

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Lazerinių tyrimų centras

Simonas Trumpaitis
HEMATOPORFIRINO BANDINIŲ FOTOSTABILUMO SPEKTROMETRINIAI TYRIMAI
MODELINĖSE VANDENINĖSE TERPĖSE
Bakalauro baigiamasis darbas

Moderniųjų technologijų fizikos ir vadybos
studijų programa

Studentas

Simonas Trumpaitis

Darbo vadovas

Prof. Saulius Bagdonas

Recenzentas

Doc. Arūnas Maršalka

Lesta ginti

2022-05-24

Centro direktorius

Prof. Aidas Matijošius

Vilnius 2022

Turinys	
Įvadas.....	3
1.Literatūros apžvalga	7
1.1 Porfirinai	7
1.2 Hematoporfirinas	8
1.3 Energijos pernašos procesai sensibilizatoriuje	9
1.4 Pirmo tipo fotosensibilizuojančios reakcijos	10
1.5 Antro tipo fotosensibilizuojančios reakcijos.....	11
1.6 Askorbo rūgštis	12
1.7 Askorbo rūgšties antioksidantinės ir prooksidantinės savybės	12
1.8 Reaktyvios deguonies formos	13
1.9 Porfirinų agregacija.....	14
1.10 Fotoblukimas ir fototransformacijos.....	15
2. Metodinė dalis	17
2.1 Sugerties spektrų matavimo įranga.....	17
2.2 Bandinių švitinimo schema.....	17
2.3 Naudojamų medžiagų koncentracijos	18
2.4 Bandinių paruošimas.....	18
2.4.1 Hematoporfirino bandiniai:	18
2.4.2 Hematoporfirino ir askorbo rūgšties bandiniai:	18
2.4.3 Hematoporfirino ir BSA bandiniai.....	19
2.4.4 Hematoporfirino, BSA ir askorbo rūgšties bandiniai.....	19
3. Rezultatai.....	20
4. Rezultatų aptarimas	28
4.1 Hematoporfirino bandiniai.....	28
4.2 Hematoporfirino ir jaučio serumo albumino bandiniai.....	28
4.3 Hematoporfirino ir askorbo rūgšties bandiniai	29
4.4 Hematoporfirino, jaučio serumo albumino ir askorbo rūgšties bandiniai.....	29
4.5 Susidariusių fotoproduktų aptarimas ir rekomendacijos	30
5. Išvados.....	32
Literatūros sąrašas	35

Ivadas

Jau nuo senų laikų šamanai ir kitokie senovės gydytojai pasitelkdavo saulės spinduliuojamą šviesą odos ar kitokio pobūdžio ligoms gydyti. Yra žinoma, kad į fototerapiją panašios procedūros buvo vykdomos jau senovės kinų, egiptiečių, ir indų civilizacijose. Vienas iš ankstyviausių literatūroje aprašytų atvejų, kuomet saulės šviesa buvo pasitelkta žmogaus savijautai pagerinti, yra helioterapija. Ši procedūra buvo taikoma Graikijoje prieš 3000 metų. Laikui bėgant, keičiantis civilizacijoms, žinios apie šviesos teikiamą naudą ir panaudojimą buvo prarastos, tačiau devyniolikto amžiaus pabaigos, dvidešimto amžiaus pradžios mokslininkams teko šias žinias iš naujo atrasti ir šį kartą į šviesos sąveikos mechanizmus su biologine sandara buvo įsigilinta daug įdėmiau [1].

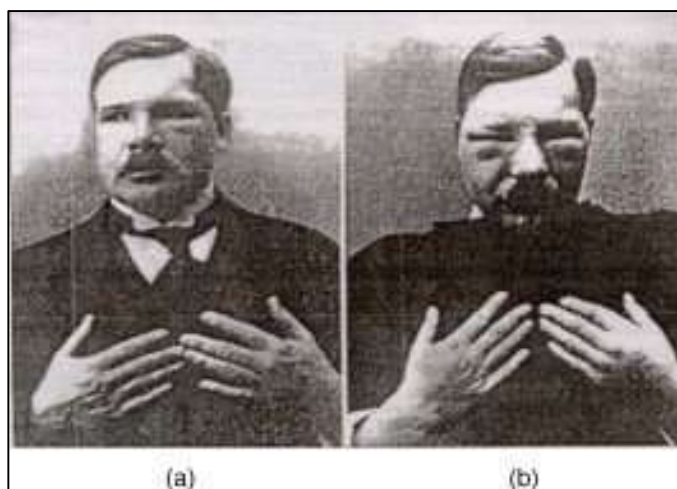
Dvidešimto amžiaus pradžioje Miuncheno medicinos studento Oscarą Rabo (Oscar Raab) atsitiktinai padarytas atradimas padėjo pamatus fotodinaminės navikų terapijos formavimuisi. Jis, atlikinėdamas mokslinius tyrimus, saulės šviesoje paliko mikroorganizmus, kurie buvo inkubuoti su specialiais dažais. Praėjus tam tikram laikui tarpui Oscaras Rabas pastebėjo, jog saulės šviesos paveikti mikroorganizmai buvo nebegyvi [1, 2]. Tuo momentu dar nebuvo aišku, kodėl tai įvyko, vėliau buvo išsiaiškinta, kad šiuos mikroorganizmus nužudė fotosensibilizuojančių reakcijų pagamintos citotoksiškos medžiagos, kurios susidarė dažams absorbavus šviesą. Dažai, absorbavę šviesos energiją, perdavė savo perteklinę sužadino energiją aplinkai, ir taip sugeneravo toksiškas medžiagas, kurios nužudė mikroorganizmus. Pagrindinis fotodinaminės navikų terapijos principas yra pasitelkti medžiagą (fotosensibilizatorių), sugebančią sugerti šviesos energiją ir perduoti savo perteklinę energiją aplinkai, ir taip sugeneruoti toksiškas medžiagas, kurios yra pasitelkiamos vėžio ląstelių naikinimui [3].

Yra išskiriami du tipai fotosensibilizuojančių reakcijų. Pirmo tipo reakcijos yra tos, kuriose sensibilizatorius reaguoja su molekule ar su ląstelės membrana atiduodamas arba atplėšdamas protoną arba elektroną ir taip sukurdamas laisvąjį radikalą – nepastovų, agresyvų elementą, bandantį prisijungti elektroną iš aplinkinių medžiagų. Šie sugeneruoti radikalai sąveikauja su aplinkoje esančiu deguonimi, sukurdami dar kitokias agresyvias deguonies formas. Antrasis reakcijų tipas vyksta tuomet, kai sensibilizatorius reaguoja tiesiogiai su aplinkiniu deguonimi, taip sukurdamas singuletinį deguonį - labai agresyvią deguonies atmainą [4]. Abiejų tipų reakcijos vyksta tuo pačiu metu, skirtingų tipų reakcijų dažnumo santykį lemia naudojamas sensibilizatorius, substrato koncentracija, aplinkoje esančio deguonies koncentracija ir sąveika tarp substrato ir fotosensibilizatoriaus molekulių. Abiejų tipų reakcijų efektyvumas labai priklauso nuo aplinkoje esančio deguonies kiekio

[5, 6]. Taigi fotosensibilizatorius, perduodamas savo perteklinę energiją, gali reaguoti arba tiesiogiai su deguonimi, arba per aplinką. Jei yra reaguojama per aplinką, sugeneruojami laisvieji radikalai, kurie sukelia molekulių oksidacines pažaidas. Jei reaguojama tiesiogiai su deguonimi, sukuriamą agresyvi deguonies forma - singuletinis deguonis, kuris taip pat sugeba pažeisti ląsteles [7].

Darbe tiriamas fotosensibilizatorius yra hematoporfirinas, tai yra vienas iš pirmųjų atsiradusių fotosensibilizatorių. Hematoporfirinas pirmą kartą buvo gautas 1841 m., kuomet Schereris (Scherer) išdžiūvusį kraują apdorojo sieros rūgštimi ir alkoholiu. Taip iš hemo buvo pašalinta geležis ir įrodyta, jog geležis nėra būtinas mineralas raudonai kraujo spalvai palaikyti [1]. Taip pat hematoporfirinas yra pagrindinė pirmojo fotosensibilizatorius, hematoporfirino darinio, sudedamoji dalis. Iš pradžių buvo galvota, kad tai yra grynas hematoporfirinas, tačiau atlikus tikslesnius tyrimus, paaiškėjo, jog tai buvo įvairių porfirinų mišinys [1, 8].

Vieną iš įdomesnių bandymų, susijusių su hematoporfirinu, atliko F. Meyer-Betzas (Meyer – Betz). Jis, norėdamas pademonstruoti porfirinų kaip sensibilizatorių efektyvų veikimą žmogaus organizme, pats sau susileido 200 mg hematoporfirino [1, 9]. Po kelių minučių kūno vietos, kurios buvo paveiktos šviesos spindulių, labai smarkiai ištinę ir sukėlė rimtą skausmą. Žemiau yra pavaizduota F. Meyer-Betzo išvaizda prieš hematoporfirino susileidimą ir po susileidimo (1 pav.).



1 pav. Kairėje, F. Meyer -Betz prieš eksperimentą, dešinėje, po injekcijos ir pabuvimo šviesoje, adaptuota iš [9].

Aplinkoje, kurioje nėra pakankamo kiekio deguonies, fotodinaminė navikų terapija vyks neefektyviai. Tai yra ypatingai aktualu, kai ties vėžiniais audiniais susidaro hipoksinės sritys. Šiose srityse radikalų ir reaktyvių deguonies formų generacija vyksta labai silpnai arba išviso nevyksta [10]. Kad padidėtų radikalų kiekis aplinkoje, būtų galima panaudoti fotosensibilizatorių kartu su askorbo rūgštimi. Nors askorbo rūgštis yra antioksidantas, tačiau būdama bedeguoninėje aplinkoje, turinčioje katalizuojančių metalų, generuoja vandenilio peroksidą ir radikalus, kitaip sakant, veikia kaip prooksidantas [11]. Taip pat askorbo rūgštis padėtų išspręsti sveikų audinių

apsaugos problemą. Askorbo rūgštis, fotosensibilizatoriui patekus į sveikus audinius, suveiktų kaip antioksidantas ir nukenksmintų susidariusias agresyvias ir toksiškas deguonies formas. Askorbo rūgšties prooksidacinės reakcijos efektyviai gali vykti tik tais rūgštinėse terpėse, o rūgštinė terpė yra navikų audiniui būdinga terpė. Šarminėje terpėje, sveikam žmogaus audiniui būdingoje terpėje, prooksidacinės reakcijos vyksta neefektyviai arba išviso nevykta [11, 12]. Šiame darbe nuostoviosios sugerties spektroskopijos metodu buvo tiriama, kaip keičiasi hematoporfirino ir askorbo rūgšties bandinių spektrinės savybės skirtingose terpėse, švitinant juos mažos galios žalios šviesos lazeriu.

Darbo tikslas:

Nuostoviosios sugerties spektroskopijos metodu ištirti askorbo rūgšties įtaką hematoporfirino fotocheminių virsmų mechanizmams modelinėse vandeninėse skirtingos pH vertės terpėse.

