

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Marius Šidla

ASKORBATO POVEIKIO ALIUMINIO FTALOCIANINO TETRASULFONATO SUKELTIEMS
OSKIDACINIAMS PROCESAMS SPEKTROSKOPINIAI TYRIMAI SKIRTINGO pH VANDENINĖSE
MODELINĖSE TERPĖSE

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas
Gyvybės ir cheminė fizika

Studentas

Marius Šidla

Leista ginti

2021-05-21

Darbo vadovas

doc. Saulius Bagdonas

Instituto direktorius

prof. Valdas Šablinskas

Vilnius 2021

Padėka

Dėkoju Nacionalino vėžio instituto Biomedicininės fizikos laboratorijai už galimybę naudotis lazeriu.

Dėkoju Arūnui Maršalkai ir Vidmantui Kalendrai už duotus patarimus bei atsakytus klausimus susijusius su elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometrija.

Turinys

Padėka	1
Santrumpos.....	3
Įvadas	4
1. Literatūros apžvalga:	5
1.1. Fotosensibilizacija	5
1.2. L-asc chemines savybes:	7
1.3. Antocianinai, mėlynoji balnapupė.....	8
2. Metodika	9
2.1. Darbe naudoti prietaisai ir medžiagos	9
2.2. Mėlynosios balnapupės ekstrakto paruošimas	9
2.3. Bandinių švitinimo metodika, UV-VIS sugerčiai matuoti.	10
2.4. Elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometro nustatymai.	10
2.5. Švitinimo metodika, elektronų paramagnetiniam rezonansui matuoti.	11
3. Rezultatai ir jų aptarimas	12
3.1. L-asc ir AlPcS ₄ UV-VIS spektriniai pokyčiai sukelti švitinimo, skirtingose terpėse.	12
3.2. L-asc antioksidacinis poveikis antocianinų oksidacijai sukeltai AlPcS ₄ ir šviesos skirtingo pH terpėse.	18
3.3. Skirtingo rūgštingumo terpių įtaka AlPcS ₄ ir Vit C mišinių EPR signalams.....	22
4. Išvados	27
Literatūros sąrašas.....	28
Santrauka.....	31
Summary	32

Santrumpos

AlPcS₄ – Aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas

L-asc – L-askorbo rūgštis, askorbatas, šiame darbe šis trumpinys naudojamas kaip bendras L – askorbo rūgšties terminas. L-ascH₂ – nedisocijavusi askorbo rūgšties forma, L-ascH⁻ 1 kartą disocijavusi (monoanijonas), L-asc²⁻ - du kartus disocijavusi (dianijonas), L-asc^{•-} - askorbo radikalas.

Sub -substratas.

Sens - fotosensibilizatorius.

DHA – dehidroaskorbo rūgštis.

UV-VIS – artimoji ultravioletinė ir regimoji elektromagnetinių bangų ilgių sritis.

O.t.v. – optinio tankio vienetai.

MPC^{•-} – metalo ftalocianino redukuotas radikalas.

Įvadas

Fotodinaminė vėžio terapija, tai potencialus vėžio gydymo metodas. Šio metodo principas prisotinti vėžio audinį fotosensibilizatoriais, ir su šviesos pagalba sukelti tokį oksidacinį stresą, kad žūtų vėžio ląstelės. Šiame darbe tiriama medžiaga – Aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas (toliau AlPcS₄) yra antros kartos fotosensibilizatorius. Jis pasižymi dideliu tirpumu, stabilumu, dėl ko patogiu daryti AlPcS₄ tyrimus vandeninėse terpėse.

Kita šiame darbe tirta medžiaga – L-askorbo rūgštis (toliau L-asc). Tai svarbi žmonių organizmui medžiaga, pasižymi oksidacinėmis, bei redukcinėmis savybėmis. Ši medžiaga tirta kaip vėžį slopinantis preparatas. Viena iš L-asc savybių – H₂O₂ generavimas, dėl kurio galima farmakologinėmis L-asc koncentracijomis naikinti vėžio ląsteles [1].

Kramarenko G.G. ir kt. [2] savo darbe rado, jog kai kuriose situacijose L-asc gali sustiprinti fotodinaminės terapijos efektyvumą. Šiame darbe tiriama kaip L-asc paveikia AlPcS₄ ir šviesos sukeltus oksidacinius procesus vandeninėje terpėje. Norima sužinoti kaip L-asc paveikia fotosensibilizatoriaus stabilumą. Ar L-asc oksidacinės ir redukcinės savybės skatina ar slopina kitų biologinių medžiagų degradaciją, kuri yra sukelta fotosensibilizacijos. Pastarųjų medžiagų vietą šiame darbe užima antocianinai, išgauti iš mėlynosios balnapupės žiedlapių. Šio darbo tikslas: įvertinti L-askorbo rūgšties oksidacinių bei redukcinių savybių poveikį AlPcS₄ ir antocianinų stabilumui, skirtingo pH vandeninėse terpėse, vykstant fotosensibilizacijai.

Tikslui įgyvendinti iškeltos užduotys:

1. Pasinaudojant artimosios ultravioletinės bei regimosios (toliau UV-VIS) spektrometrijos metodu nustatyti, kaip skirtingos L-askorbo rūgšties koncentracijos paveikia aliuminio ftalocianino tetrasulfonato stabilumą skirtingo pH vandeninėse terpėse, vykstant fotosensibilizacijai.

2. Pasinaudojant UV-VIS spektrometrijos metodu, nustatyti, kokį efektą turi skirtingos L-askorbo rūgšties koncentracijos antocianinų oksidacijai, sukeltai aliuminio ftalocianino tetrasulfonato ir šviesos, skirtingo pH vandeninėse terpėse.

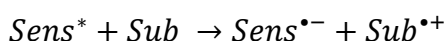
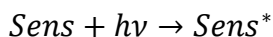
3. Pasinaudojant elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometrija, įvertinti terpės pH poveikį oksidaciniams procesams L-askorbo rūgšties ir AlPcS₄ mišiniuose, apšviestuose skirtingo intensyvumo šviesa.

1. Literatūros apžvalga:

1.1. Fotosensibilizacija.

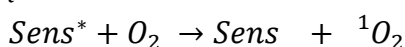
Fotosensibilizacija tai reiškinys, kai molekulė sugėrusi šviesos kvantą sukelia pokyčius kitai molekulei. Molekulė sugėrusi šviesos kvantą vadinama fotosensibilizatoriumi (Sens), o pakitusi molekulė vadinama substratu (Sub) [3]. Yra du pagrindiniai fotosensibilizacijos tipai, juos ir patį fotosensibilizacijos reiškinį neblogai aprašo N. L. Oleinick [3] ir R. Rotomskis ir kt. [4]

I tipo reakcijos, yra reakcijos, kai sužadintas fotonu fotosensibilizatorius tiesiogiai reaguoja su substratu ir jį oksiduoja pasisavindamas elektroną (arba vandenilį):



Susidarę radikalai gali reaguoti su aplinkinėmis molekulėmis sudarydami oksidacinius produktus, bei kitus radikalus. Pvz. reaguodami su deguonimi gali sudaryti superoksidą $O_2^{\bullet-}$ arba peroksidradikalą HO_2^{\bullet} , tai yra reaktyvios deguonies rūšys, sukeliančios pažaidas aplinkinėms molekulėms, o jų perteklius turi destruktivų efektą ląstelėms.

II tipo reakcijos – tai dažniausiai pasireiškiančios reakcijos, įvykstančios kai sužadintas fotosensibilizatorius reaguoja su tripletinės būsenos (nesužadintas) deguonimi sudarydamas singletinį deguonį:



Kaip rašo Glaeser J. ir kt. [5] singletinis deguonis yra viena pagrindinių medžiagų atsakingų už oksidacinį stresą. Taigi fotosensibilizacijos pasekmė yra substrato oksidacija.

Panaudojimas

Fotosensibilizacija turi nemažai panaudojimo būdų. M. C. DeRosa ir R. J. Crutchley [6.] savo apžvalgoje mini keletą singletinio deguonies panaudojimo būdų: nuotekų valymas, kraujo sterilizavimas, fotodinaminė terapija, insekticidai ir herbicidai. John Khadem ir kt. [7] panaudojo fotosensibilizatorius pelių akių pjūvių klįjavimui. Viena iš labiausiai tyrinėjamų fotosensibilizacijos panaudojimo sričių – fotodinaminė terapija. Castano A. P. ir kt. [8 - 10] savo trijų dalių apžvalgoje aptaria fotodinaminės terapijos mechanizmus ir panaudojimą. Pagrindinis terapijos principas yra lengvai paaiškinamas. Fotosensibilizatoriai sukaupiami vėžio/auglio audinyje ir šviesos šaltiniu apšviečiamas šis audinys. Vykstant fotosensibilizacijai oksidaciniai procesai sukuria pažaidas ląstelėse, dėl kurių jos miršta. Žmogaus audiniai sugeria šviesą, tad šviesa negali giliai įsiskverbti į audinį, todėl pagrindinės gydymo vietos yra paviršiai kuriuos galima apšviesti – oda, virškinimo traktas.

Fotosensibilizatoriai skirstomi į tris kartas, Wöhrle D. jas apibudina taip [11]:

Pirmoji karta: Hematoporfirino dariniai, neturi selektyvaus kaupimosi augliniuose audiniuose.

Antroji karta: struktūriškai skirtingos medžiagos, pasižyminčios ilgabangės šviesos sugertimi, neturi selektyvaus kaupimosi auglių audiniuose.

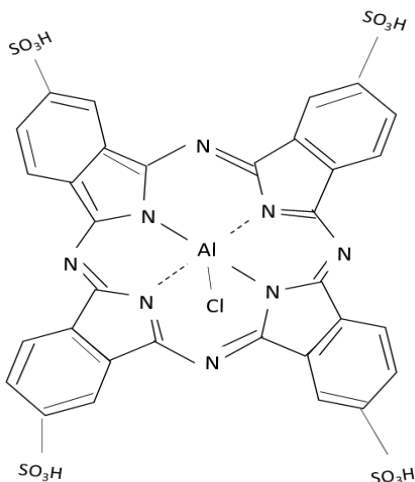
Trečioji karta: tai antros kartos sensibilizatoriai prijungti prie nešikų selektyviam kaupimuisi vėžio audiniuose.

Antros kartos fotosensibilizatoriai turi pranašumų palyginus su pirmąja karta. Jų ilgabangė sugertis yra ties 675-800nm, tuo tarpu tarp pirmos kartos fotosensibilizatorių ilgiausia sugerties juosta yra 630 nm, kurios

ekstinkcijos koeficientas yra mažas. Šviesa gebanti sužadinti pirmos kartos fotosensibilizatorių gali prasiskverbti tik 5mm žmogaus audinio, o antros kartos fotosensibilizatorių – 2 – 3cm. Antros kartos sensibilizatoriai pasižymi singletinio deguonies generavimo kvantiniu našumu didesniu nei 0,3 [11].

Aluminio ftalocianino tetrasulfonatas

Šiame darbe tiriama medžiaga yra aluminio ftalocianino tetrasulfonatas (1 pav.), tai antros kartos fotosensibilizatorius pasižymintis sugerties juosta ties 675 nm, $\epsilon_{675}=1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [12]. AlPcS₄ yra gana stabili medžiaga[13]. Jis turi keturias sulfoninės rūgšties grupes, kurios padaro šią molekulę labai tirpią vandenyje. Nesiagreguoja net reliatyviai didelėse koncentracijose, sugerties savybės nesikeičia tarp 10⁻⁸M ir 10⁻⁴M [14.]. AlPcS₄ pastaruosius kelis dešimtmečius yra populiariai tiriamas vėžio gydymo tikslais, su perspektyviais rezultatais [13, 15 , 16].



1 pav. Aluminio ftalocianino tetrasulfonato cheminė struktūra.

Fotosensibilizatorių fotoblukimas

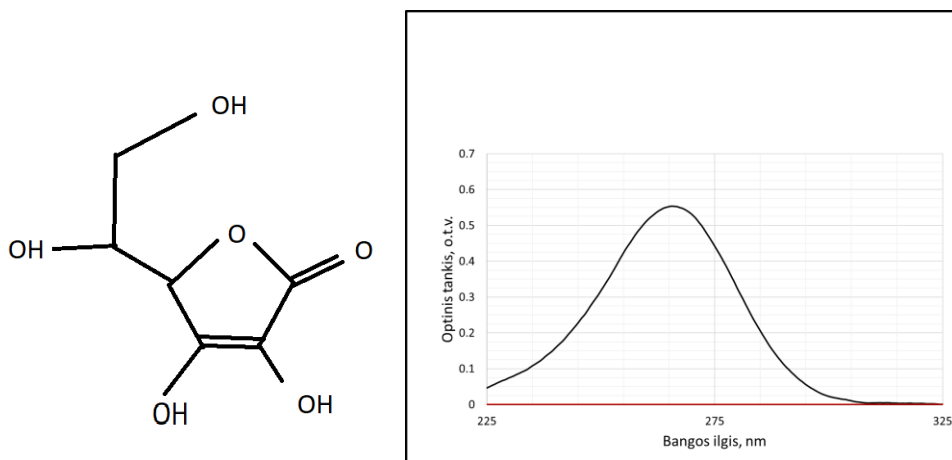
Fotoblukimas bendrai vadinamas procesas kurio metu nyksta medžiagos sugerties juosta, o nykimas sąlygotas šviesos. Fotoblukimas pasireiškia medžiagai kintant arba degraduojant. Yra išskiriamas dviejų tipų negrįžtamas fotoblukimas [17]: **Fotomodifikacija** – tai sugerties mažėjimas pasireiškiantis kai kuriuose bangos ilgiuose, tačiau chromoforas yra išlaikomas pakitusioje formoje. **Tikrasis fotoblukimas** – kur cheminė struktūra taip pakinta, kad galiausiai iš molekulės lieka maži regimojoje srityje sugerties neturintys fragmentai.

1.2. L-asc chemines savybes:

Šiame darbe tiriama medžiaga L-askorbo rūgštis (2 pav.) yra gerai žinoma kaip vitamino C forma. Vitaminas C yra gyvybiškai svarbi žmogaus organizmui medžiaga, kurios žmogaus kūnas negali pasigaminti pats ir privalo gauti su maistu. Vitaminas C panaudojamas žmogaus organizmo įvairių medžiagų biosintezei, tokių kaip kolagenas, bei yra svarbus antioksidantas pasižymintis savybe regeneruoti kitus antioksidantus, tokius kaip vitaminą E [18, 19], ir tai yra tik keletas paminėtų svarbių savybių.

