt proti kmenům hub *C. albicans* a *T. mentagrophytes*, z bakterií byla citlivější *E. coli* než *S. aureus* (viz Tab. 1).

Tabulka 1. Vyhodnocení *in vitro* účinku\* systému Stomaset (ftalocyaniny Pc7 a Pc9) a Fotosan (toluidinová modř) proti vybraným mikrobiálním kmenům

Látka	Testovaný kmen	Stomaset 40 J/cm <sup>2</sup>		Fotosan ozáření delším intervalem	
		8 mg/l	100 mg/l	8 mg/l	100 mg/l
Pc7	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,26	0,038	0,54	0,33
	<i>Escherichia coli</i>	0,00053	0,058	0,096	0,0061
	<i>Candida albicans</i>	0	0,47	0,084	0,65
	<i>T. mentagrophytes</i> IDE 131773	nt	0	nt	nt
	<i>Trichophyton A. benhamiae</i> KU 115	0,002920	nt	nt	nt
	<i>Trichophyton A. benhamiae</i> SK 3286	0,000798	nt	nt	nt
Pc9	<i>St. aureus</i>	0,57	0,026	0,57	0,26
	<i>Escherichia coli</i>	0,94	0,020	0,090	0,0055
	<i>Candida albicans</i>	0,78	0,00089	0,094	0,55
	<i>T. mentagrophytes</i> IDE 131773	nt	nt	nt	nt
	<i>Trichophyton A. benhamiae</i> KU 115	0,023358	nt	nt	nt
	<i>Trichophyton A. benhamiae</i> SK 3286	0,058413	nt	nt	nt
TB**	<i>Staphylococcus aureus</i>	nt		0,32	
	<i>Escherichia coli</i>	nt		0,64	
	<i>Candida albicans</i>	nt		0,86	
	<i>Trichophyton A. benhamiae</i> SK 3286	nt		nt	

\* survival fraction; \*\* TB – toluidinová modř; nt - netestováno



K ozáření monochromatickým světlem (660 nm) přístroje Stomaset byl využit speciálně vyhotovený nástavec, který tvarem (plochou) kopíroval velikost plochy skarifikované kůže a zajišťoval konstantní vzdálenost a tím rovnoměrné ozáření. Byl nastaven na hodnotu výkonu 9/10 a čas 6,5 minuty, který odpovídal celkové dávce 40 J/cm<sup>2</sup>. Konstantní vzdálenost diod od kůže 3,5 cm (upraveno posunem šroubů).

Jako fotosenzibilizátor byl vybrán ftalocyanin: **Pc7** v koncentraci **8mg/L** rozpuštěný v destilované vodě a aplikován v množství 100μL.