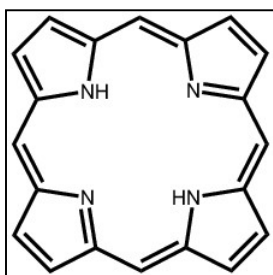
Uždaviniai:

1. Ištirti hematoporfirino fotovirsmus vandeninėse skirtingos pH vertės terpėse.
2. Ištirti jaučio serumo albumino poveikį hematoporfirino fotovirsmams skirtingose modelinėse terpėse.
3. Ištirti askorbo rūgšties poveikį hematoporfirino fotovirsmams skirtingose modelinėse terpėse.
4. Ištirti askorbo rūgšties poveikį hematoporfirino ir jaučio serumo albumino mišinio fotovirsmams vandeninėse modelinėse terpėse.

1.Literatūros apžvalga

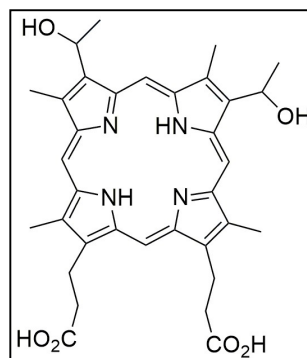
1.1 Porfirinai

Porfirinai - tai gamtoje randami pigmentai, kurie yra labai svarbūs aerobiniams organizmams. Šie pigmentai dalyvauja procesuose susijusiuose su deguonies gamyba, deguonies pernešimu ir deguonies naudojimu [13]. Porfirinų struktūrinį pagrindą sudaro porfinas, tetrapirolas sudarytas iš keturių pirolo žiedų, kurie vienas su kitu yra sujungti metino tilteliais (2 pav.). Porfirinai gaunami, porfino pirolo žieduose arba metino tilteliuose esančius vandenilio atomus pakeičiant skirtingomis atomų kombinacijomis (3 pav.). Didžiulis galimas kombinacijų skaičius lemia labai didelę porfirinų įvairovę. Priklausomai nuo vandenilio atomų pakaitalų, priklauso porfirino bazinės ir rūgštinės savybės [14].



2 pav. Porfino struktūra.

Šaltinis: <https://en.wikipedia.org/wiki/Porphine>



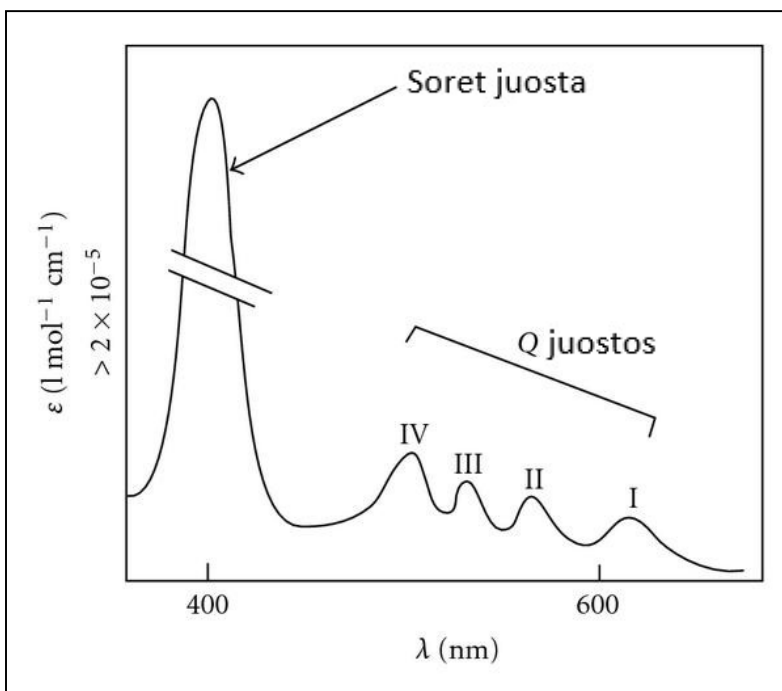
3 pav. Hematoporfirino struktūra.

Šaltinis: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hematoporphyrin>

Porfirinai sudaro unikalią struktūrinę junginių klasę, kuri gamtoje atlieka daugelį svarbiausių vaidmenų. Porfirinai dalyvauja nuo deguonies pernešimo ir elektronų perdavimo procesų iki fotosintezės, taip pat porfirinai ir jų dariniai yra naudojami saulės energijos gamyboje ar svarbių cheminių reakcijų katalizavime. Pramoniniu požiūriu, jie yra vieni svarbiausių cheminių medžiagų, kurios pritaikomos daugelyje pramonės šakų. Jie panaudojami kaip oksidacijos katalizatoriai, vėžio gydymo priemonės ir kaip dirbtinės fotosintezės tarpininkai. Taip pat jie yra pritaikomi jutikliuose, netiesiniuose optiniuose prietaisuose ir nanomedžiagose [14, 15].

Porfirinų sugerties spektrus galima suskirstyti į tris sritis. Pirmajai sričiai priskiriamos M, N ir L sugerties juostos, šios juostos yra ultravioletinėje srityje 200nm-350nm bangos ilgių ruože. Antrajai sričiai priskiriama Soret sugerties juosta, kitaip dar vadinama B juosta, ši juosta yra išsidėsčiusi 350nm – 450nm bangos ilgių ruože, Soret sugerties juosta atspindi molekulės intensyvų

elektroninį šuolį iš pagrindinio būsenos lygmens S_0 į sužadintą lygmenį S_2 . Trečiajai sričiai priskiriamos Q juostos, šios juostos yra išsidėsčiusios 500nm -750nm bangos ilgių ruože (4 pav.). Q juostos atspindi molekulių būsenos šuolius iš pagrindinio būsenos lygmens S_0 į sužadintą S_1 lygmenį. Juostų intensyvumas priklauso nuo porfino prisijungtų grupių, kitaip sakant nuo porfirino tipo [16, 17].



4 pav. Tipinio porfirino spektrinių juostų išsidėstymas spektre, adaptuota iš [18].

1.2 Hematoporfirinas

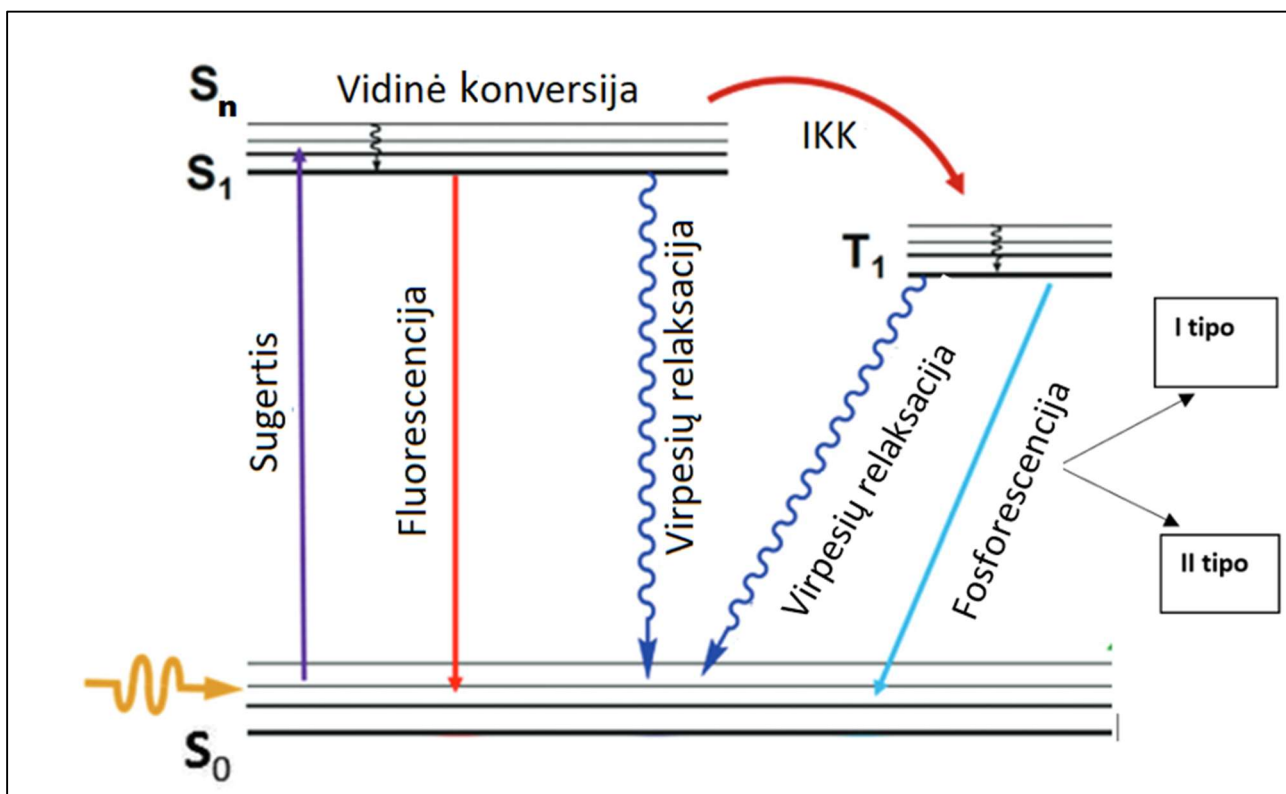
Hematoporfirinas (Hp), tai bemetalis hemo junginys, turintis 4 metilo grupes, 2 hidroksietilo grupes ir 2 propano rūgšties grupes (3 Pav.). Tai yra pirmos kartos fotosensibilizatorius, jo cheminė formulė yra $C_{34}H_{38}N_4O_6$, o molinė masė yra 598 g/mol [19]. Hematoporfirino spektrinės juostos yra išsidėsčiusios kaip tipinio porfirino [20].

Hematoporfirinas yra pirmosios kartos sensibilizatorius, tačiau tai nėra pats pirmasis fotosensibilizatorius. Pats pirmasis fotosensibilizatorius buvo hematoporfirino darinys (HpD), kuris pradėtas naudoti fotodinaminėje terapijoje dėl savo gebėjimo kauptis ligos pažeistuose audiniuose. Iš pradžių buvo galvota, jog tai yra grynas hematoporfirinas, tačiau išsamiau ištyrus paaiškėjo, jog tai yra skirtingų, neišgrynintų porfirinų mišinys [1]. Hematoporfirino darinys geriau kaupiasi audiniuose negu grynas hematoporfirinas, tačiau tai yra įvairių porfirinų mišinys, kuriuo tirti fotocheminius ir fotobiologinius fotovirsmų mechanizmus būtų labai sudėtinga [21].

1.3 Energijos pernašos procesai sensibilizatoriuje

Fotodinaminės navikų terapijos principai pagrįsti tuo, kad fotosensibilizatoriaus molekulės yra sužadinamos šviesos spindulių ir, norėdamos sugrįžti į pagrindinę būseną, perduoda sužadinimo energiją aplinkai [3]. Priklausomai nuo fotoreakcijos tipo, yra sugeneruojami arba laisvieji radikalai, arba singuletinis deguonis. Tuomet yra inicijuojami įvairūs fotobiologiniai ir fotocheminiai procesai, kurie gali pažeisti ar visiškai sunaikinti organizmo ląsteles [3, 7].