Pastaruosius kelias dešimtis metų vitaminas C yra tyrinėjamas kaip pagalbinė medžiaga vėžio gydyme. Francisco J. Roa ir kt. [20] apžvalgoje rašoma, jog tyrimuose *in vitro*, bei su pelėmis pastebėtas pozityvus vėžio gydymo poveikis, tačiau tyrimuose su žmonėmis aiškias gydančio poveikio nėra pastebėta. Qi Chen ir kt. [1] teigia, kad farmakologinės askorbo rūgšties koncentracijos naikina vėžinės ląstelės dėka H_2O_2 generavimo. Kramarenko G.G. ir kt. [2] savo darbe rado, kad L-asc gali sustiprinti fotodinaminės terapijos efektyvumą, ląstelėse kurios neturi apsauginių mechanizmų nuo H_2O_2 .

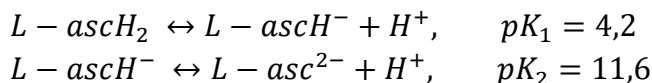
Toliau išvardijamos svarbios L-asc cheminės savybės.



2 pav. L-askorbo rūgšties cheminė struktūra ir L-askorbo rūgšties 0,1 mM sugerties spektras pH 7.

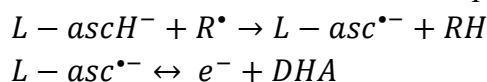
Disociacija

L-asc yra tirpi vandenyje rūgštis turinti dvi jonizuojamas hidroksilo grupes [21]. Vandenyje disocijuoja į monoanijoną ir dianijoną:



Antioksidacija

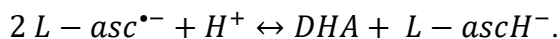
$L - ascH^-$ yra donoras antioksidantas, geba atiduoti H^+ , H^\bullet , e^- oksiduojančiam radikalui, susidaro $L - asc^{\bullet-}$ radikalas, kuris atiduodamas e^- pavirsta į DHA (dehidroaskorbo rūgštis) [21, 22]:



DHA oksiduojantis, sudaro L-asc savybiu nebeturinčius produktus, tai yra pagrindinė L-asc degradacijos priežastis [19].

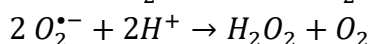
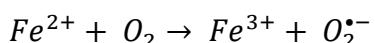
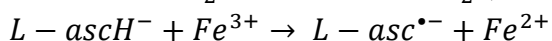
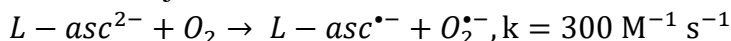
Dismutacija

$L - asc^{\bullet-}$ yra relatyviai nereaktyvus dėl nesuporuoto elektrono rezonansinės stabilizacijos, tačiau lengvai dismutuoja [21]:

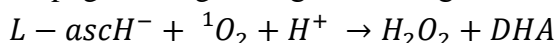


Oksidacija ir prooksidacinės savybės

Vienas L-asc oksiduojasi gan lėtai $k=300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, tačiau oksidaciniai procesai yra stipriai pagreitinami katalitiniiais metalo jonais [21]:

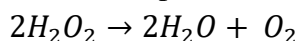


Taipogi L-asc gali reaguoti su singletinės būsenos deguonimi:



Taigi oksidacijos metu susidaro vandenilio peroksidas, pasižymintis oksidacinėmis, antibakterinėmis savybėmis [23].

Vandenilio peroksidas skyla į vandenį ir deguonį:



1.3. Antocianinai, mėlynoji balnapupė

Antocianinai yra natūralūs spalvą turintys pigmentai, kurių spalva kinta nuo aplinkos pH. Tai yra vieni iš pagrindinių augalų spalvą lemiančių pigmentų. Šios medžiagos yra antocianidinų glikozidai. Antocianinai augaluose turi svarbias roles. Liu Y. ir kt. [24] apžvalgoje rašoma, jog antocianinai dėka savo spalvos pritraukia apdulkingojuos, apsaugo augalą nuo abiotinio ir biotinio streso. Taipogi rašoma, jog antocianinai veikia kaip fotoapsauginės medžiagos apsaugančios fotosintetinį mechanizmą sugerdamos perteklinę spinduliuotę, bei valydamos laisvuosius radikalus.

Antocianinai turi potencialią sveikatos naudą žmonių organizmui [24, 25]. Khoo H.E. ir kt. [25] apžvalgoje rašo, jog antocianinai turi pozityvių efektų širdies ir kraujagyslių, vėžio ligų, bei diabeto gydime. Yang L. ir kt. [26] meta-analizėje rašo, jog antocianinai turi naudos kardiometabolinių ligų prevencijai bei kontroliavimui.

Antocianinai kaip ir L-asc turi antioksidacinių savybių. Abi medžiagos geba valyti reaktyvias deguonies formas [27]. Tačiau Veridiana V. et al [28] parodė, jog askorbo rūgštis padidina antocianinų nestabilumą ekstraktuose iš kraštuotosios malpigijos. M.H. Choi ir kt. [29] gavo panašius rezultatus. Kruvinųjų apelsinų sulčių antocianinų degradacija koreliavo su askorbo rūgšties degradacija, taipogi rudavimo indeksas buvo didesnis sultyse su didesniu askorbo rūgšties kiekiu.

Šiame tyrime kaip antocianinų šaltinis, naudoti mėlynosios balnapupės (*clitoria ternatea*) žiedlapiai. Mėlynoji balnapupė turi ne vieną, o keletą antocianinų rūšių [30], o jos antocianinai yra ganėtinai stabilūs.

2. Metodika

2.1. Darbe naudoti prietaisai ir medžiagos

- Du 671 nm kiekio kūno nuolatinės veikos lazeriai.
- Lazerių švietimo intensyvumas matuotas „OPHIR Nova“ lazerio galios matuokliu, gamintojas „Ophir“.
- UV-VIS sugerties spektrometras „AvaSpec – 2048 – SPU“ gamintojas „Avantes“.
- EPR spektrometras „Bruker ELSYS E 580“ gamintojas „Bruker Corporation“.
- Bandinių maišymui naudota „Yellow line MSH“ basic magnetinė maišyklė.
- Šiame darbe naudoti buferiniai tirpalai:
 - „FIXANAL“ pH 4 tirpalas, jį sudaro citrinos rūgštis, natrio hidroksidas ir natrio chloridas. Gamintojas „Fluka Analytical“
 - „FIXANAL“ pH 10 tirpalas, jį sudaro natrio tetraboratas ir natrio hidroksidas. Gamintojas „Fluka Analytical“.
 - pH 7 tirpalas padarytas maišant natrio hidroksidą su kalio dihidrofosfatu, šių medžiagų gamintojas – „Riedel – de Haën“. Kalio dihidrofosfato buferinio tirpalo koncentracija lygi 0,05M.
- L-askorbo rūgštis, gamintojas „Sigma – Aldrich“.
- Aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas, gamintojas - „Porphyrin Products Inc“.
- Mėlynosios balnapupės žiedlapiai, kilmės šalis – Tailandas.

2.2. Mėlynosios balnapupės ekstrakto paruošimas

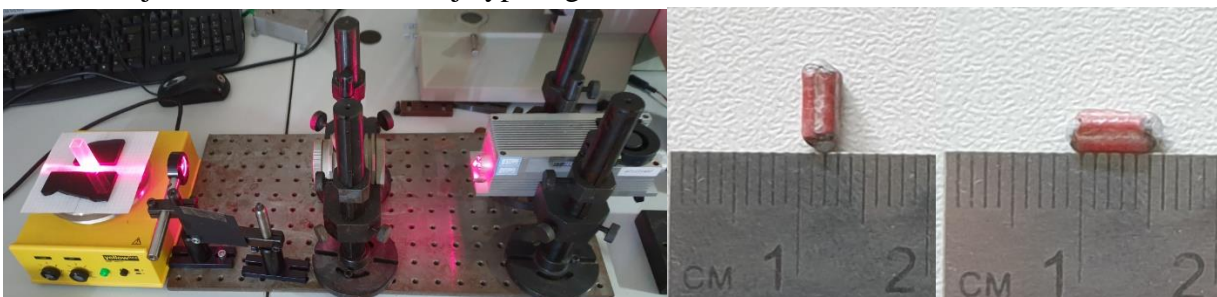
Išdžiovinti mėlynosios balnapupės žiedlapiai buvo sutrinti į miltelius, milteliai sumaišomi su distiliuotu vandeniu, ir laukiama apie 30 minučių, kol vanduo įsisotins iš žiedlapių ištirpusia dažančia medžiaga. Ekstraktas toliau išfiltruojamas popieriniu filtru, tam kad nebūtų žiedlapių likučių tirpale. Buvo siekiama kad 100ml balnapupės ekstrakto sumaišyto su 900ml pH 7 buferiu ties 625 nm turėtų optinį tankį lygų 0,5. Pastebėta, jog pH 7 terpėje iki 0,6 o.t.v. (optinio tankio vienetai) 625 nm sugerties juosta buvo tiesiškai proporcinga ekstrakto kiekiui su 0,02 optinio tankio paklaida. Ektrakto kiekis kurio o.t.v. ties 625 nm didesnis už 0,6 o.t.v. bei mažesnis už 0,2 o.t.v. nebuvo tikrintas.

2.3. Bandinių švitinimo metodika, UV-VIS sugerčiai matuoti.

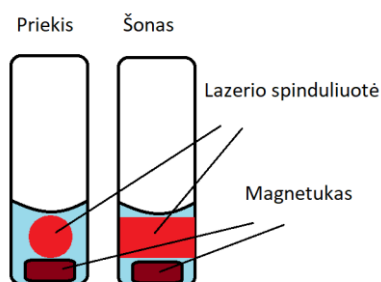
Švitinimo schema pavaizduota 3 pav. Tiriamoji objektai yra 1 cm³ tūrio tirpalai. Tiriamieji objektai tirti 1 cm storio ir ilgio kvarcinėje kiuvetėje. Šioje kvarcinėje kiuvetėje įdėtas savadarbis magnetukas 3 pav.. Magnetukas, tai keturi 4mm ilgio ir 1 mm storio strypeliai nukirpti nuo sąvaržėlės, ir suvynioti parafilmo plėvele, taip, kad tirpalas neturėtų sąlyčio su metalais.

Švitinimui, nebent nurodoma kitaip, bandiniai padedami ant magnetinės maišyklės centro, magnetinė maišyklė išsuka magnetuką iki 3,1 apsisukimo per sekundę. Maišomas bandinys apšviečiamas lazeriu, kurio spindulys išplečiamas lęšiu taip, kad spinduliuotė neapšviestų skysčio paviršiaus, bei magnetuko 4 pav. Apšviestas plotas skritulio formos ir jo diametras yra 6-7 mm.

Šiuo būdu yra mažai iššvaistoma spinduliuotė bei, išrinkus ir surinkus sistemą, kartojant eksperimentus, rezultatai atkartojami, sistema nereikalauja ypatingo tikslumo.



3 pav. kairėje – švitinimo schema, dešinėje – magnetukas ir jo matmenys.



4 pav. kiuvetės apšvietimas.

2.4. Elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometro nustatymai.

Magnetinio lauko dažnis 9.858GHz.

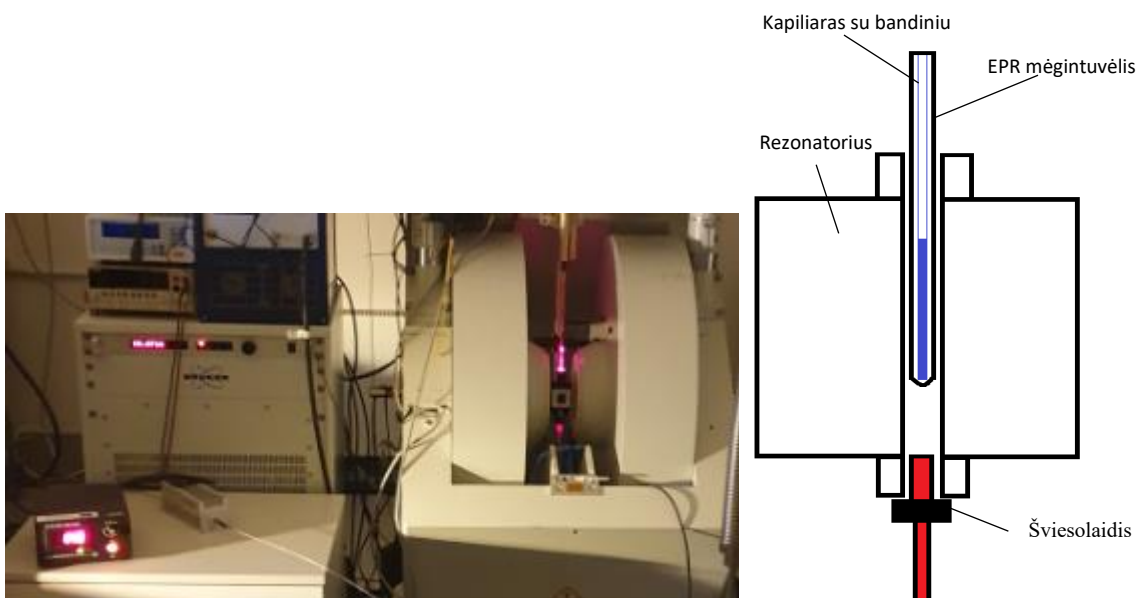
Mikrobangų galia 2.993 mW.

Magnetinio lauko moduliacijos dažnis 100kHz.

Moduliacijos amplitudė 0,8G.

2.5. Švitinimo metodika, elektronų paramagnetiniam rezonansui matuoti.