Vienas iš svarbiausių fotosensibilizatoriaus efektyvumą įvertinančių kriterijų yra sensibilizatoriaus tripletinės būsenos generavimo našumas. Sugėrus fotoną fotosensibilizatoriaus molekulė pereina iš pagrindinės būsenos į singuletinę. Singuletinės būsenos gyvavimo trukmė yra labai trumpa, todėl tikimybė, kad įvyks su fotosensibilizacija susiję fotobiologiniai ar fotocheminiai procesai, yra arti nulio [22]. Iš singuletinės būsenos molekulė turi du kelius, arba grįžti į pagrindinę būseną, arba pereiti į tripletinę būseną. Tripletinėje būsenoje, lyginant su singulete, fotosensibilizatoriaus molekulė išsilaiko gerokai ilgiau, todėl šioje būsenoje gali efektyviai perduoti energiją aplinkinėms molekulėms. Detalesni energijos pernašos vyksmai pavaizduoti Jablonskio diagramoje (5 pav.).



5 pav. Jablonskio diagrama, adaptuota iš [23].

Jablonskio diagramoje vaizduojama, kokie energijos pernašos procesai vyksta sužadintame fotosensibilizatoriuje. Iš pradžių sensibilizatoriaus molekulė būna nesužadintoje S_0 būsenoje, tačiau, absorbavusi tam tikro bangos ilgio fotoną, molekulė pereina į vieną iš sužadintų singuletinių būsenų S_n . Šios būsenos yra nestabilios, todėl sensibilizatoriaus molekulės šiose būsenose išsilaiko tik nuo 0,1ns iki 1ns. Sensibilizatoriaus molekulė iš S_1 būsenos grįžti į pagrindinę būseną turi kelis būdus. Pirmasis būdas yra, kuomet molekulė atlieka fluorescenciją - išspinduliuoja fluorescencijos fotoną ir taip grįžta į S_0 būseną. Antrasis būdas yra, kuomet molekulė šilumos energijos pavidalu atiduoda energiją aplinkai ir sugrįžta į pagrindinę būseną, taip įvykdydama vidinę konversiją. Trečias būdas yra, kuomet molekulė pereina iš singuletinės S_1 būsenos į tripletinę T_1 būseną, tuomet įvyksta interkombinacinė konversija. Tripletinėje būsenoje fotosensibilizatoriaus molekulė gali išsilaikyti nuo 10μs iki 1000μs, žymiai ilgiau negu singuletinėje. Iš tripletinės būsenos grįžti į pagrindinę molekulė gali atiduodamas energiją aplinkai šilumos pavidalu – vidinės konversijos būdu, arba gali įvykdydama fosforescenciją, išspinduliuodama fosforescencijos fotoną [23, 24].

Priklausomai nuo sužadinto sensibilizatoriaus sąveikos pobūdžio su deguonimi skiriasi fotosensibilizuojančių reakcijų tipai. Kuomet yra sąveikaujama netiesiogiai su deguonimi, tuomet sensibilizatorius sąveikauja su savo aplinka, o paskui sensibilizatoriaus aplinka sąveikauja jau su deguonies molekulėmis generuodama laisvuosius radikalus. Tai yra pirmojo tipo reakcijos. Kuomet yra tiesiogiai sąveikaujama su deguonies molekulėmis ir sugeneruojamas singuletinis deguonis, tuomet įvyksta antrojo tipo reakcijos [3, 7].

1.4 Pirmo tipo fotosensibilizuojančios reakcijos

Pirmojo tipo reakcijose sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės sąveikauja su organizmo terpės (substrato) molekulėmis, šių reakcijų metu yra atplėšiamas arba atiduodamas elektronas arba vandenilio atomas ir taip sugeneruojamieji laisvieji radikalai. Šie laisvieji radikalai sąveikauja su aplinkoje esančiomis deguonies molekulėmis, ko pasėkoje sugeneruojamos reaktyvios deguonies formos (ROS). Svarbiausios reaktyvios molekulės, kurios yra sugeneruojamos vykstant pirmojo tipo fotosensibilizuojančioms reakcijoms, yra hidroksilo radikalas ($\text{OH}\cdot$), vandenilio peroksidas (H_2O_2) ir superoksianijono radikalas ($\cdot\text{O}_2^-$) [7, 25, 26].

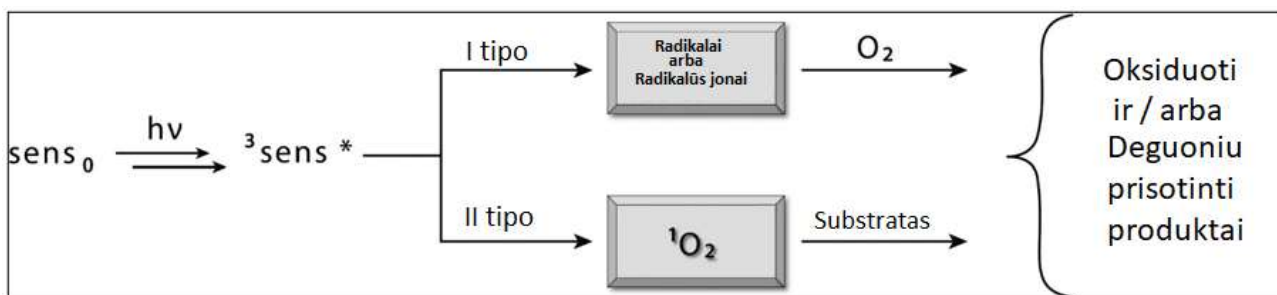
Fotodinaminės navikų terapijos efektyviam veikimui reikalingi trys komponentai. Pirmiausia reikalingas šviesos šaltinis, kuris spinduliuotų tam tikro bangos ilgio šviesos pluoštą, kurį sugėręs sensibilizatorius pereitų į sužadintą būseną. Antrasis komponentas yra pats

fotosensibilizatorius. Fotosensibilizatorius turi pasižymėti geru kaupimusi ligos pažeistuose audiniuose ir gerai perduoti aplinkai savo perteklinę sužadinimo energiją. Renkantis tinkamą sensibilizatorių atsižvelgiama į sensibilizatoriaus homogeniškumą, toksiškumą, kaupimąsi navikiniame audinyje, į tripletinės būsenos kvantinį generavimo našumą bei gyvavimo trukmę. Trečiasis komponentas yra deguonies kiekis aplinkoje [5, 6, 20]. Nors pirmo tipo fotocheminėse reakcijose deguonis tiesiogiai nedalyvauja, tačiau sugeneruotų laisvųjų radikalų ir deguonies molekulių sąveikos sukurtos citotoksiškos reaktyvios deguonies atmainos yra pagrindinis ginklas kovojant prieš vėžines ląsteles [4, 7].

1.5 Antro tipo fotosensibilizuojančios reakcijos

Antrojo tipo fotosensibilizuojančių reakcijų pagrindinis skirtumas nuo pirmojo tipo reakcijų yra tiesioginis fotosensibilizatoriaus ir deguonies molekulių sąveikavimas. Sensibilizatoriaus molekulės, tik tais esančios tripletinėje būsenoje, gali vykdyti energijos mainus su deguonies molekulėmis. Apskritai, energijos pernaša tarp deguonies molekulių ir singuletinės būsenos sensibilizatorių molekulių yra negalima, nes deguonies molekulės įprastai yra tripletinės būsenos, o energijų mainai tarp skirtingų molekulių būsenų yra negalimi. Tik tais abejoms medžiagoms esant tripletinės būsenos, gali vykti efektyvūs energijos mainai, kurių pasėkoje yra sugeneruojamas singuletinis deguonis [7, 27].

Singuletinis deguonis yra žemiausia deguonies molekulės sužadintoji būsena. Tai nėra laisvasis radikalas, tačiau jis gali susidaryti kai kurių laisvųjų radikalų reakcijų metu ir gali paskatinti kitų laisvųjų radikalų susidarymą. Singuletinis deguonis yra agresyvi oksiduojanti deguonies forma, kuri naikina biologines ląsteles, sukeldama joms apoptozę ar net nekrozę. Antrojo tipo fotosensibilizuojančių reakcijų efektyvumą apibūdina singuletinio deguonies generavimo našumas, jis yra tarytum indikatorius, kuris parodo reakcijų biocheminio mechanizmo veikimo efektyvumą [27, 28].



6 pav. Fotosensibilizuojančių reakcijų ir tipų schema, adaptuota iš [26].

1.6 Askorbo rūgštis

Askorbo rūgštis, kitaip dar vadinama vitaminu C, yra natūralus vandenyje tirpstantis vitaminas, kuris pasižymi tiek ir redukuojančiomis, tiek ir antioksidantinėmis savybėmis. Ši rūgštis veiksmingai kovoja su bakterinėmis infekcijomis, dalyvauja detoksikuojančiose reakcijose ir padeda sintezuoti baltymus kolagenus, atsakingus už žmogaus sąnarių ir odos elastingumą organizme [29].

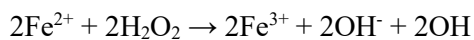
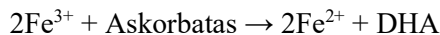
Kolagenai sudaro tris ketvirtadalius odos ir trečdalį kūno baltymų. Su amžiumi kolagenai pradeda irti, o žmogaus organizmas pats negali pasigaminti ir kaupti vitamino C, todėl yra būtina jo gauti kartu su maistu. Rekomenduojamas suvartoti vitamino C kiekis per parą moterims yra 70mg, o vyrams 90mg. Esant vitamino C trūkumui, sutrinka kolageno sintezė, dėl to gali pasireikšti skorbuto ligai būdingi požymiai [29].

Vitaminas C yra plačiai žinomas dėl savo antioksidacinio poveikio, nors tai yra tik vienas iš daugelio kartu su maistu gaunamų antioksidantų [30]. XX a. septintajame dešimtmetyje Ewanas Cameronas (Ewan Cameron) ir Linusas Paulingas (Linus Pauling) iškėlė prielaidą, jog vartojimas vitamino C kaip papildu turi gydomąjį poveikį žmogaus organizmui kovojant su navikais. Jų tyrimo rezultatai patvirtino šią hipotezę. Tyrime dalyvavusių pacientų gyvenimo trukmė vidutiniškai pailgėjo 300 dienų, tačiau mokslininkų bendruomenės šie tyrimai neįtikino. Kitų mokslininkų tyrimai davė dviprasmiškus rezultatus. Vieni tyrimai parodė ilgesnį išgyvenamumą, geresnę savijautą bei sumažėjusį skausmą, tačiau kiti tyrimai neparodė panašaus rezultato. Vitamino C kaip papildu veiksmingumas vis dar kelia daug klausimų, tačiau nors ir nedidelis I fazės klinikinių tyrimų skaičius patvirtina, kad gydymas nėra toksiškas ir gali pagerinti gyvenimo kokybę, tačiau nerodo aiškaus priešvėžinio poveikio [31].

1.7 Askorbo rūgšties antioksidantinės ir prooksidantinės savybės

Askorbo rūgštis yra reduktorius ir stiprus antioksidantas sugebantis nukenksminti reaktyvias deguonies ir azoto formas, kurios pažeidžia nukleorūgštis ir skatina piktybinių ląstelių susidarymą. Askorbatas reaguodamas su ROS, paverčia jas į mažai aktyvų hidroaskorbato radikalą, taip sumažindamas galimas ląstelių pažeidas ir organizmo patiriamą oksidacinį stresą. Askorbatas veiksmingai in vivo (gyvame organizme) mažina sveikas ląsteles virsti vėžinėmis skatinančius protoonkogenus ir navikų augimą skatinančius genus.

Askorbo rūgštis gali pasižymėti ne tik antioksidacinėmis savybėmis, bet ir, tam tikromis sąlygomis, prooksidaciniu aktyvumu. Askorbatas suveikia kaip prooksidantas, kuomet aplinkoje yra katalitinių metalų, tokių kaip Fe^{3+} ir Cu^{2+} . Šių reakcijų metu susiformuoja laisvieji radikalai, pavyzdžiui hidroksilo radikalas. Šios reakcijos vadinamos Fentono reakcijomis [30].



Šie susidarę hidroksilo radikalai sąveikauja su DNR, sukeldami jos pažeidimus, nutraukdami fosfodiesterinius ryšius ir modifikuodami DNR bazines. Taip pat askorbatas gali sureaguoti su singuletinu deguonimi ir sugeneruoti vandenilio peroksidą (H_2O_2), o šis naikina vėžines ląsteles ir dalyvauja Fentono reakcijose, inicijuodamas hidroksilo radikalų generavimą [30, 32].

Askorbo rūgšties poveikis labai priklauso nuo jos turimos koncentracijos. Naudojant pernelyg mažą askorbo rūgšties koncentraciją, antioksidacinis poveikis gali nepasireikšti. Naudojant labai didelę koncentraciją, atsiranda galimybė reakcijoms su singuletinu deguonimi, kurių pasėkoje, pradedama vandenilio peroksido generacija, o vandenilio peroksidui dalyvaujant Fentono reakcijose sugeneruojami labai agresyvūs hidroksilo radikalai [30, 32].

1.8 Reaktyvios deguonies formos

Superoksianijono radikalas ($\cdot\text{O}_2^-$) yra vienas iš pirmųjų produktų susidarantių vykstant pirmojo tipo fotosensibilizuojančioms reakcijoms, kuomet krūvis yra perduodamas nuo šviesos sužadinto fotosensibilizatoriaus iki vėžinių ląstelių substrato. Tai yra labai citotoksiška ir reaktyvi deguonies forma, kuri oksiduoja tiek baltymus, tiek DNR, tiek lipidus. Šis radikalas gali sukelti ląstelių metabolizmo sutrikimus, negrįžtamus ląstelės dalių pažeidimus, netgi ląstelių apoptozę [14]. Superoksianijono radikalas gali ne tik reaguoti su navikinio audinio ląstelėmis, bet ir suaktyvuoti kitų deguonies formų gamybą [28, 33, 34].

Vandenilio peroksidas (H_2O_2) gaunamas superoksianijono radikalui prisijungiant vandenilio atomą ir taip sukuriant konjuguatą rūgštį HO_2 , kuri savo ruožtu vėl reagudama su $\cdot\text{O}_2^-$ sukuria vandenilio peroksidą. Vandenilio peroksido molinė masė yra 34 g/mol, grynas vandenilio peroksidas būna šviesiai mėlynos spalvos, atskiestas tampa bespalviu. Ši medžiaga yra naudojama kosmetikoje, balinimo priemonėse, dantų pastose, dezinfekavime bei cheminių medžiagų sintezėje. Lyginant su kitomis susidarantiomis reaktyviomis deguonies formomis, vandenilio peroksidas nėra

toks agresyvus ir toksiškas, tačiau vis tiek veiksmingas naikina vėžines ląsteles. Sveikoms organizmo ląstelėms vandenilio peroksidas žalos nedaro, o kadangi vėžinės ląstelės neturi pakankamai antioksiduojančių fermentų, todėl jas vandenilio peroksidas geba suardyti [33]. Vandenilio peroksidui reaguojant su superoksianijono radikalu arba su redukuotais katalitiniais metalais, sugeneruojamas hidroksilo radikalas ($\text{OH}\cdot$), vienas stipriausių cheminių oksidatorių biologinėse sistemose [35, 36].

Hidroksilo radikalas yra pati aktyviausia ir agresyviausia fotosensibilizuojančių reakcijų metu sukuriamą reaktyvią deguonies atmainą [28]. Vykstant pirmojo tipo fotocheminėms reakcijoms susidaro nedidelis kiekis šių radikalų, tačiau šis radikalas gali pažeisti beveik visų tipų makromolekules, jis gali atakuoti angliavandenius, nukleorūgštis, lipidus ar aminorūgštis. Šį radikalą žmogaus imuninė sistema pagamina kaip šalutinį reakcijų produktą, todėl žmonių ir gyvūnų organizmai yra prisitaikę neleisti šiam radikalui patekti į kraują ar kitus kūno audinius [28, 37].

1.9 Porfirinų agregacija

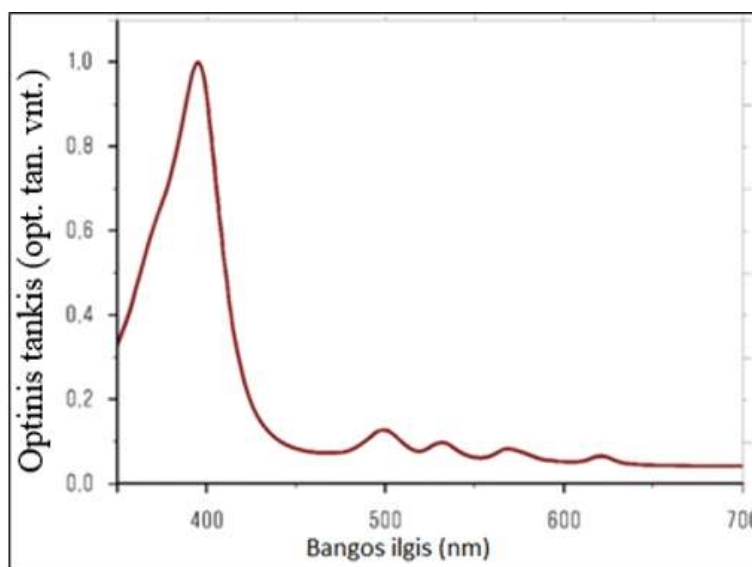
Išskiriami trys pagrindiniai faktoriai nulemiantys porfirinų struktūras. Pirmasis faktorius yra porfirinų koncentracija tirpale. Esant mažai porfirinų koncentracijai, tirpale vyrauja monomerai, o Soret juosta, parodanti molekulių energinį šuolį į antrąją sužadintą lygmenį, yra ties 395nm bangos ilgiu. Didinant porfirinų koncentraciją tirpale, monomerai pradeda jungtis į dimerus ir trimerus, o Soret juosta pradeda slinkti link ultravioletinės bangų srities. Dar labiau padidinus molekulių skaičių tūrio vienetu, iš dimerų ir trimerų pradeda formuotis didesni agregatai [38].

Kitas svarbus faktorius yra terpės, kurioje yra tirpinami porfirinai, savybės. Hematoporfirino agregatai, tirpdami organinėse ir nepolinėse terpėse, suskyla į mažesnius darinius, o poliniuose tirpikliuose agregatai išsilaiko [14, 39]. Apskritai, porfirinų molekulės pasižymi hidrofobiškumu, todėl jos ir linkusios jungtis ir sudaryti H-tipo dimerus ar didesnius agregatus. Agregatų Soret juosta yra arčiau ultravioletinės srities negu monomerų [40].

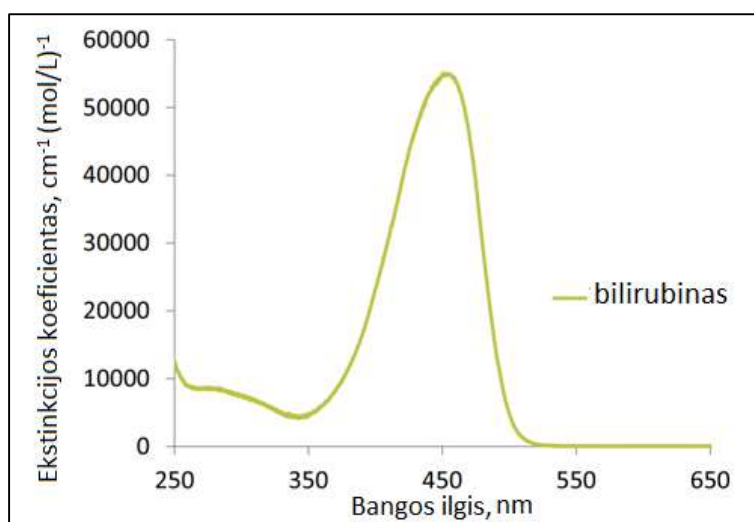
Paskutinytis faktorius yra terpės, kurioje yra tirpinami porfirinai, pH. Esant labai rūgštinei terpei, pH vertėms tarp 0-3, tirpale vyrauja monomerai. Esant mažiau rūgštinei terpei arba neutraliai terpei, kuomet pH vertės yra nuo 3-7, vyrauja didesni agregatai. Esant bazinei terpei, kuomet pH vertės yra nuo 7-14, vyrauja H-tipo dimerai [40, 41].

1.10 Fotoblukimas ir fototransformacijos

Inicijuojant fotosensibilizuojančias reakcijas kartu yra inicijuojami porfirino junginių fotodegradacijos ir fototransformacijos procesai. Fotodegradacijos proceso metu porfirinų monomerai skyla į bilirubino fotoproduktus, monopirolus ir dipirolus [42]. Įprasto hematoporfirino Q sugerties juostos yra ties 500nm, 539nm, 565nm ir 612nm bangų ilgiais (7 pav.) [43], tuo tarpu pirolų sugerties juostos yra išsidėsčiusios ultravioletinėje srityje, o bilirubino sugerties juosta išsidėsčiusi 400nm-480nm bangų ilgių ruože (8 pav.) [44]. Vykstant šioms reakcijoms stebimas sugerties optinio tankio sumažėjimas ties porfirinų sugerties juostomis, taip pat stebimas optinio tankio išaugimas ultravioletinėje srityje, ties pirolų juostomis, ir 400nm-480nm bangų ilgių ruože, ties bilirubino sugerties juosta.