Švitinimo schema pavaizduota 5 pav. Tiriamieji objektai yra 30 μl tirpalai. Tiriamieji objektai patalpinti 50 μl „BLAUBRAND intraMARK“ kapiliaruose, jų galai yra užkimšti specialia pasta, neturinčia elektronų paramagnetinio rezonanso (toliau EPR) signalo. Kapiliarai įstatyti į EPR mėgintuvėlį, kuris įstatytas į EPR rezonatorių. Iš apačios į rezonatorių įstatytas šviesolaidis prijungtas prie lazerio. Taigi bandinys yra apšviečiamas lazeriu išilgai. Šio metodo trūkimas, yra tai, kad nėra galimybės tiksliai išmatuoti kiek šviesos patenka ant bandinio ir kiek yra išsklaidoma arba sugerama aplinkos. Tačiau analogiškai UV-VIS bandinių švitinimo metodikai, rezultatai atkartojami.



5 pav. EPR švitinimo schema.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. L-asc ir AlPcS₄ UV-VIS spektriniai pokyčiai sukelti švitinimo, skirtingose terpėse.

L-asc ir AlPcS₄ UV-VIS spektriniai pokyčiai buvo stebimi skirtingo pH terpėse: pH 4,0, pH 7,0, pH 10,0. Visų tirpalų tūris lygus 1 ml, buferinis tirpalas sudarė 0,5 ml tūrio, likęs tūris sudarytas iš distiliuoto vandens bei tiriamųjų medžiagų. Kiekvienai terpei buvo pagaminti 5 bandiniai švitinimui, bei 3 bandiniai tamsinėms kontrolėms. Dabar ir toliau nurodomų bandinių pradinių koncentracijų paklaida yra apie 5%.

Tamsinių kontrolių bandinių sudėtys:

- AlPcS₄ 3,2 μM.
- L-asc 1,0 mM.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 1,0 mM.

Tamsinių kontrolių spektrai buvo išmatuoti iškart po pagaminimo, bei po 15 minučių palaikymo tamsoje. Visų pH tamsinės kontrolės buvo stabilios ir neturėjo jokių spektrinių pokyčių per 15 min.

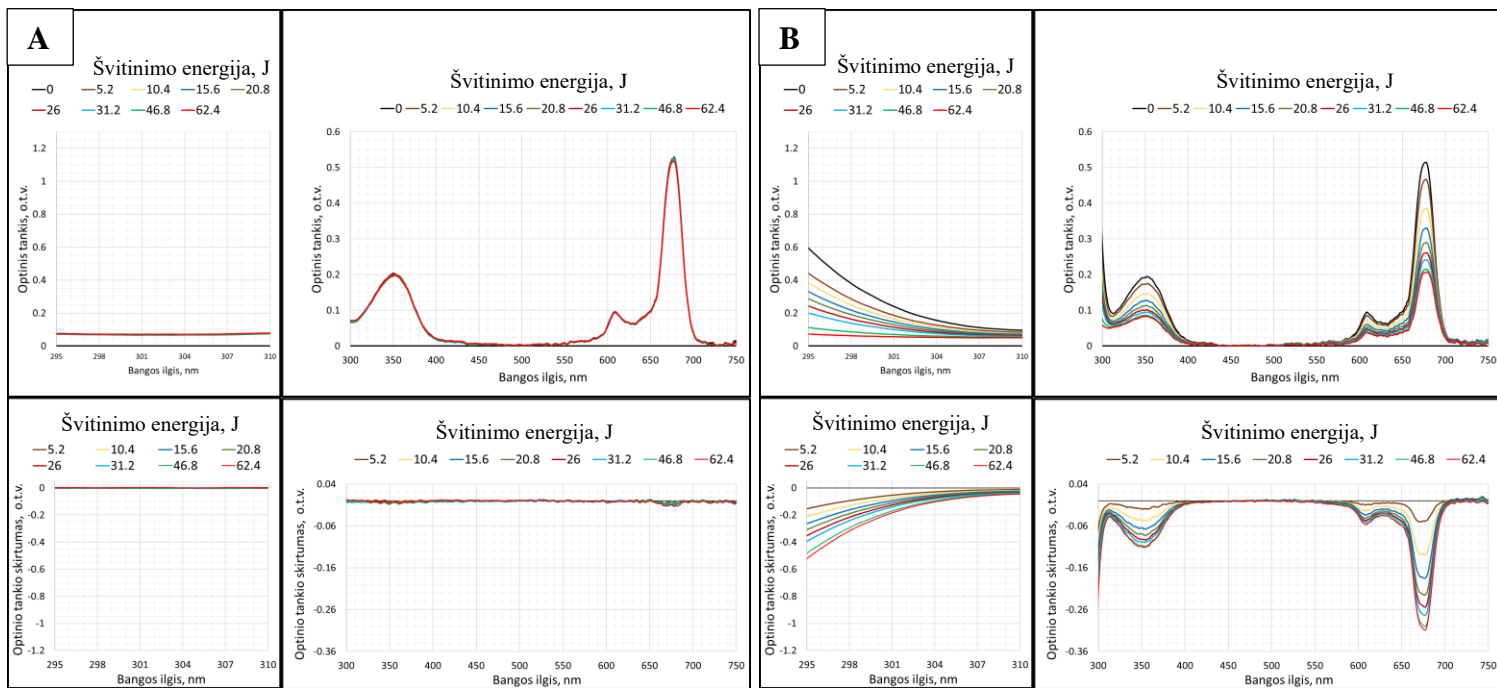
Švitinamų bandinių sudėtys:

- AlPcS₄ 3,2 μM.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,25 mM.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,5 mM.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,75 mM.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 1,0 mM.

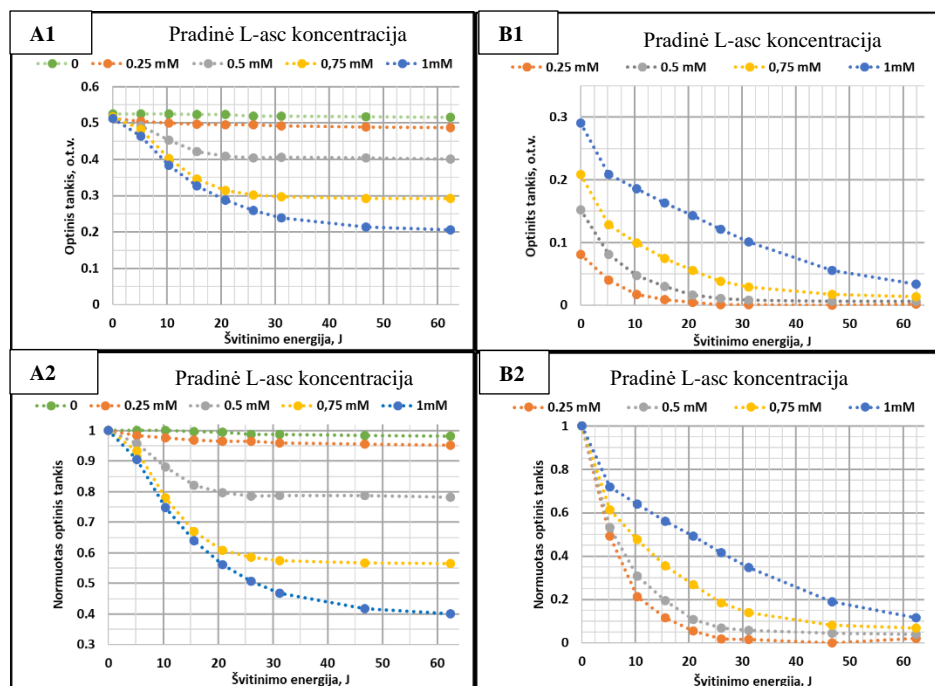
Švitinami bandiniai buvo švitinami 671 nm nuolatinės veikos lazeriu. Spinduliuotės intensyvumas lygus 130 mW, apšviestas plotas lygus 0,33cm². Kiekvienas bandinys švitinamas 6 kartus po 40 sekundžių ir po to 2 kartus po 2 minutes, Švitinimo energijos lygios 5,2, 10,4, 15,6, 20,8, 26, 31,2, 46,8, 62,4 J kiekvienam kartui atitinkamai. Toliau pateikiami švitintų bandinių spektriniai pokyčiai: terpių pH 4,0 paveikslėliuose 6 ir 7, pH 7,0 – 8 ir 9 pav., pH 10,0 – 10 ir 11 pav.

AlPcS₄ pokyčiams įvertinti naudotas 675nm bangos ilgis, o L-asc 298nm (L-asc darbe naudotos koncentracijos buvo per didelės, kad spektrometras galėtų išmatuoti 1 cm storio bandinius ties L-asc sugerties maksimumu, o naudojimas 1 mm storio kiuvetes reikštų metodikos keitimą).

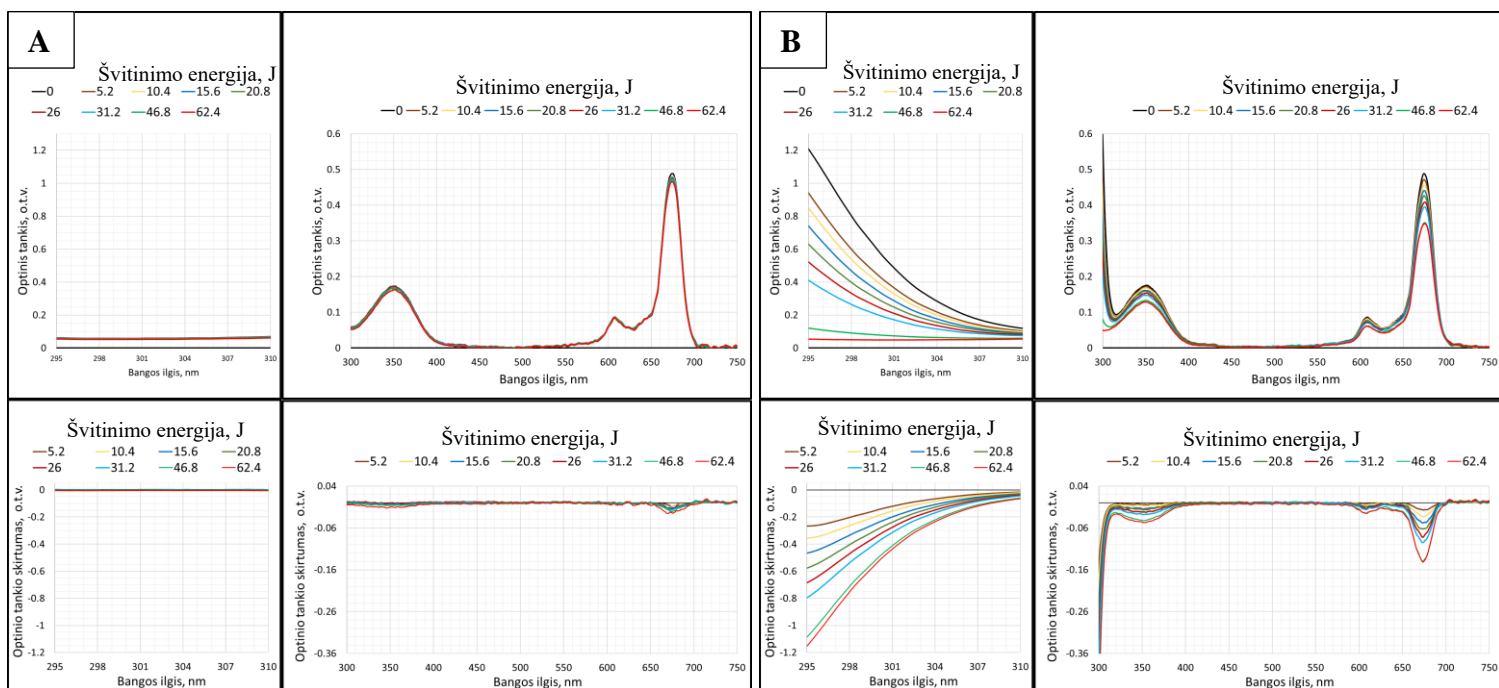
Nei AlPcS₄ nei L-asc spektrų formos nesikeitė maišant medžiagas tarpusavyje ir nesikeitė medžiagoms degraduojant. Optiniai tankiai proporcingi koncentracijoms su 0,02 o.t.v. (ir 5% pradinės koncentracijos) paklaida.



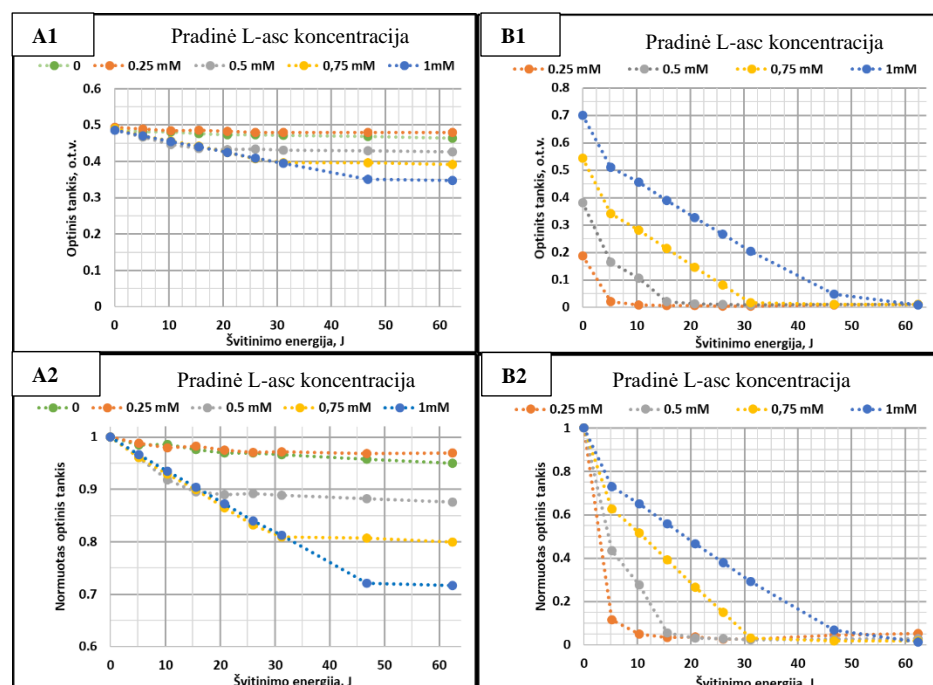
6 pav. švitintų tirpalų pH 4,0 terpės spektriniai pokyčiai: A – AlPcS₄ 3,2 μM B – AlPcS₄ 3,2 μM su L-asc 1 mM. Viršuje pavaizduoti sugerties spektrai, apačioje skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas nešvitinto bandinio spektras).