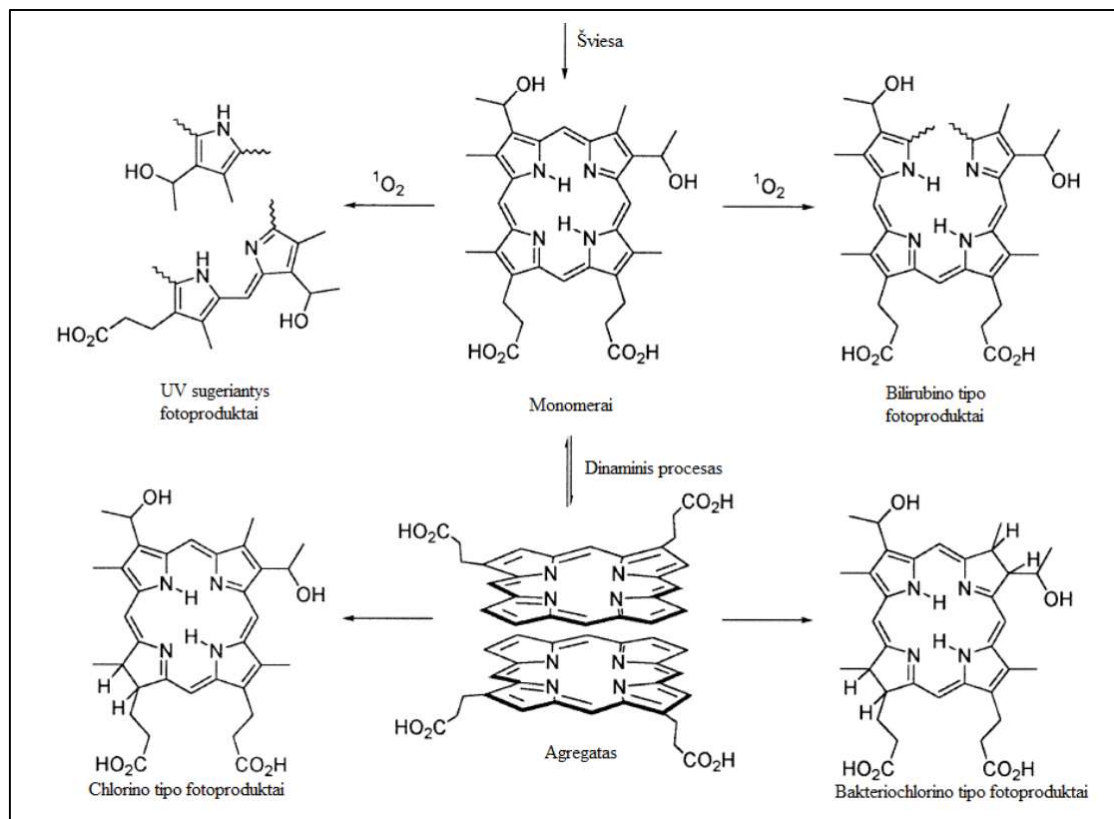
7 pav. Hematoporfirino sugerties spektras, adaptuota iš [43].



8 pav. Bilirubino sugerties adaptuota spektras, adaptuota iš [44].

Kitas reakcijų tipas yra fototransformacijos. Šio proceso metu pati molekulės struktūra nėra suardoma, tačiau yra modifikuojami jos chromoforai (molekulės elementai, nulemiantys spalvą). Vykstant fototransformacijai, iš hematoporfirino agregatų ir H-tipo dimerų susiformuoja chlorino tipo ir bakteriochlorino tipo fotoproduktai. Chlorino sugerties juosta yra ties 640nm, o bakteriochlorino ties 660nm bangos ilgiu. Vykstant šioms reakcijoms matomas aiškus sugerties padidėjimas ties chlorino tipo fotoproduktų sugerties juostomis [42, 45].

Hematoporfirinų fotoblukimo ir fototransformacijų mechanizmai pateikiami žemiau (9 pav.).



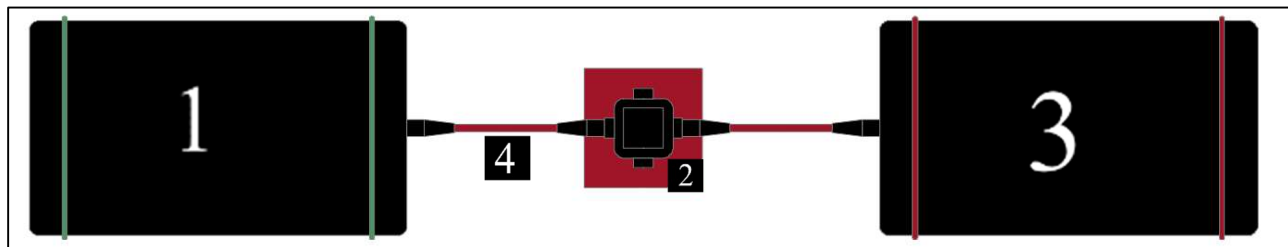
9 pav. Hematoporfirinų fotoblukimo mechanizmų schemas, adaptuota iš [45].

Florinas yra dar vienas galimas hematoporfirino fototransformacijų produktas. Šio elemento molekulė nuo hematoporfirino skiriasi tuo, jog prie centrinio azotų atomų yra prisijungę ne du vandenilio atomai kaip hematoporfirine, o trys. Taip pat florine viena iš dvigubų jungčių, esančių prie metino tiltelio, yra nutraukta. Šios jungties nutraukimas lemia kitokį sugerties juostų išsidėstymą. Florino fotoproduktų sugerties juostos yra ties 440nm ir 735nm bangų ilgiais [46, 47].

2. Metodinė dalis

2.1 Sugerties spektrų matavimo įranga

Šviesos sugerties spektrų matavimams atlikti buvo naudojamas šviesolaidinis spektrometras Avantes-3648.



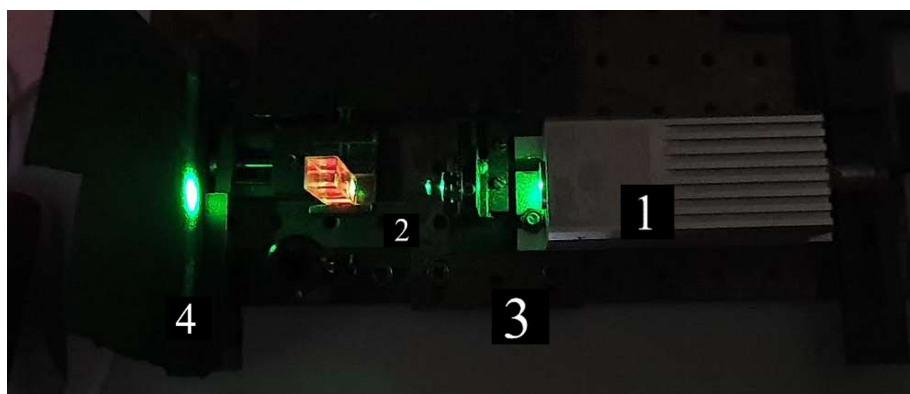
10 pav. Šviesolaidinio spektrometro schema.

Šviesolaidinio spektrometro schema yra pateikta aukščiau paveikslėlyje (10 pav.). Schema sudaro: 1) šviesolaidinis šviesos šaltinis (halogeninė ir deuterio lempos), 2) kiuvečių laikiklis, 3) šviesolaidinis spektrometras, 4) jungiamieji šviesolaidžiai.

2.2 Bandinių švitinimo schema

Bandiniai 10 mm storio kiuvetėse buvo švitinami 532nm bangos ilgio šviesa. Šviesos pluoštui sukurti naudotas diodu kaupinamas kieto kūno lazeris. Prieš švitinimą buvo išmatuojami spektrometru pradiniai bandinių sugerties spektrai, vėliau pradedama švitinimo procedūra. Po pirmų penkių švitinimo minučių buvo išmatuojami bandinių sugerties spektrai. Tuomet vėl buvo tęsiama švitinimo procedūra ir kas 10 minučių buvo išmatuojami sugerties spektrai. Ši švitinimo ir matavimo procedūra vyko iki 85 švitinimo minučių. Po 85min bandinių švitinimo laikas buvo sumažintas iki 5 minučių ir 90 švitinimo minutę buvo išmatuojamas paskutinis sugerties spektras.

Švitinant skirtingus bandinius, lazerio intensyvumas buvo - 80mW/cm^2 . Bandinių švitinimo schema yra pateikta žemiau (11 pav.).



11 pav. Bandinių švitinimo schema.

Schemą sudaro: 1) lazeris spinduliuojantis 532nm bangos ilgio šviesą, 2) kiuvečių laikiklis, 3) švitinimo sistemos pagrindas, 4) Lazerio šviesą sugerianti ir sulaikanti medžiaga.

2.3 Naudojamų medžiagų koncentracijos

1 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų trumpiniai, bandiniuose naudotos koncentracijos ir pradinių tirpalų koncentracijos.

Medžiaga	Bandiniuose naudotos koncentracijos	Pradinių tirpalų koncentracijos
Hematoporfirinas (Hp)	$7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$
Askorbo rūgštis	$0,005 \text{ mol/l}$	$0,1 \text{ mol/l}$
Jaučio serumo albuminas (BSA)	$5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$	$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$
Kalio fosfato buferiniai tirpalai	$(0.04 - 0.05) \text{ mol/l}$, priklausomai nuo bandinio	$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$

2.4 Bandinių paruošimas

2.4.1 Hematoporfirino bandiniai:

Iš pradžių buvo imamas hematoporfirino pradinis tirpalas, kurio molinė koncentracija buvo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Pradinis tirpalas buvo skiedžiamas taip, kad gauta hematoporfirino koncentracija naujame tirpale būtų $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Skiedimui buvo naudoti skirtingos pH vertės kalio fosfato buferiniai tirpalai.

2 lentelė. Medžiagų tūriai bandiniuose.

Kiuvetės turinys	V(ml)
Hp	0,075
Buferinis tirpalas	1,925

2.4.2 Hematoporfirino ir askorbo rūgšties bandiniai:

Iš pradžių buvo imamas hematoporfirino pradinis tirpalas, kurio molinė koncentracija buvo $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Atskiedus buferiniu tirpalu, imamas pradinis askorbo rūgšties tirpalas, kurio molinė koncentracija $0,1 \text{ mol/l}$. Hematoporfirino koncentracija bandinyje $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, askorbo rūgšties $0,005 \text{ mol/l}$.

3 lentelė. Medžiagų tūriai bandiniuose.

Kiuvetės turinys	V(ml)
Hp	0,075
Askorbo rūgštis	0,1
Buferinis tirpalas	1,825

2.4.3 Hematoporfirino ir BSA bandiniai

Iš pradžių buvo imamas hematoporfirino pradinis tirpalas. Atskiedus buferiniu tirpalu, imamas BSA pradinis tirpalas, kurio molinė koncentracija 5×10^{-4} mol/l. Hematoporfirino koncentracija bandinyje $7,5 \times 10^{-5}$ mol/l, BSA 5×10^{-5} mol/l.

4 lentelė. Medžiagų tūriai bandiniuose.

Kiuvetės turinys	V(ml)
Hp	0,075
BSA	0,2
Buferinis tirpalas	1,725

2.4.4 Hematoporfirino, BSA ir askorbo rūgšties bandiniai

Iš pradžių buvo imamas hematoporfirino pradinis tirpalas. Atskiedus buferiniu tirpalu, imamas BSA pradinis tirpalas, įdėjus reikalingą kiekį BSA, imamas askorbo rūgšties pradinis tirpalas. Hematoporfirino koncentracija bandinyje $7,5 \times 10^{-5}$ mol/l., BSA 5×10^{-5} mol/l., askorbo rūgšties 0,005 mol/l.

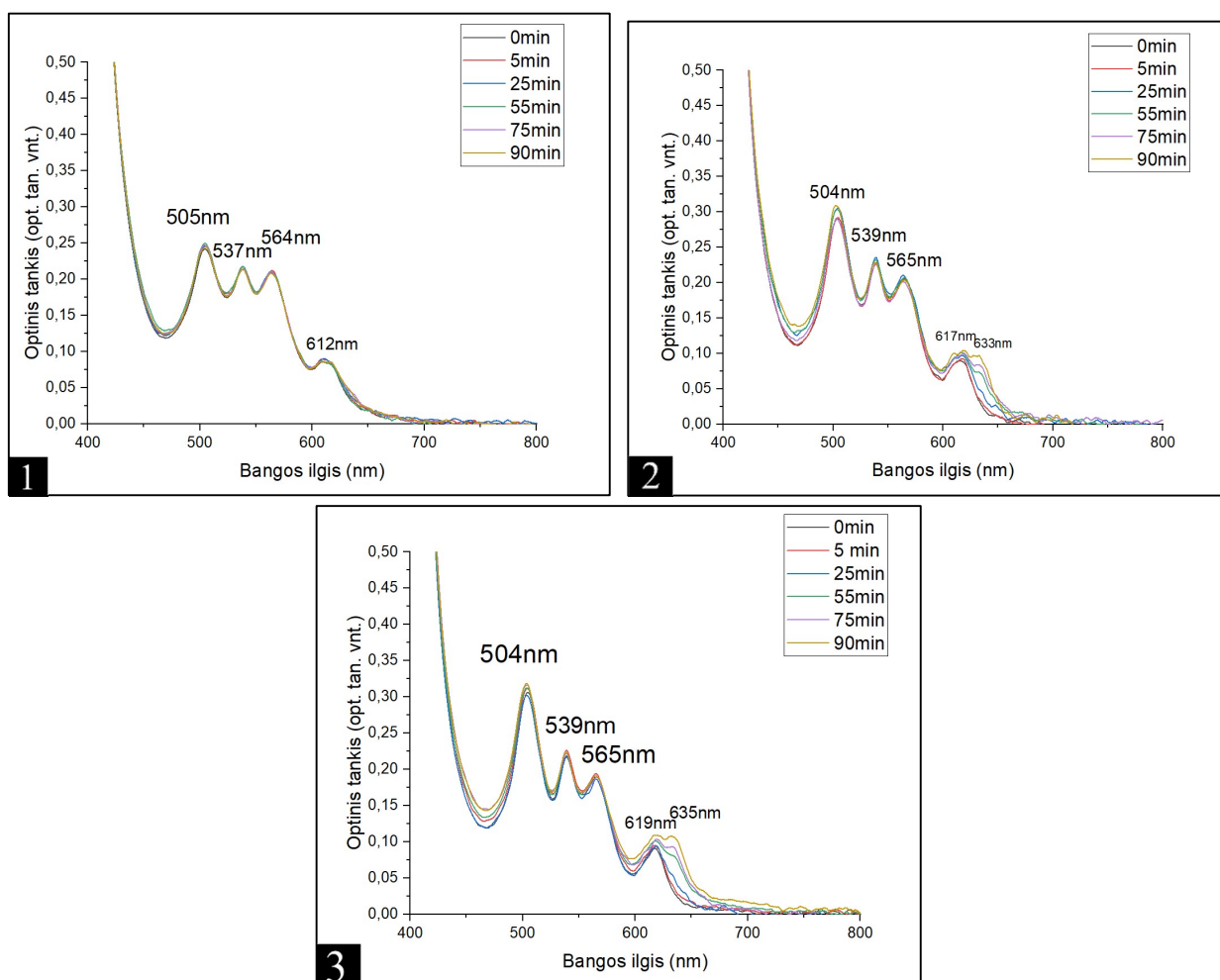
5 lentelė. Medžiagų tūriai bandiniuose.

Kiuvetės turinys	V(ml)
Hp	0,075
BSA	0,2
Askorbo rūgštis	0,1
Buferinis tirpalas	1,625

3. Rezultatai

Atliekant visus matavimus lazerio švitinimo intensyvumas buvo 80 mW/cm^2 , naudojamų kiuvečių storis 10mm, hematoporfirino koncentracija bandiniuose $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, askorbo rūgšties koncentracija $5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$, BSA koncentracija $5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$. Sugerties grafikuose pažymėti bangos ilgiai, ties kuriais buvo pradinio spektro maksimumai (Q juostos), ir pažymėta naujai po švitinimo susidariusios sugerties juostos maksimumo vertė.

Žemiau pateikiami hematoporfirino tirpalų bandinių sugerties spektrai skirtingos pH vertės terpėse (12 pav.).

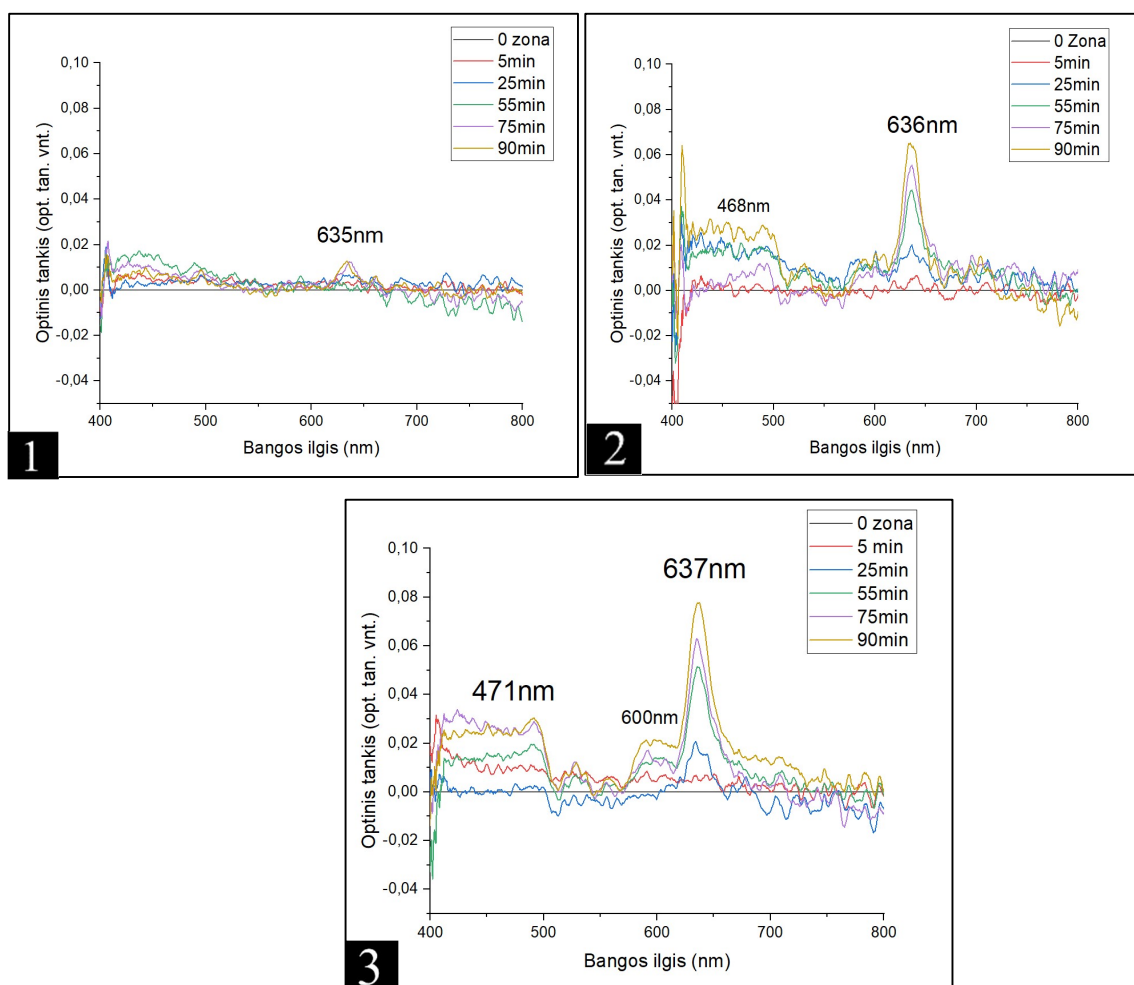


12 pav. Hp tirpalų sugerties spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp pH 8 buferiniame tirpale.

Iš pradžių bus apžvelgiami sugerties spektrai bandinių, esančių neutraliame buferiniame tirpale, tuomet apžvelgiami bandinių sugerties spektrai pH 6 vertės buferiniame tirpale, ir galiausiai apžvelgiami bandinių sugerties spektrai pH 8 vertės buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomos keturios Q sugerties juostos ir naujai po švitinimo susidariusi sugerties juosta, esanti ties 633nm bangos ilgiu (pav. 12.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale taip pat yra matomos keturios Q juostos, tačiau nesimato naujai po švitinimo susidariusios sugerties juostos (pav. 12.1). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 12.2), ketvirtosios Q juostos, esančios ties 505nm bangos ilgiu, optinis tankis 0,04 vienetais mažesnis negu neutraliame. Rūgštiniame tirpale antrosios Q juostos ties 564nm bangos ilgiu ir trečiosios Q juostos ties 537nm bangos ilgiu optinio tankio vertės yra beveik vienodos, tuo tarpu neutraliame tirpale trečiosios Q juostos optinio tankio vertė yra didesnė už antrosios Q juostos optinio tankio vertę. Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale yra matomos keturios Q sugerties juostos ir naujai po švitinimo susidariusi sugerties juosta, esanti ties 635nm bangos ilgiu (pav. 12.3). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 12.2), ketvirtosios Q juostos esančios ties 504nm bangos ilgiu ir naujai susidariusios juostos optinis tankis buvo šiek tiek didesnis.