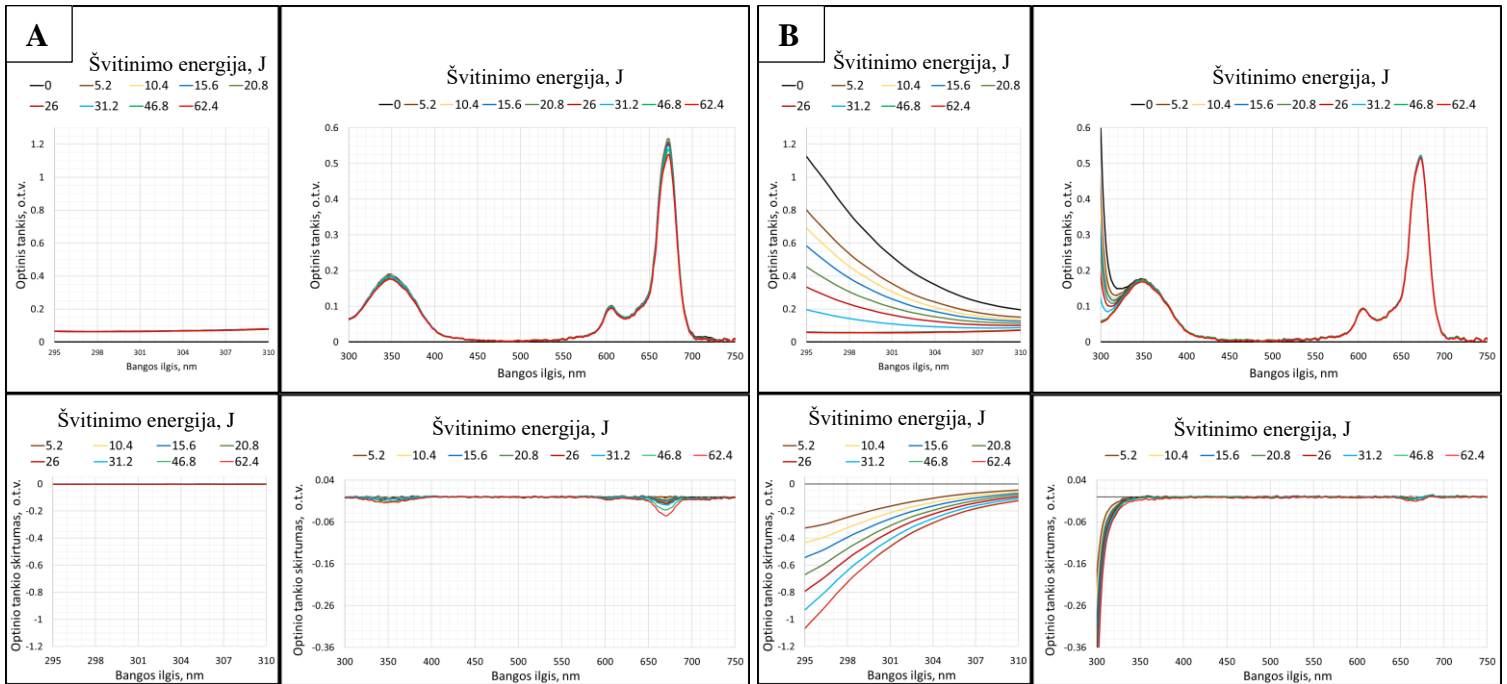
7 pav. švitintų AlPcS₄ 3,2 μM ir skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, tirpalų pH 4,0 terpės optinio tankio pokyčiai: A – AlPcS₄ komponentės optinio tankio pokyčiai ties 675 nm, B – sumodeliuoti L-asc komponentės optinio tankio pokyčiai (iš bendro spektro atimta AlPcS₄ komponentė) ties 298 nm. 1 – nenormuoti optiniai pokyčiai, 2 – normuoti optiniai pokyčiai.



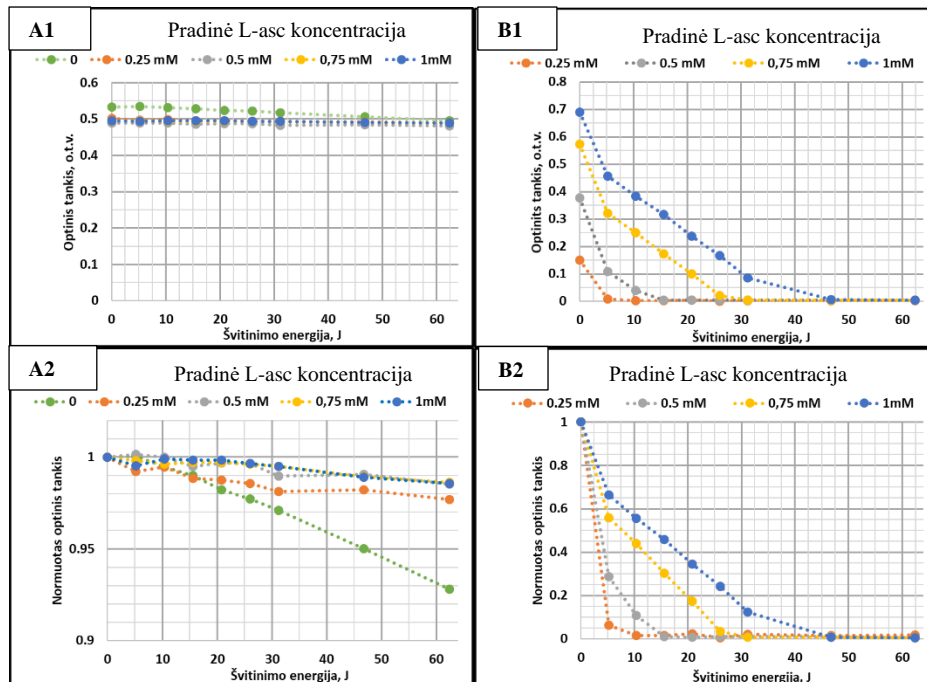
8 pav. švitintų tirpalų pH 7,0 terpės spektriniai pokyčiai: A – AlPcS₄ 3,2 μM B – AlPcS₄ 3,2 μM su L-asc 1 mM. Viršuje pavaizduoti sugerties spektrai, apačioje skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas nešvitinto bandinio spektras).



9 pav. švitintų AlPcS₄ 3,2 μM ir skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM tirpalų pH 7,0 terpės optinio tankio pokyčiai: A – AlPcS₄ komponentės optinio tankio pokyčiai ties 675 nm, B – sumodeliuoti L-asc komponentės optinio tankio pokyčiai (iš bendro spektro atimta AlPcS₄ komponentė) ties 298 nm. 1 – nenormuoti optiniai pokyčiai, 2 – normuoti optiniai pokyčiai.



10 pav. švitintų tirpalų pH 10,0 terpės spektriniai pokyčiai: A – AlPcS₄ 3,2 μM B – AlPcS₄ 3,2 μM su L-asc 1 mM. Viršuje pavaizduoti sugerties spektrai, apačioje skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas nešvitinto bandinio spektras).



11 pav. švitintų AlPcS₄ 3,2 μM ir skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM tirpalų pH 10,0 terpės optinio tankio pokyčiai: A – AlPcS₄ komponentės optinio tankio pokyčiai ties 675 nm, B – sumodeliuoti L-asc komponentės optinio tankio pokyčiai (iš bendro spektro atimta AlPcS₄ komponentė) ties 298 nm. 1 – nenormuoti optiniai pokyčiai, 2 – normuoti optiniai pokyčiai.

Terpės įtaka L-asc formoms.

Kadangi benzensulfono rūgštis ($C_6H_5-SO_3H$) yra stipri rūgštis [31], šiame darbe laikoma, jog AlPcS₄ yra pilnai disociavęs. Tačiau L-asc joninės formų santykis skiriasi nuo pH. L-asc $pK_{a1}=4,2$ ir $pK_{a2}=11,6$.

- pH 4 turi didelį kiekį L-ascH₂ (~61,5%) ir didelį kiekį L-ascH⁻ (~38,5%).
- pH 7 dominuoja L-ascH⁻ (~99,9%).
- pH 10 taipogi dominuoja L-ascH⁻ (~97,5%), tačiau susidaro nemažas kiekis L-asc²⁻ (~2,5%).

AlPcS₄ pokyčiai

Didinant pH, AlPcS₄ spektras slenkasi į mėlynąją pusę, didžioji sugerties juostos ties ~675nm viršūnės pH 4 – 678nm, pH 7 – 675nm, pH 10 – 672nm. Su pakankamai tikslu spektrometriniu prietaisu galbūt įmanoma naudoti AlPcS₄ kaip pH indikatorių.

Pastebėta, jog pH 4 ir pH 7 terpėse AlPcS₄ spektras nesiskyrė ar jis yra sumaišytas su L-asc ar ne. pH 10 spektras visada sumažėdavo apie 8% procentus kai aplinkoje yra L-asc, šis sumažėjimas nebuvo proporcingas L-asc koncentracijai. Spektro pokytis atitiko AlPcS₄ spektro formą, kas galėtų indikuoti, jog įvyko tikrasis blukimas.

Švitintų bandinių AlPcS₄ degradacija priklausė nuo pH ir nuo L-asc. Be L-asc, AlPcS₄ yra stabiliausias pH 4, vidutiniškai stabilus pH 7, ir nestabiliausias pH 10. AlPcS₄ koncentracijų pokyčiai po 62,4J švitinimo energijos lygūs 3, 5, 7 % kiekvienam pH atitinkamai. AlPcS₄ spektro forma nepakito, taigi įvyko tikrasis blukimas. Fotosensibilizacijos metu deguonis veikia kaip oksidatorius, tad chromoforai suiro po deguonies oksidacijos.

Su L-asc koncentracija 0,5 mM ir didesne pokyčiai yra atvirkšti: pH 10 – stabiliausias, pH 7 – vidutiniškai stabilus, bei pH 4 – nestabiliausias. AlPcS₄ optinio tankio pokyčiai po 62,4 J švitinimo energijos lygūs 2, 28, 60 % atitinkamai. Kadangi AlPcS₄ spektro forma nesikeitė, tai galima teigti, jog medžiagai įvyko tikrasis blukimas. pH 10 deguonies oksiduotas chromoforas nesuiro nes L-asc jį redukavo. Analogiškai pH 4 ir 7 AlPcS₄ chromoforas suiro, L-asc redukavo jį neoksiduotą.

Galutinis AlPcS₄ pokytis rūgštinėje ir neutralioje terpėje proporcingas pradinei L-asc koncentracijai, bet ne esamai koncentracijai. Kai L-asc koncentracija 0,25 mM didelės įtakos pH 7 ir pH 4 terpėse neturėjo, o pH 10 veikė kaip ir kiti variantai.

Vitamino C pokyčiai

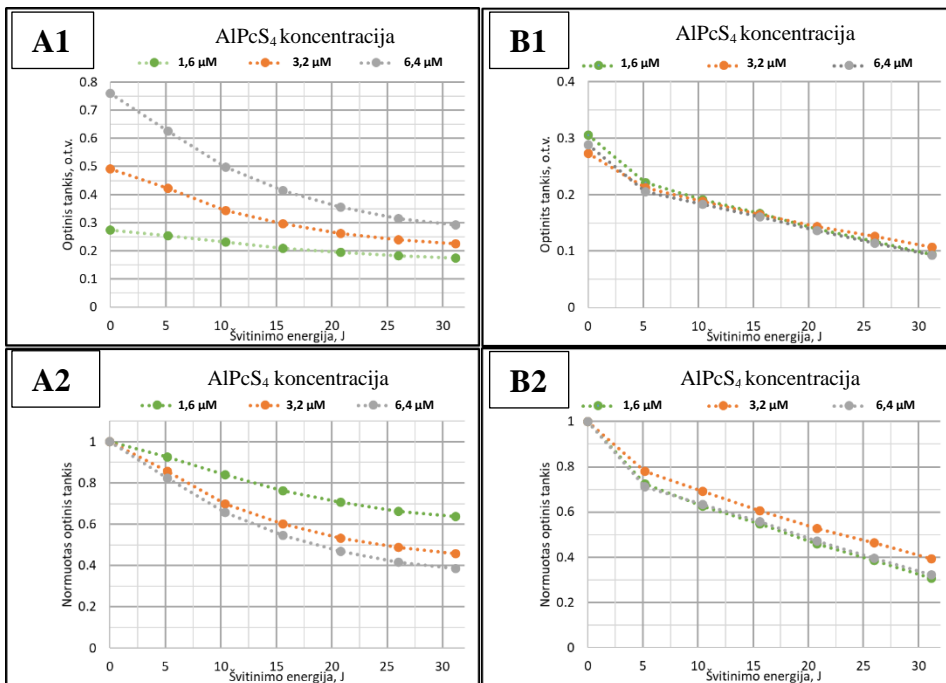
Švitintų bandinių L-asc stabilumas yra stabiliausias pH 4, vidutiniškai stabilus pH 7 ir nestabiliausias pH 10. Po 62,4 J švitinimo energijos, pH 7 ir pH 10 terpėse L-asc degradavo visiškai, o pH 4 liko 10%. Kadangi AlPcS₄ ir šviesa sukelia oksidacinius procesus, šią degradaciją galima priskirti oksidacijai.

Kai L-asc koncentracija $\geq 0,75$ mM, pH 10 ir pH 7 L-asc pokytis buvo tiesinis, pH 4 – tiesinis tik kai koncentracija lygi 1 mM. Šiam faktui užtikrintai įrodyti atliktas dar vienas eksperimentas. Švitinimi bandiniai pH 4,0 terpėje, kurių koncentracijos lygios:

- AlPcS₄ 6,4 μ M ir L-asc 1,0 mM
- AlPcS₄ 3,2 μ M ir L-asc 1,0 mM
- AlPcS₄ 1,6 μ M ir L-asc 1,0 mM

Bandiniai buvo švitinami 671 nm nuolatinės veikos lazeriu. Spinduliuotės intensyvumas lygus 130 mW, apšviestas plotas lygus 0,33 cm². Kiekvienas bandinys švitinamas 6 kartus po 40 sekundžių. Švitinimo energija lygi 5,2, 10,4, 15,6, 20,8, 26, 31,2 J kiekvienam kartui atitinkamai.