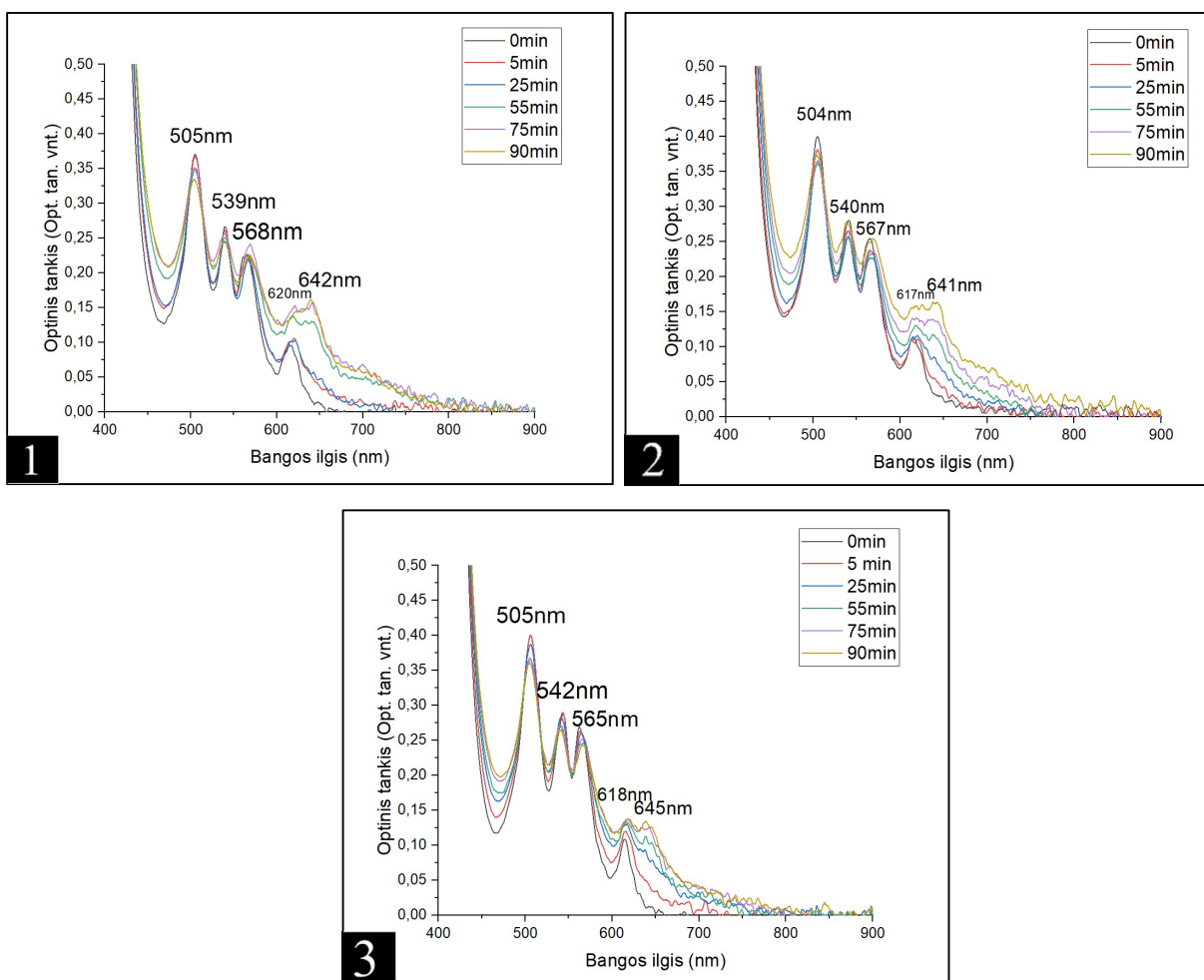
Žemiau pateikiami Hp skirtuminiai sugerties spektrai (13 pav.). Skirtuminiai spektrai parodo, kaip pakito optinis tankis, pašvitinus bandinį lazerio spinduliuote nustatytą laiką. Šie spektrai gaunami iš tam tikros minutės sugerties spektro atėmus pradinį (0 minutės) sugerties spektrą.



13 pav. Hp tirpalų sugerties skirtuminiai spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp tirpalas pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomas optinio tankio padidėjimas 420nm – 480nm bangos ilgių ruože, o 503nm-560nm bangos ilgių ruože atsiranda optinio tankio sumažėjimas, taip pat ties 636nm metrų bangos ilgiu stebimas staigus optinio tankio išaugimas (pav. 13.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale optinis tankis beveik nekito, tik tais matomas minimalus optinio tankio padidėjimas ties 635nm bangos ilgiu (pav. 13.1). Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale optinio tankio kitimas (pav. 13.3) yra labai panašus į optinio tankio kitimą esantį pH 7 tirpale (pav. 13.1), tačiau optinio tankio išaugimas ties 637nm bangos ilgiu baziniame tirpale (pav. 9.3) yra 0,013 vienetais didesnis už optinio tankio išaugimą ties 636nm bangos ilgiu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 13.1).

Žemiau pateikiami hematoporfirino ir jaučio serumo albumino (BSA) tirpalų bandinių sugerties spektrai skirtingos pH vertės terpėse (14 pav.).

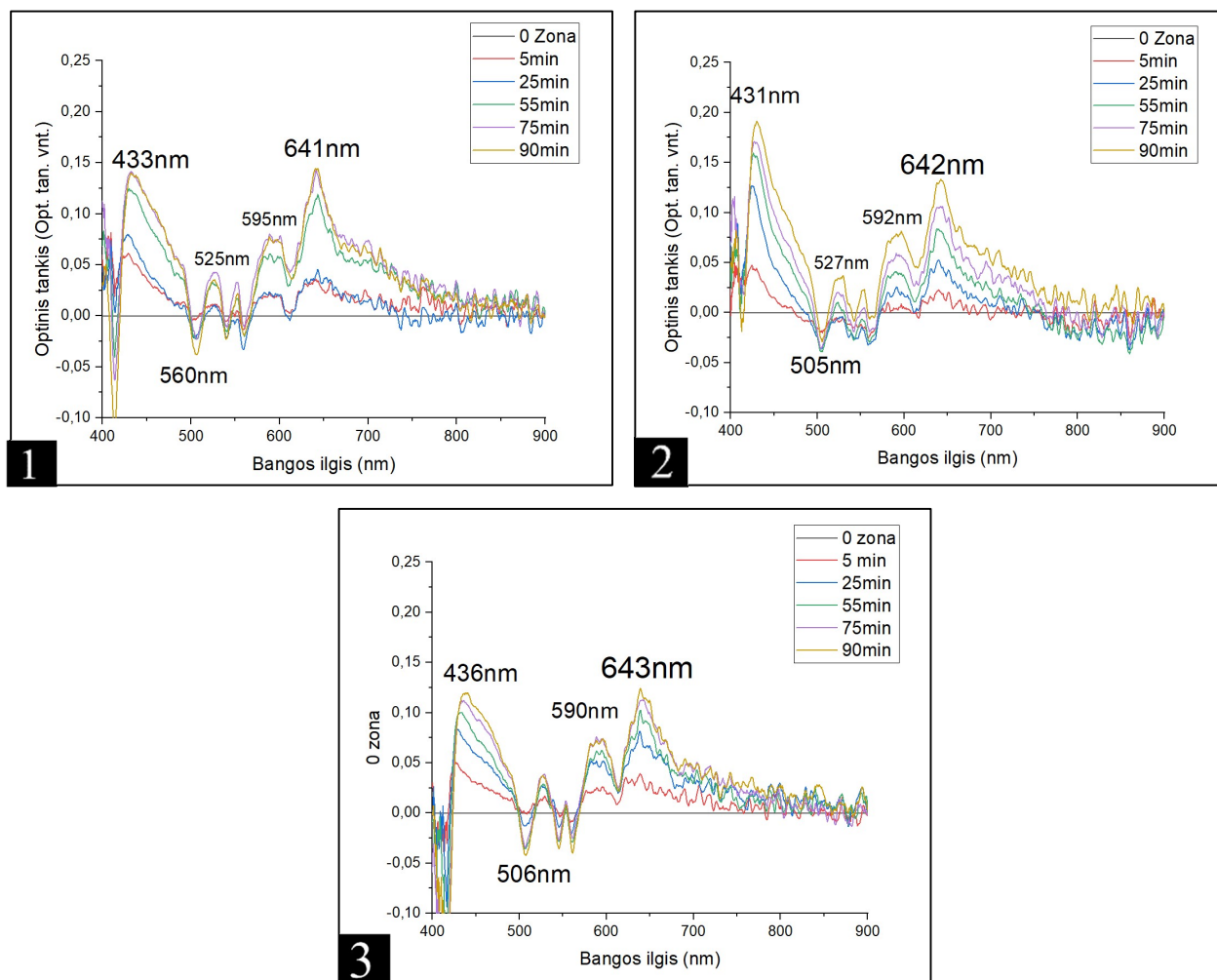


14 pav. Hp ir BSA tirpalų sugerties spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp ir BSA pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp ir BSA pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp ir BSA pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomos keturios Q sugerties juostos ir naujas po švitinimo susidariusios sugerties juostos maksimumas, esantis ties 641nm bangos ilgiu (pav. 14.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale taip pat yra matomos keturios Q juostos ir

naujai po švitinimo susidaręs maksimumas (pav. 14.1). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 14.2), ketvirtosios Q juostos, esančios ties 505nm bangos ilgiu, optinis tankis yra mažesnis, tačiau naujai susidariusių sugerties juostų optiniai tankiai yra lygūs. Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale yra keturios Q sugerties juostos ir naujas po švitinimo susidariusi sugerties juosta, ties 635nm bangos ilgiu (pav. 14.3). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 14.2), naujai susidariusios juostos maksimumo vertė buvo 0,03 optinio tankio vienetais mažesnė.

Žemiau pavaizduota Hp ir BSA skirtuminiai sugerties spektrai (15 pav.).

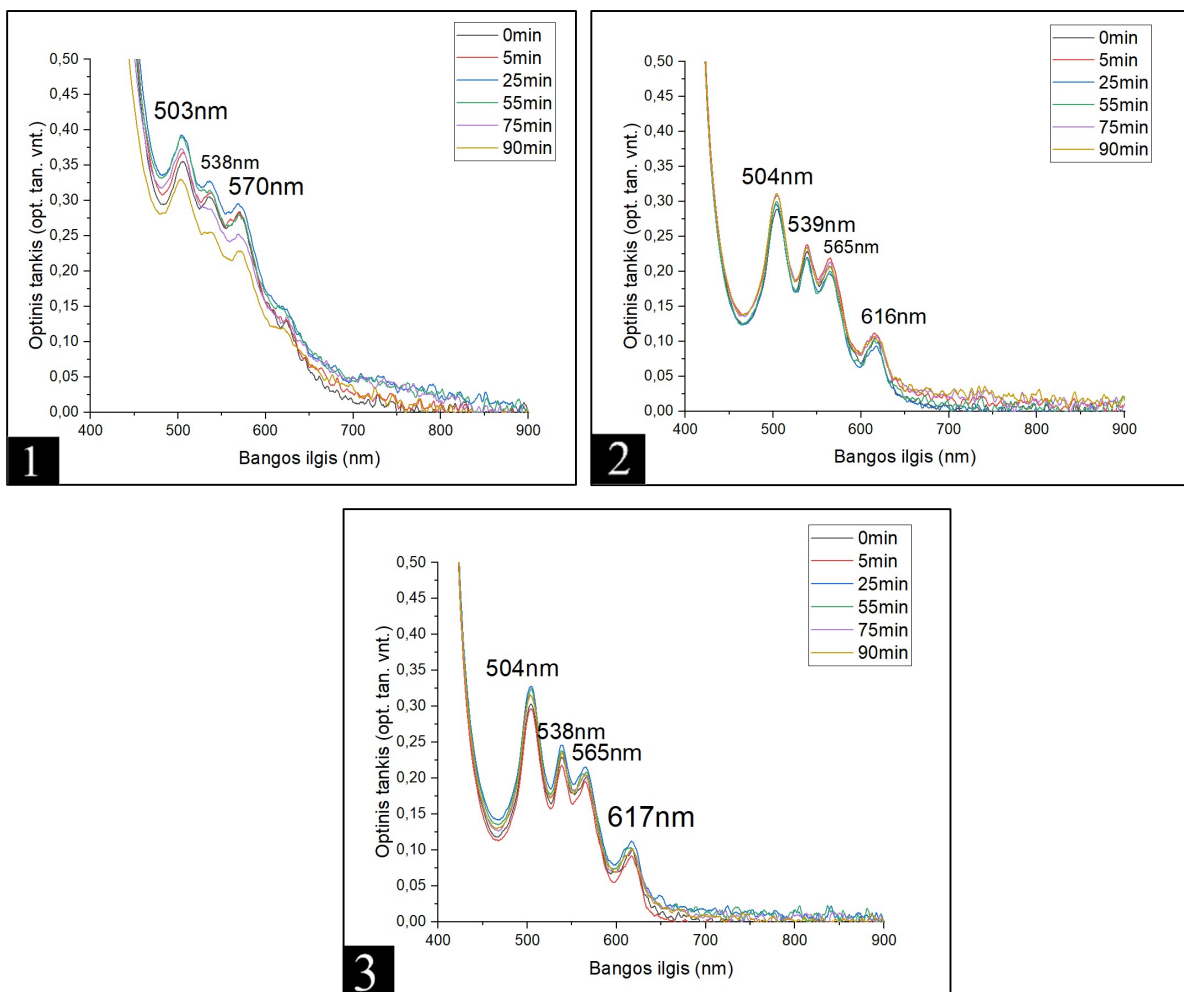


15 pav. Hp ir BSA tirpalų sugerties skirtuminiai spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp ir BSA pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp ir BSA pH 7 buferiniame tirpale. (3) HP ir BSA pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomas optinio tankio padidėjimas 430nm – 480nm bangos ilgių ruože, turintis maksimumą ties 436nm bangos ilgiu. 500nm-565nm bangos ilgių ruože stebimas optinio tankio sumažėjimas, o ties 592nm ir 643nm bangos ilgiais matomas optinio tankio išaugimas (pav. 15.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale pastebimas panašus optinio tankio kitimas (pav. 15.1) kaip ir neutraliame buferiniame tirpale (pav. 15.2), tačiau optinio tankio padidėjimas švitinimo 90 minutę ties 433nm bangos ilgiu (pav. 15.1) yra