Rezultatai pavaizduoti 12 pav., ir jie vaizduoja, jog nesvarbu kokia AlPcS₄ koncentracija, L-asc pokytis yra toks pat. Tai reiškia, jog esamomis eksperimento sąlygomis, L-asc oksidacija nepriklauso nuo AlPcS₄ koncentracijos. Kadangi L-asc kitimo sparta nesikeičia, galima atmesti oksidacijos priklausomybę nuo esamos L-asc koncentracijos.



12 pav. švitintų AlPcS₄ koncentracijų: 1,6 μM, 3,2 μM, 6,4 μM ir L-asc 1 mM tirpalų pH 10,0 terpės optinio tankio pokyčiai: A – AlPcS₄ komponentės optinio tankio pokyčiai ties 675 nm, B – sumodeliuoti L-asc komponentės optinio tankio pokyčiai (iš bendro spektro atimta AlPcS₄ komponentė) ties 298 nm. 1 – nenormuoti optiniai pokyčiai, 2 – normuoti optiniai pokyčiai.

Tiesinis pokytis parodo, kad medžiagų, atsakingų už L-asc oksidaciją, koncentracija nesikeičia. Taip gali įvykti, jei tos medžiagos yra atstatomos. Pagrindinė fotosensibilizacijos procese dalyvaujanti medžiaga, galinti sukelti L-asc oksidaciją, yra deguonis. Sužadintas O₂ reaguodamas su pagrindinėmis L-asc formomis galiausiai patampa H₂O₂, kuris savo ruožtu skyla į H₂O ir į O₂ ir taip iš dalies atsistato. Sumažėjus deguoniui tirpale, naujo deguonies gali atsirasti tirpstant orui. Logiškas paaiškinimas galėtų būti, jog šiame darbe naudotas šviesos intensyvumas buvo pakankamai didelis, kad O₂ sužadinimas dėl fotosensibilizacijos pasiekia sotį net ir mažiausioje AlPcS₄ koncentracijoje, o sužadintas deguonis – pagrindinė medžiaga lemianti L-asc oksidaciją.

3.2. L-asc antioksidacinis poveikis antocianinų oksidacijai sukeltai AlPcS₄ ir šviesos skirtingo pH terpėse.

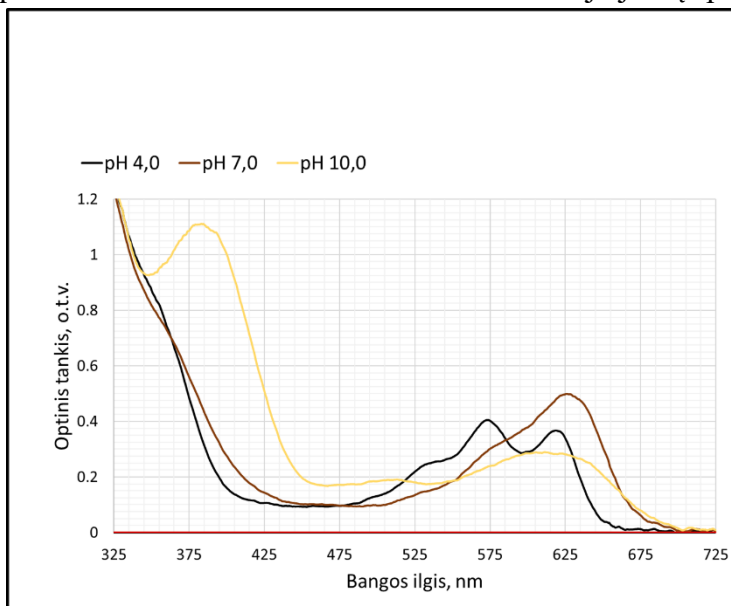
L-asc gali padaryti pažaidų fotosensibilizatoriaus chromoforui, tačiau svarbu žinoti ar panašūs efektai stebimi kitokioms svarbioms biologinės kilmės molekulėms. Šiame darbe tokios molekulės yra antocianinai, esantys mėlynosios balnapupės žiedlapių ekstrakte. Kaip minėta literatūros apžvalgoje, šios medžiagos turi gydomųjų savybių, tad jas galima interpretuoti kaip medžiagas potencialiai dalyvaujančias svarbiuose gyvybiniuose mechanizmuose. Pagrindė antocianinai atsakingi už mėlynosios balnapupės spalvą, o antocianinų spektro juostos šiame darbe yra tarp 525 ir 675nm (13 pav.).

L-asc, AlPcS₄ ir mėlynosios balnapupės ekstrakto mišinių UV-VIS spektriniai pokyčiai buvo stebimi skirtingo pH terpėse: pH 4,0, pH 7,0, pH 10,0. Visų tirpalų tūris lygus 1 ml, buferinis tirpalas sudarė 0,5 ml tūrio, likęs tūris sudarytas iš distiliuoto vandens bei tiriamų medžiagų. Kiekvienai terpei buvo pagaminti 5 bandiniai švitinimui, bei 4 bandiniai tamsinėms kontrolėms. Ektrakto antocianinų koncentracija nebuvo nustatyta tačiau kiekviename bandinyje buvo toks mėlynosios balnapupės kiekis, kad pH 7 ties 625 nm turėtų optinį tankį lygų 0,5 o.t.v. (13 pav.).

Tamsinių kontrolių bandinių sudėtys:

- AlPcS₄ 3,2 μM ir ekstraktas.
- L-asc 1,0 mM ir ekstraktas.
- AlPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 1,0 mM ir ekstraktas.
- ekstraktas.

Tamsinių kontrolių spektrai buvo išmatuoti iškart po pagaminimo, bei po 15 minučių palaikymo tamsoje. Visų pH tamsinės kontrolės buvo stabilios ir neturėjo jokių spektrinių pokyčių per 15 min.



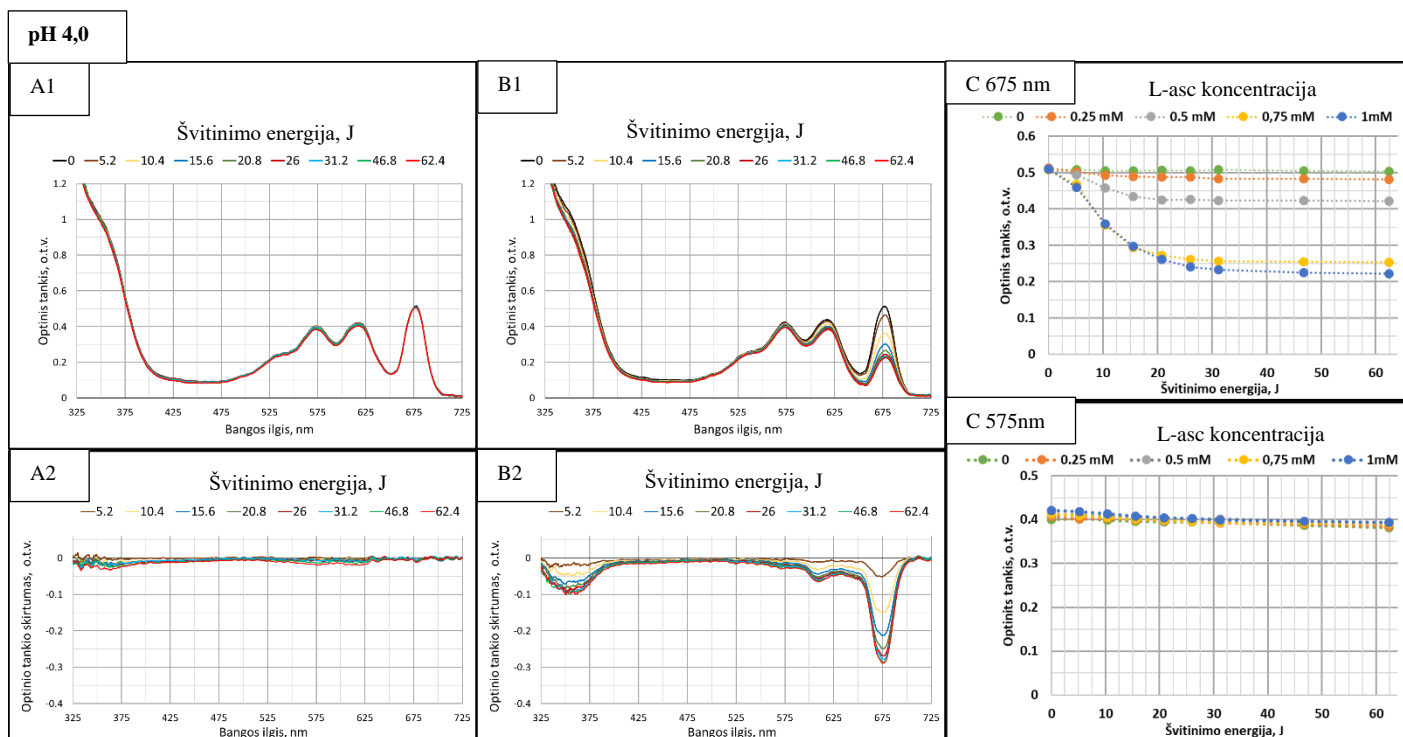
13 pav. Mėlynosios balnapupės ekstrakto spektrai skirtingo pH terpėse, visi spektrai turėjo tokį patį ekstrakto kiekį. 7 pH ties 625 nm optinis tankis lygus 0,5 o.t.v..

Švitinamų bandinių sudėtys:

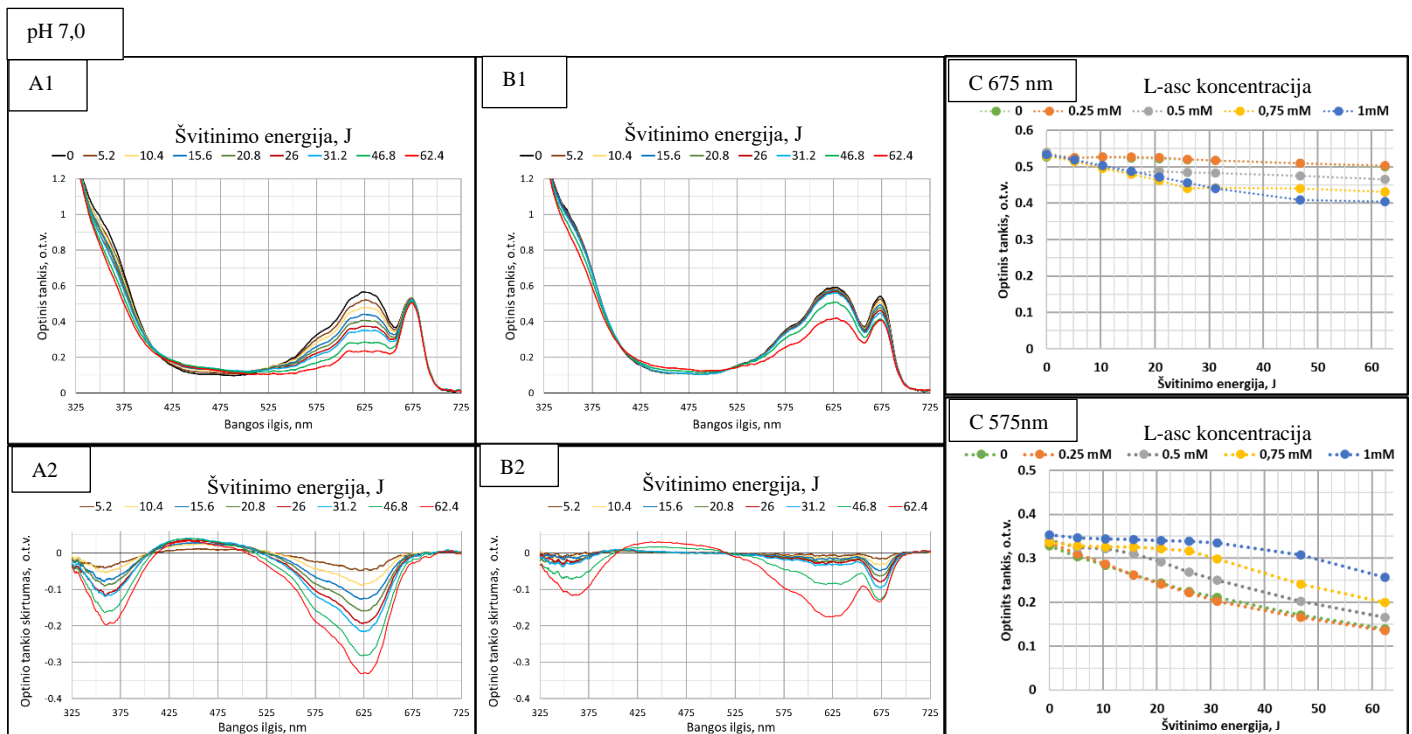
- ekstraktas.
- AIPcS₄ 3,2 μM ir ekstraktas.
- AIPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,25 mM ir ekstraktas.
- AIPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,5 mM ir ekstraktas.
- AIPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 0,75 mM ir ekstraktas.
- AIPcS₄ 3,2 μM ir L-asc 1,0 mM ir ekstraktas.

Švitinami bandiniai buvo švitinami 671 nm nuolatinės veikos lazeriu. Spinduliuotės intensyvumas lygus 130mW, apšviestas plotas lygus 0,33 cm². Kiekvienas bandinys švitinamas 6 kartus po 40 sekundžių ir po to 2 kartus po 2 minutes, Švitinimo energijos lygios 5,2, 10,4, 15,6, 20,8, 26, 31,2, 46,8, 62,4 J kiekvienam kartui atitinkamai. Toliau pateikiami švitintų bandinių spektriniai pokyčiai: terpių pH 4,0 paveikslėlyje 14 , pH 7,0 – 15 pav., pH 10,0 – 16 pav.

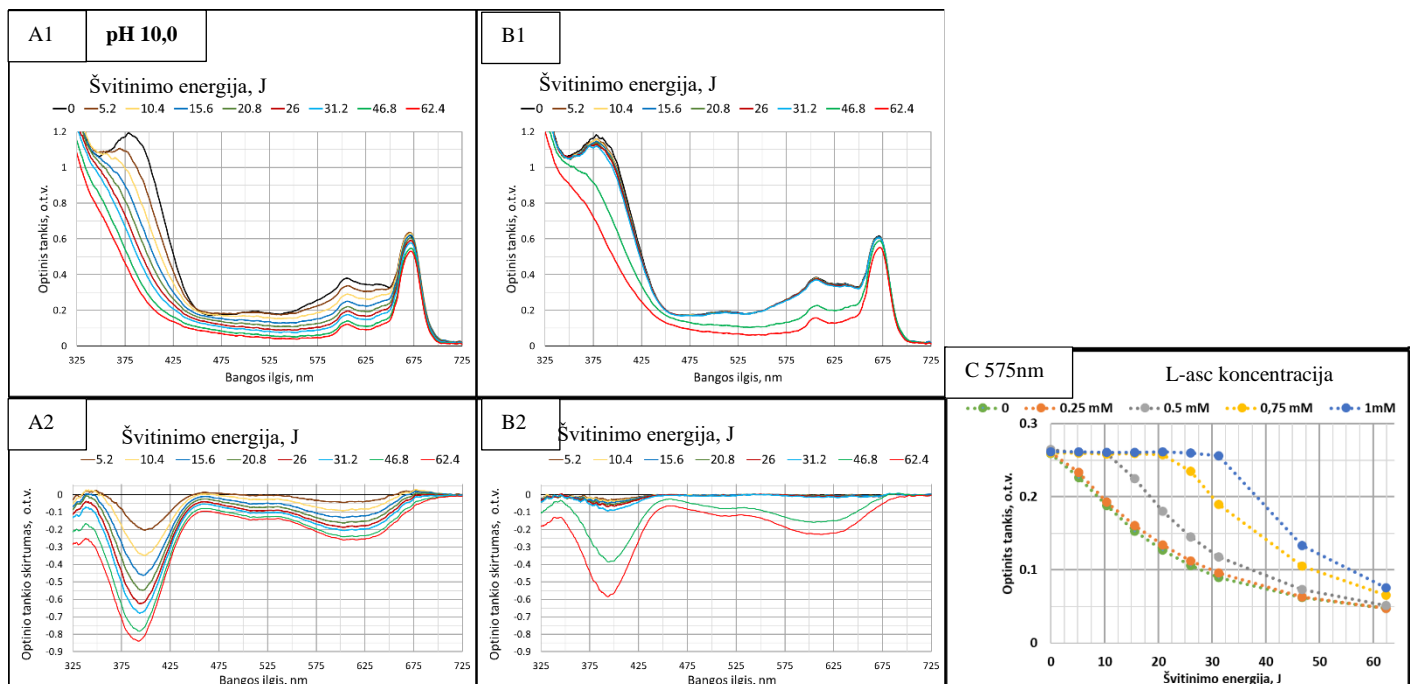
AIPcS₄ ir ekstrakto spektrai pH 7 persikloja, tačiau AIPcS₄ spektras dominuoja ≥ 670nm, o ekstrakto ≤580 nm. AIPcS₄ pokyčiams įvertinti naudotas 675 nm bangos ilgis, o ekstrakto pokyčiams 575nm bangos ilgis. L-asc spektras stipriai persikloja su ekstrakto spektru, optinis tankis 200-325nm srityje per didelis, kad būtų galima išmatuoti jį naudotu spektrometru, tad L-asc pokyčiai nebuvo nustatinėjami.



14 pav. švitintų AIPcS₄, L-asc ir mėlynosios balnapupės ekstrakto tirpalų pH 4,0 terpėje pokyčiai: A – AIPcS₄ 3,2μM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas, B - AIPcS₄ 3,2 μM, L-asc 1 mM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas. 1 – sugerties spektrai, 2 – skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas pradinis nešvitinto bandinio spektros). C – optinio tankio pokyčiai AIPcS₄, skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM ir mėlynosios balnapupės ekstrakto mišiniuose ties 675 ir 575nm.



15 pav. švitintų ALPcS₄, L-asc ir mėlynosios balnapupės ekstrakto tirpalų pH 7,0 terpėje pokyčiai: A – ALPcS₄ 3,2μM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas, B - ALPcS₄ 3,2 μM, L-asc 1 mM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas. 1 – sugerties spektrai, 2 – skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas pradinis nešvitinto bandinio spektras). C – optinio tankio pokyčiai ALPcS₄, skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM ir mėlynosios balnapupės ekstrakto mišiniuose ties 675 ir 575nm.



16 pav. švitintų ALPcS₄, L-asc ir mėlynosios balnapupės ekstrakto tirpalų pH 10,0 terpėje pokyčiai: A – ALPcS₄ 3,2μM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas, B - ALPcS₄ 3,2 μM, L-asc 1mM ir mėlynosios balnapupės ekstraktas. 1 – sugerties spektrai, 2 – skirtuminiai spektrai (iš kiekvieno švitinto bandinio spektro atimtas pradinis nešvitinto bandinio spektras). C – optinio tankio pokyčiai ALPcS₄, skirtingų L-asc koncentracijų: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM ir mėlynosios balnapupės ekstrakto mišiniuose ties 575 nm.

Nei AlPcS₄ nei ekstrakto spektrų formos nesikeitė maišant medžiagas tarpusavyje.

AlPcS₄ pokyčiai

AlPcS₄ spektro komponentė keitėsi panašiai kaip ir praeito skyrelio švitintuose AlPcS₄ ir L-asc tirpalų mišiniuose. L-asc koncentracija 0,25mM didelio efekto neturėjo. pH 4 ir pH 7 terpėse kai L-asc koncentracija didesnė arba lygi 0,5 mM AlPcS₄ bluko, o pH 10 AlPcS₄ beveik nesikeitė. Ekstraktas, žymiai nesumažino AlPcS₄ redukcijos sukeltos L-asc. Pastebėta, kai L-asc koncentracija lygi 1 mM, tik apie 4% mažiau AlPcS₄ sumžėjo, kai aplinkoje yra antocianinų. Antocianinai yra antioksidantai, jų negebėjimas apsaugoti AlPcS₄ toliau patvirtina, kad L-asc redukuoja AlPcS₄ chromoforą.

Šį kartą pH 10 AlPcS₄ sumažėjimas dėl L-asc nebuvo pastebėtas. Prieš dedant L-asc visada buvo dedamas ekstraktas, galimai ekstraktas apsaugojo AlPcS₄, blukimą tačiau įdėti L-asc prieš ekstraktą nebuvo pabandyta. Tačiau ekstrakto forma nepasikeitė įdėjus L-asc, kas reiškia, jog pH nepasikeitė dėl L-asc.

Antocianinų sugerties pokyčiai

Švitintų bandinių tik su ekstraktu spektrai buvo stabilūs visuose pH. Švitintas ekstraktas tik su AlPcS₄ buvo nestabilus pH 10 (16 pav. A) ir pH 7 (15 pav. A), t.y. antocianinų chromoforai buvo oksiduoti dėka sužadinto deguonies. pH 4 (14 pav. A) ekstrakto spektras beveik nesikeitė, antocianinai rūgštinėje terpėje – atsparūs oksidacijai.

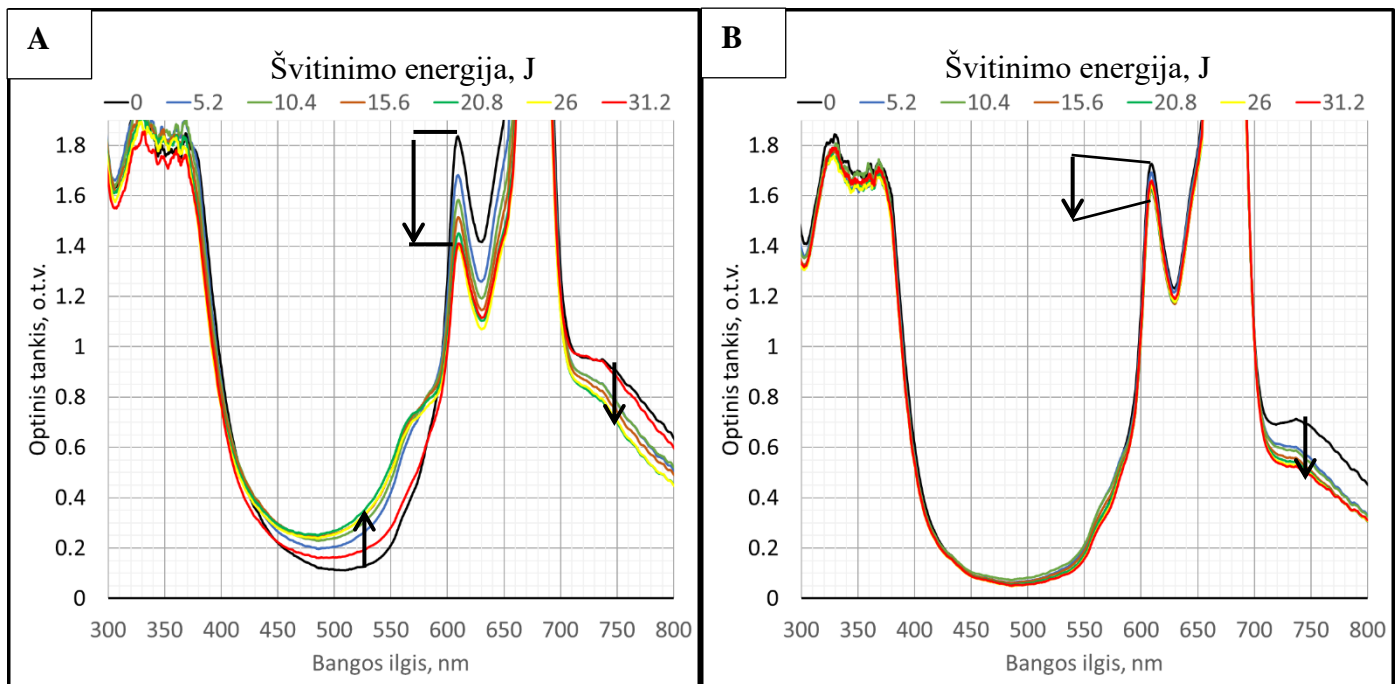
Švitintų bandinių su ekstraktu AlPcS₄ ir L-asc bandiniuose, antocianinai buvo labai stabilūs pH 4. pH 7 ir pH 10 ekstraktas buvo nestabilus, tačiau didinant L-asc koncentraciją, didėjo stabilumas. L-asc nemažino ekstrakto blukimo spartos, tačiau ją uždelsė, o uždelsimas proporcingas pradinei L-asc koncentracijai. Galima teigti, jog L-asc redukavo oksidavusius antocianinus. Panašiai kaip ir praeitame skyrelyje šis efektas buvo pastebėtas, tik kai L-asc koncentracija buvo $\geq 0,5$ mM

Kadangi antocianinai yra ganėtinai stabilūs pH 4, nepavyko aiškiai įvertinti L-asc antioksidacinės savybės antocianinams šiame pH.

3.3. Skirtingo rūgštingumo terpių įtaka AlPcS₄ ir Vit C mišinių EPR signalams.

Iš praėjusių rezultatų labiausiai netikėta buvo tai, jog švitinamas AlPcS₄ blunka, kai aplinkoje yra L-asc. Literatūroje minima, jog AlPcS₄ yra ganėtinai stabili medžiaga [13]. Kim H. ir kt. [32] save darbe rašo, jog švitinant AlPcS₄ ir L-asc tirpalą, kurio pH 6,8 nebuvo pastebėtas AlPcS₄ blukimas. Kim H. Et al. darbas naudojosi EPR spektrometrija, tad skyrėsi tyrimo metodika. Naudojo koncentracijas AlPcS₄ 0,1 mM, L-asc 10 mM, nenaudojo magnetinės maišyklės, bei naudojo kitokį apšvietimą.

Norėjau pasitikrinti ar skirtingas koncentracijų kiekis, ar magnetinė maišyklė, lėmė AlPcS₄ stabilumo skirtumą. Pirmiausia pasižiūrėjau ar AlPcS₄ 0,1mM, L-asc 10 mM mišinio (pH 4) spektras kinta jį švitinant (17 pav. A) ir maišant magnetine maišykle. Nors AlPcS₄ koncentracijos optinis tankis ties pagrindinėmis sugerties juostų smailėmis yra toks didelis, kad prietaisas negali jo išmatuoti, pokyčių ieškojau ties sugerties juostų „šlaitais“. Radau, jog tarp 400 ir 600 nm optinis tankis kilo, o sugerties juosta ties 606nm ir sugerties juostos „šlaitas“ ≥ 700 nm mažėjo. Tada pakartojau eksperimentą išjungus magnetinę maišyklę (17 pav. B). Radau jog AlPcS₄ buvo stabilesnis, tačiau sugerties juosta ties 606nm ir sugerties juostos „šlaitas“ ≥ 700 nm vis vien mažėjo. Šie rezultatai sudomino pasižiūrėti L-asc ir AlPcS₄ EPR spektrus. EPR matavimų tikslas – išsiaiškinti kas lemia AlPcS₄ stabilumą.



17 pav. Švitintų AlPcS₄ 0,1 mM, L-asc 10 mM mišinių (pH 4) spektrai, A – Naudojant magnetinę maišyklę. B – nenaudojant magnetinės maišyklės.

EPR bandinių sudėtys

EPR bandinius sudarė po 1 pH 4, pH 7 ir pH 10 terpei bandinį, kurio koncentracijos:

- AlPcS_4 0,10 mM, L-asc 10 mM.

Matavimui EPR bandinių koncentracijos buvo parinktos didesnės nei sugerties matavimuose dėl geresnės signalo kokybės. Kiekvienas bandinys tai 30 μl tūrio tirpalas patalpintas į kapiliarą taip kaip nurodyta metodikoje. Bandiniai matuoti tokia tvarka: tamsoje, švitinant 18.5 mW galios šviesa, 68.6mW, 131mW, vėl tamsoje. Kiekvieno matavimo vidurkinimas užtruko 5 minutes, tad kiekvienas švitinimas truko 5 min.

pH 4 rezultatai pavaizduoti 17 A paveikslėlyje, pH 7 – 18 B pav., pH 10 – 19 pav.

Bendros bandinių EPR spektrų savybės.

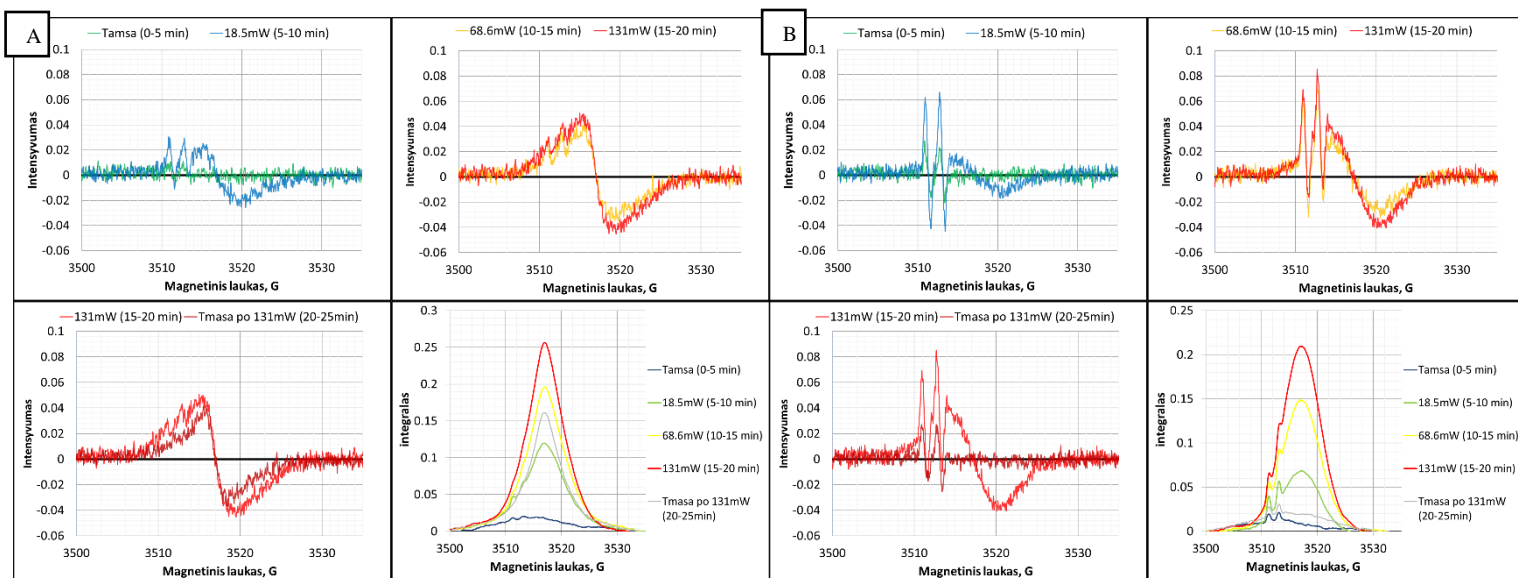
Visi bandiniai turėjo L-asc $^{\bullet-}$ signalą kurio g-faktorius lygus 2.0054 (3512G), Buettner G.R. ir Schafer F.Q. [19] rašo, jog šio radikalo $g=2.0052$. Švitinant atsirasdavo dar vienas signalas $g=2,0025$ (3517G). Švitinamų bandinių Spektrai panašūs į Gantchev T.G. ir kt. [33] ir Shopova M. ir kt. [34] darbuose pavaizduotus fotosensibilizatoriaus ir askorbo rūgšties mišinio EPR signalus. Gantchev T.G. ir kt. signalą, kurio $g=2.0022$ priskiria metalo ftalocianino radikalui $\text{MPC}^{\bullet-}$. Tad analogiškai šiame darbe tariama, jog signalas kurio $g=2,0025$ yra $\text{AlPcS}_4^{\bullet-}$ signalas.

pH 4 bandinio EPR signalo pokyčiai

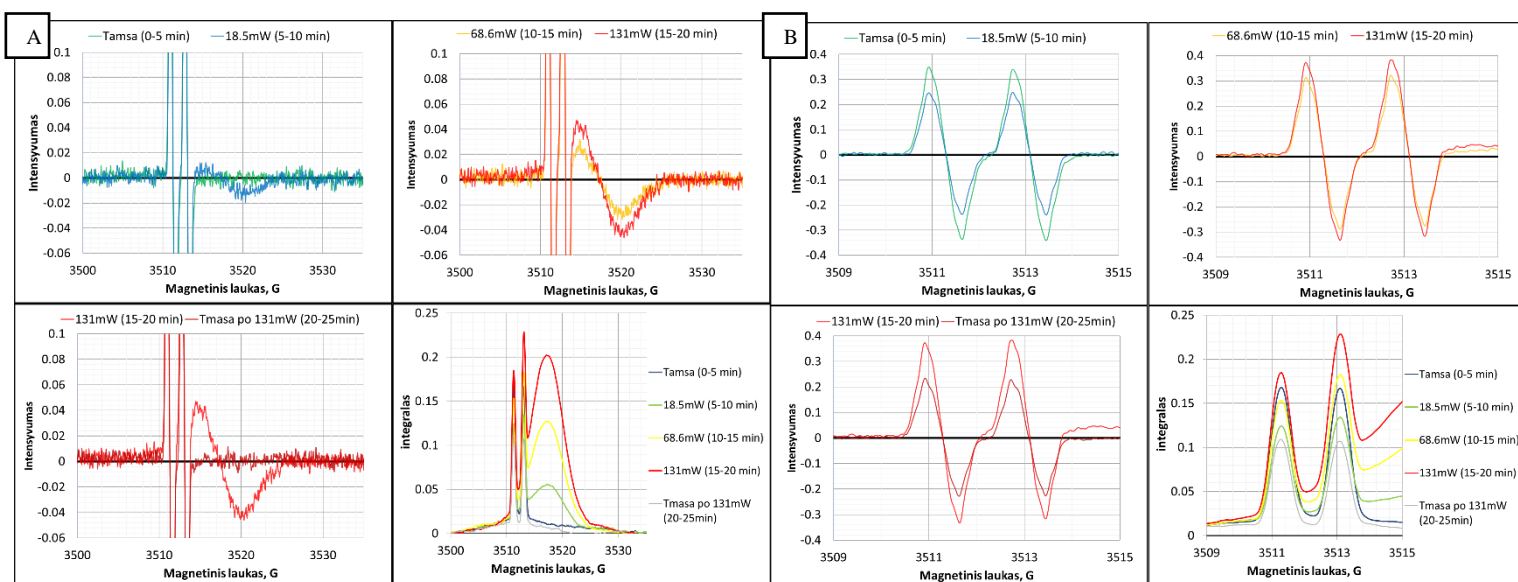
pH 4 bandinys tamsoje turėjo nežymų L-asc $^{\bullet-}$ signalą. Šis signalas didinant lazerio šviesos intensyvumą keitėsi, didžiausias buvo prie 18,5mW ir toliau mažėjo, pats mažėjimas galėjo būti lemtas dėl susinaudojimo. AlPcS_4 radikalo signalas atsirasdavo tik po švitinimo pradžios ir didėjo didinant intensyvumą. Išjungus švitinimą L-asc $^{\bullet-}$ signalas dingo tačiau AlPcS_4 radikalo signalas išliko.

pH 7 bandinio EPR signalo pokyčiai

pH 7 bandinys tamsoje turėjo apie 3-4 kartus didesnę L-asc $^{\bullet-}$ signalą nei pH 4. Šis signalas padidėjo įjungus švitinimą, o didinant lazerio šviesos intensyvumą buvo daugmaž pastovus (daugiau 20% nesikeitė). AlPcS_4 radikalo signalas atsirasdavo tik po švitinimo pradžios ir didėjo didinant intensyvumą. Išjungus švitinimą AlPcS_4 signalas dingo, o L-asc $^{\bullet-}$ signalas, liko toks pat kaip ir prieš švitinimą.



18 pav. EPR spektrai, A $AlPcS_4$ 0,10 mM, L-asc 10 mM, pH. A – pH 4,0, B – pH 7,0.



19 pav. EPR spektrai: $AlPcS_4$ 0,10 mM, L-asc 10 mM, pH 10,0. A – išryškintas $AlPcS_4$ radikalo signalas, B – išryškintas L-asc radikalo signalas.

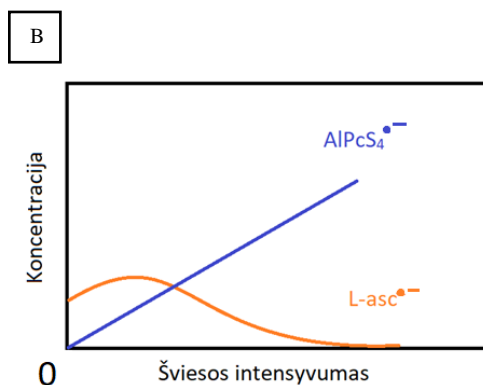
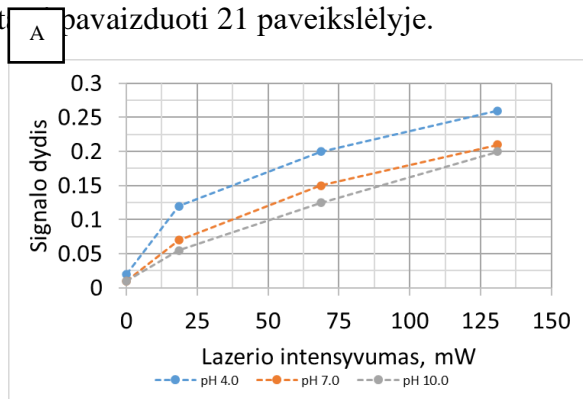
pH 10,0 bandinio EPR signalo pokyčiai

pH 10 bandinys tamsoje turėjo labai intensyvų L-asc^{•-} signalą, apie 20 kartų didesnę nei pH 7. Šis signalas sumažėjo įjungus švitinimą, o didinant lazerio šviesos intensyvumą - didėjo. AlPcS₄ radikalo signalas atsiradavo tik po švitinimo pradžios ir didėjo didinant intensyvumą. Išjungus švitinimą AlPcS₄ signalas dingo, o L-asc^{•-} signalas, liko sumažėjęs.

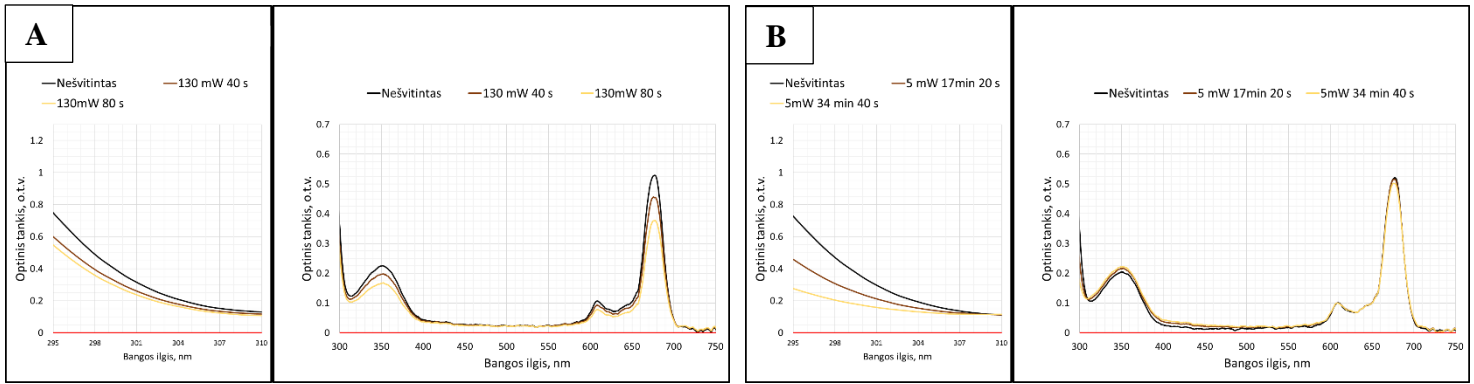
Rezultatų aptarimas

Pagrindiniai skirtumai tarp skirtingo pH terpių yra tai, jog skyrėsi L-asc^{•-} signalas: didžiausias prie pH 10 mažiausias – pH 4. Taipogi skyrėsi AlPcS₄ signalo intensyvumas esant švitinimui (20 A pav.) didžiausias prie pH 4, o mažiausias prie pH 10. Išjungus švitinimą AlPcS₄ signalas dingo pH 7 ir pH 10. Prisimenant praėjusio skyrelio rezultatus susidaro įspūdis, jog AlPcS₄ stabilumas susijęs su $\frac{L-asc^{\bullet-}}{AlPcS_4}$ santykiu.

Šiai minčiai patikrinti sugalvotas ir atliktas sugerties spektroskopijos eksperimentas: paimami du pH 4 AlPcS₄ 3,2μM ir L-asc 1,0mM tirpalai. Vienas jų pašvitinamas 130 mW šviesa 40 s du kartus (švitinimo energijos 5,2 J, 10,4 J), kitas 5mW šviesa 17min 20s du kartus (švitinimo energijos 5,2 J, 10,4 J). Abiems variantams apšviestas plotas lygus 0,33 cm². Šio eksperimento idėja pavaizduota 20 B paveiksle. Pagal EPR rezultatus, šio tūrio L-asc^{•-} radikalų koncentraciją jau egzistuoja tirpale, didinant intensyvumą ši koncentracija iš pradžių didėja, paskui mažėja. AlPcS₄ radikalo koncentracija atsiranda tik švitinant, tačiau didėja didinant intensyvumui. T.y. prie didelio intensyvumo L-asc^{•-} radikalų ir AlPcS₄ radikalų santykis yra mažas, o prie mažo intensyvumo L-asc^{•-} radikalų ir AlPcS₄ radikalų santykis bus didelis. Šio eksperimento rezultatai pavaizduoti 21 paveikslėlyje.



20 pav. A - AlPcS₄ radikalo signalo dydžio priklausomybė nuo lazerio intensyvumo, skirtingo pH terpėse. Bandinių sudėtis: AlPcS₄ 0,1 mM, L-asc 10 mM. B – numanoma radikalų koncentracijų priklausomybė nuo šviesos intensyvumo.



21 pav. Švitintų bandinių pokyčiai: pH 4,0 AIPcS₄ 3,2μM ir L-asc 1,0mM. A – švitinami bandinys su 130mW intensyvumu 40s du kartus, B – su 5mW intensyvumu 17min 20 s du kartus.

Gauta, jog nors abu bandiniai apšviesti tokia pačia šviesos energija, nubluko tik tas bandinys kuris buvo švitinamas 130 mW intensyvumu. AIPcS₄ chromoforas nebuvo pažeistas švitinant jį su 5 mW intensyvumu.

Galima iškelti hipotezę, kad AIPcS₄^{•-} reaguodamas su L-asc^{•-} oksiduojasi ir susidaro AIPcS₄ ir L-asc²⁻.

4. Išvados

Tiriant bandinius, kurių aliuminio ftalocianino tetrasulfonato koncentracija 3,2 μM ir terpių pH lygūs 4,0, 7,0 ir 10,0, pasinaudojant artimosios ultravioletinės ir regimosios elektromagnetinės spinduliuotės sugerties spektrometriją, nustatyta:

Švitinant bandinius su 671 nm lazeriu, dideliu intensyvumu (130 mW į 0,33cm² plotą):

- rūgščiose ir neutraliose terpėse, aliuminio ftalocianino tetrasulfonato chromoforas pažeidžiamas dėl L-askorbo rūgšties redukcijos, kai L-askorbo rūgšties koncentracija $\geq 0,5$ mM.
- šarminėje terpėje, aliuminio ftalocianino tetrasulfonato chromoforo pažeidimo inicijuotos deguonies oksidavimo yra redukuojamos L-askorbo rūgšties.
- visose terpėse, antocianinai neturėjo žymaus poveikio aliuminio ftalocianino tetrasulfonato chromoforo pažeidimams sukeltoms L-askorbo rūgšties.
- Neutraliose bei šarminėse terpėse, L-askorbo rūgštis redukavo oksiduotus antocianinus paveiktus aliuminio ftalocianino tetrasulfonato sukelta fotosensibilizacija, kai L-askorbo rūgšties koncentracija $\geq 0,5$ mM.
- rūgščioje terpėje, aliuminio ftalocianino tetrasulfonato sukelta fotosensibilizacija, nesukėlė aiškios antocianinų oksidacijos.

Švitinant rūgščios terpės bandinį 671 nm lazeriu mažu intensyvumu (5 mW į 0,33 cm² plotą):

- aliuminio ftalocianino tetrasulfonato chromoforas nebuvo pažeistas dėl L-askorbo rūgšties redukcijos, kai aplinkoje yra L-askorbo rūgšties 1 mM.

Naudojant elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometriją, nustatyta, jog apšviečiant bandinius, kurių aliuminio ftalocianino tetrasulfonato koncentracija 0,1 mM, askorbo rūgšties koncentracija 10 mM ir pH lygūs 4,0, 7,0 ir 10,0, su 671 nm lazeriu skirtingais intensyvumais, nustatyta:

- Aliuminio ftalocianino tetrasulfonato chromoforo pažeidimo siejasi su L-askorbo rūgšties radikalų bei pačio aliuminio ftalocianino tetrasulfonato radikalų santykiu, kuo šis santykis didesnis, tuo mažiau pažeidžiamas chromoforas.

Literatūros sąrašas

- 1 – Chen Q., Espey M.G., Krishna M.C., Mitchell J.B., Corpe C.P., Buettner G.R., Shacter E., Levine M. “Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102,38 (2005): 13604-9. doi:10.1073/pnas.0506390102
- 2 – Kramarenko G.G., Wilke W.W., Dayal D., Buettner G.R., Schafer F.Q.. Ascorbate enhances the toxicity of the photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(9):1615-1627. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.027
- 3 – Nancy L. Oleinick. BASIC PHOTSENSITIZATION. (<http://photobiology.info/Oleinick.html>)
- 4 – R. Rotomskis, S. Bagdonas, J. Valančiūnaitė, (2007) Fotosensibilizacija biologinėse sistemose, *Biofotonika*, Vilniaus universiteto leidykla, 149-156p. ISBN 978-9955-33-072-1
- 5 – Glaeser J, Nuss A.M., Berghoff B.A., Klug G. Singlet oxygen stress in microorganisms. *Adv Microb Physiol.* 2011;58:141-73. doi: 10.1016/B978-0-12-381043-4.00004-0. PMID: 21722793.
- 6 – Maria C. DeRosa, R. J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, Volumes 233–234, 2002, p. 351-371, ISSN 0010-8545, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- 7 – Khadem J., Martino M., Anatelli F., Dana M.R., Hamblin M.R.. Healing of perforating rat corneal incisions closed with photodynamic laser-activated tissue glue. *Lasers Surg Med.* 2004;35(4):304-311. doi:10.1002/lsm.20099
- 8 – Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1(4):279-293. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4
- 9 – Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(1):1-23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X
- 10 – Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(2):91-106. doi:10.1016/S1572-1000(05)00060-8
- 11 – Wöhrle, D., Hirth, A., Bogdahn-Rai, T. ir kt. Photodynamic therapy of cancer: Second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull* 47, 807–816 (1998). <https://doi.org/10.1007/BF02498146>
- 12 – Vrouwenraets M.B., Visser G.W., Stigter M., Oppelaar H., Snow G.B., van Dongen G.A.. Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1970-5. PMID: 11280754.
- 13 – Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1991 Jun;53(6):859-70. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb09900.x. PMID: 1886943

- 14 – P. Juzenas, A. Juzeniene, R. Rotomskis, J. Moan, Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 75, Issues 1–2, 2004, p. 107-110, ISSN 1011-1344, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.05.011>.
- 15 – Xin J., Wang S., Wang B., ir kt. AlPcS4-PDT for gastric cancer therapy using gold nanorod, cationic liposome, and Pluronic® F127 nanomicellar drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:2017-2036. Published 2018 Apr 4. doi:10.2147/IJN.S154054,
- 16 – Evangelio E., Poiroux G., Culerrier R., Pratviel G., Van Damme E.J., Peumans W.J., Barre A., Rougé P., Benoist H., Pitié M.. Comparative study of the phototoxicity of long-wavelength photosensitizers targeted by the MornigaG lectin. *Bioconjug Chem*. 2011 Jul 20;22(7):1337-44. doi: 10.1021/bc1005703. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21671658
- 17 – R. Bonnett, G. Martínez, Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, Volume 57, Issue 47, 2001, p. 9513-9547, ISSN 0040-4020, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00952-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00952-8)
- 18 – <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/> [paskitinį kart žiūrėta 2021-05-15]
- 19 – Buettner G.R.. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate. As an Invited Review, *Arch Biochem Biophys* 300:535-543.
- 20 – Roa F.J., Peña E., Gatica M., Escobar-Acuña K., Saavedra P., Maldonado M., Cuevas M.E., Moraga-Cid G., Rivas C.I., Muñoz-Montesino C. “Therapeutic Use of Vitamin C in Cancer: Physiological Considerations.” *Frontiers in pharmacology* vol. 11 211. 3 Mar. 2020, doi:10.3389/fphar.2020.00211
- 21 – Du J., Cullen J.J., Buettner G.R.. “Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer.” *Biochimica et biophysica acta* vol. 1826,2 (2012): 443-57. doi:10.1016/j.bbcan.2012.06.003
- 22 – Buettner G.R., Schafer F.Q. (2002) Ascorbate (Vitamin C), its Antioxidant Chemistry. *Virtual Free Radical School for Oxygen Society*
<https://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/publications/buettnerpubs/pdf/Buettner-Ascorbate-Chemistry-1.pdf> [paskitinį kart žiūrėta 2021-05-15]
- 23 – Hydrogen Peroxide
https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C28156 [paskitinį kart žiūrėta 2021-05-15]
- 24 – Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E., Marcelis L.F.M, Visser R.G.F., Bovy A. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Front Chem*. 2018 Mar 9;6:52. doi: 10.3389/fchem.2018.00052. PMID: 29594099; PMCID: PMC5855062.
- 25 – Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1361779. Published 2017 Aug 13. doi:10.1080/16546628.2017.1361779

- 26 – Yang L., Ling W., Du Z., Chen Y., Li D., Deng S., Liu Z., Yang L.. Effects of Anthocyanins on Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Nutr.* 2017 Sep 15;8(5):684-693. doi: 10.3945/an.116.014852. PMID: 28916569; PMCID: PMC5593100.
- 27 – Nagata T., Todoriki S., Masumizu T., Suda I., Furuta S., Du Z., Kikuchi S.. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem.* 2003 May 7;51(10):2992-9. doi: 10.1021/jf026179+. PMID: 12720382.
- 28 – Veridiana V., De Rosso, Adriana Z., Mercadante, The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola, *Food Chemistry*, Volume 103, Issue 3, 2007, p. 935-943, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.047>.
- 29 – M.H. Choi, G.H. Kim, H.S. Lee, Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage, *Food Research International*, Volume 35, Issue 8, 2002, p. 753-759, ISSN 0963-9969, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00071-6).
- 30 – Terahara N., Oda M., Matsui T., Osajima Y, Saito N., Toki K., Honda T.. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. *J Nat Prod.* 1996 Feb;59(2):139-44. doi: 10.1021/np960050a. PMID: 8991946
- 31 – Guthrie, J. P. Hydrolysis of esters of oxy acids: pKa values for strong acids *Can. J. Chem.* 1978, 56, 2342-2354. doi:10.1139/v78-385
- 32 – Kim H, Rosenthal I, Kirschenbaum L.J., Riesz P.. Photosensitized formation of ascorbate radicals by chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate: an electron spin resonance study. *Free Radic Biol Med.* 1992 Sep;13(3):231-8. doi: 10.1016/0891-5849(92)90019-d. PMID: 1324204
- 33 – Gantchev T.G., Sharman W.M., van Lier J.E.. Metallophthalocyanines photosensitize the breakdown of (hydro)peroxides in solution to yield hydroxyl or alkoxy and peroxy free radicals via different interaction pathways. *Photochem Photobiol.* 2003 May;77(5):469-79. doi: 10.1562/0031-8655(2003)077<0469:mptboh>2.0.co;2. PMID: 12812287.
- 34 - Shopova M., Gantchev T. Comparison of the photosensitizing efficiencies of haematoporphyrin (HP) and its derivative (HPD) with that of free-base tetrasulphophthalocyanine (TSPC-H2) in homogeneous and microheterogeneous media. *J Photochem Photobiol B.* 1990 Jun;6(1-2):49-59. doi: 10.1016/1011-1344(90)85073-6. PMID: 2146381

Santrauka

ASKORBATO POVEIKIO ALIUMINIO FTALOCIANINO TETRASULFONATI SUKELTIEMS OSKIDACINIAMS PROCESAMS SPEKTROSKOPINIAI TYRIMAI SKIRTINGO pH VANDENINĖSE MODELINĖSE TERPĖSE

Marius Šidla

Literatūroje rašoma, jog askorbo rūgštis turi antioksidacinių bei oksidacinių savybių. Taipogi rašoma, jog askorbo rūgštis gali pagerinti fotodinaminės terapijos efektyvumą [2].

Šio darbo tyrimo tikslas įvertinti L-askorbo rūgšties (L-asc) oksidacinių bei redukcinių savybių poveikį fotosensibilizatoriaus, Aliuminio ftalocianino tetrasulfonato (AlPcS₄), ir antocianinų stabilumui, skirtingo pH vandeninėse terpėse, vykstant fotosensibilizacijai.

Su artimosios ultravioletinės ir regimosios (UV-VIS) srities spektrometru tirti L-asc ir AlPcS₄ tirpalai siekiant išsiaiškinti kaip L-asc paveikia AlPcS₄ stabilumą vykstant fotosensibilizacijai. Taipogi tirti L-asc, AlPcS₄ ir mėlynosios balnapupės ekstrakto tirpalai, siekiant nustatyti ar L-asc apsaugo antocianinus nuo oksidacinių procesų sukeltų AlPcS₄ ir šviesos. Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrometru tirti švitinami L-asc ir AlPcS₄ tirpalai, siekta nustatyti kaip terpės pH paveikia AlPcS₄ ir L-asc radikalus.

Ištyrus UV-VIS spektrus, nustatyta, jog šviečiant intensyvia šviesa L-asc rūgštiniame bei neutraliame pH sukelia pažaidas AlPcS₄ chromoforui, (sukelia tikrąjį blukimą), o šarminiame pH L-asc redukuoja oksidavusį AlPcS₄. Šarminiame bei neutraliame pH L-asc redukuoja oksidavusius antocianinus, o antocianinai neturi žymios įtakos AlPcS₄ blukimui. Ištyrus EPR spektrus, pastebėta, jog AlPcS₄ stabilumas yra susijęs su L-asc radikalų ir AlPcS₄ radikalų santykiu. Kuo didesnis šis santykis tuo stabilesnis AlPcS₄.

Summary

SPECTROSCOPIC STUDIES OF THE EFFECT OF L-ASCORBATE ON OXIDATION PROCESSES INDUCED BY ALUMINIUM PHTHALOCYANINE TETRASULPHONATE IN AQUEOUS MODEL MEDIA OF DIFFERENT pH

Marius Šidla

It is reported in literature that ascorbic acid is an oxidant and antioxidant. There is information that ascorbic acid can enhance the effect of photodynamic therapy [2].

The aim of this work was to evaluate the effect of oxidative and reducing properties of L-ascorbic acid (L-asc) on the stability of photosensitizer, aluminum phthalocyanine tetrasulphonate (AlPcS₄), and anthocyanins at different pH in aqueous media during photosensitization.

L-asc and AlPcS₄ solutions were studied with near-ultraviolet and visible (UV-VIS) spectrometry to investigate how L-asc affects the stability of AlPcS₄ during photosensitization. Solutions of L-asc, AlPcS₄, and blue bean extract were also examined to determine whether L-asc protects anthocyanins from oxidative processes caused by AlPcS₄ and light. Irradiated L-asc and AlPcS₄ solutions were studied by electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry to determine how the pH of the medium affects AlPcS₄ and L-asc radicals.

Examination of the UV-VIS spectra showed that under intense light, L-asc at acidic and neutral pH causes damage to the AlPcS₄ chromophore (causes true bleaching), while at alkaline pH L-asc reduces oxidized AlPcS₄. At alkaline and neutral pH, L-asc reduces oxidized anthocyanins, and anthocyanins do not significantly affect AlPcS₄ bleaching. Examining the EPR spectra, it was observed that the stability of AlPcS₄ is related to the ratio of L-asc radicals to AlPcS₄ radicals. The higher this ratio, the more stable AlPcS₄.