mažesnis negu neutraliame tirpale ties 431nm bangos ilgiu (pav. 15.2). Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale esančio bandinio optinio tankio kitimo forma (pav. 15.3) primena optinio tankio kitimą esantį pH 7 tirpale (pav. 15.1), tačiau optinio tankio išaugimas ties 643nm ir 436nm baziniame tirpale (pav. 15.3) yra 0,05 optinio tankio vienetais mažesnis už optinio tankio išaugimą ties 431nm neutraliame buferiniame tirpale (pav. 15.1).

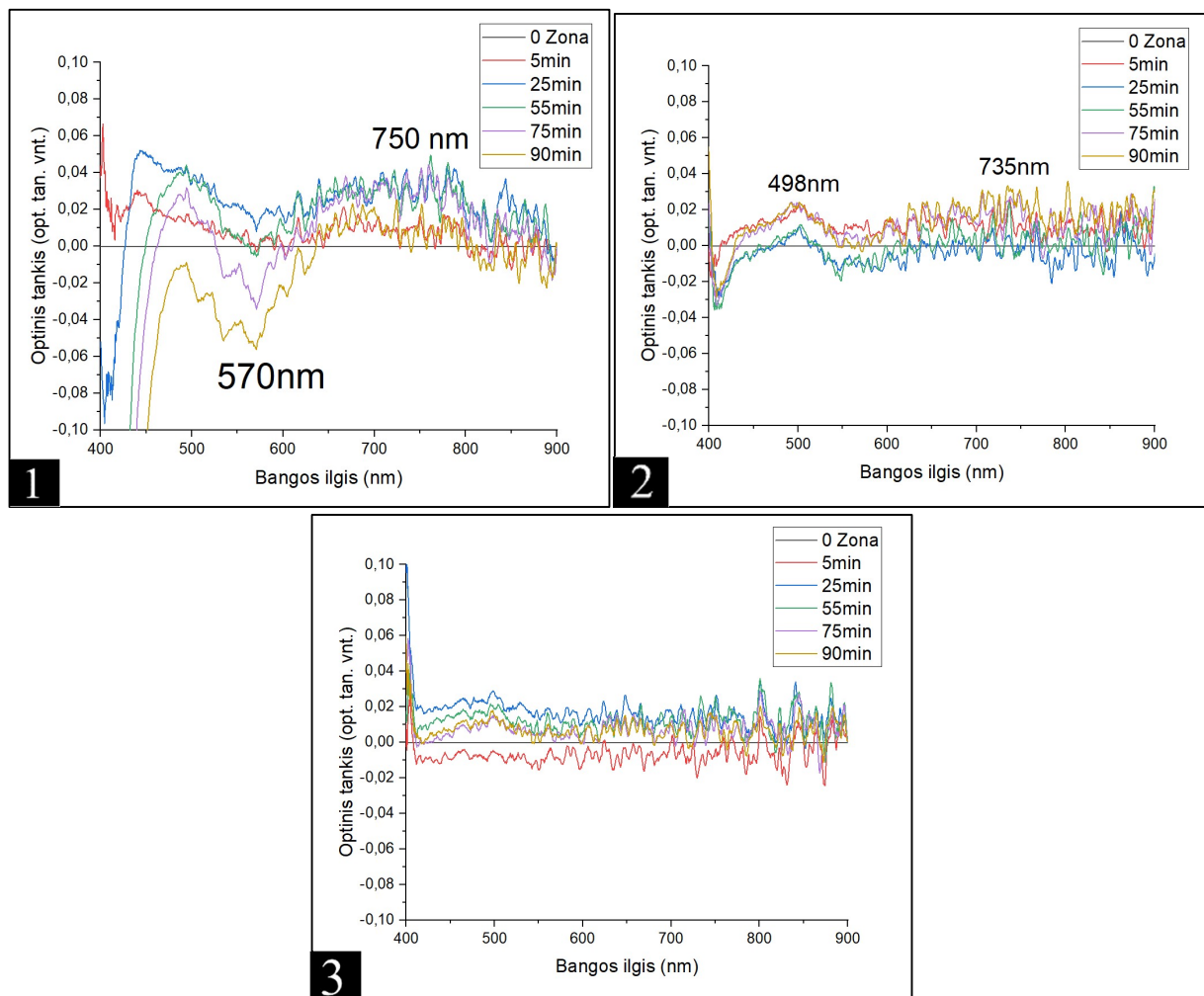
Žemiau pateikiami hematoporfirino ir askorbo rūgšties tirpalų bandinių sugerties spektrai skirtingos pH vertės terpėse (16 pav.).



16 pav. Hp ir askorbo rūgšties tirpalų sugerties spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp ir askorbo rūgšties tirpalas pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp ir askorbo rūgšties tirpalas pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp ir askorbo rūgšties tirpalas pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale, yra matomos keturios Q sugerties juostos (pav. 16.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale, aiškiai matomos yra tik tais 3 Q juostos (pav. 16.1). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 16.2), pH 6 sugerties spektro forma yra kitokia, Q juostos nėra tokios išsiryškintos ir mažesni tarpai tarp spektro maksimumų ir minimumų. Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale, yra matomos keturios Q sugerties juostos. Apskritai pH 8 sugerties spektras savo forma (pav. 16.3) yra labai panašus į neutralaus tirpalo spektrą (pav. 16.2).

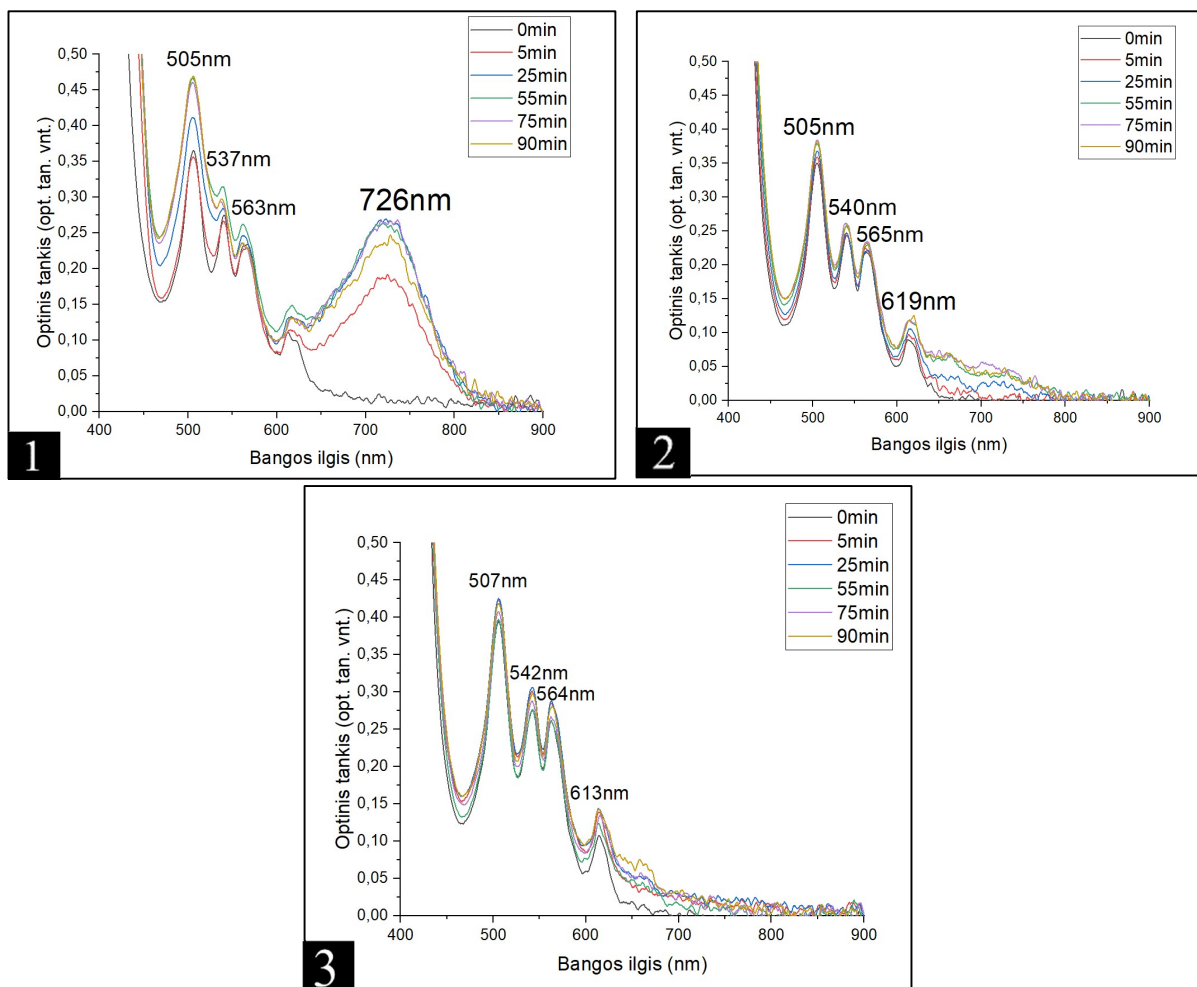
Žemiau pateikiami Hp ir askorbo rūgšties skirtuminiai sugerties spektrai (17 pav.).



17 pav. Hp ir askorbo rūgšties tirpalų sugerties skirtuminiai spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp ir askorbo rūgštis pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp ir askorbo rūgštis pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp ir askorbo rūgštis pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomas optinio tankio minimalus padidėjimas ties 498nm ir 735nm bangos ilgiais (pav. 17.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale stebimas optinio tankio padidėjimas ties 650nm – 780nm bangos ilgiais, taip pat atsiranda optinio tankio sumažėjimas ties 570nm bangos ilgiu (pav. 17.1). Šiame tirpale optinio tankio padidėjimas ties 750nm bangos ilgiu yra didesnis negu neutraliame buferiniame tirpale ties 734nm bangos ilgiu. Baziniame pH 8 tirpale spektrinių pokyčių nėra (pav. 17.3).

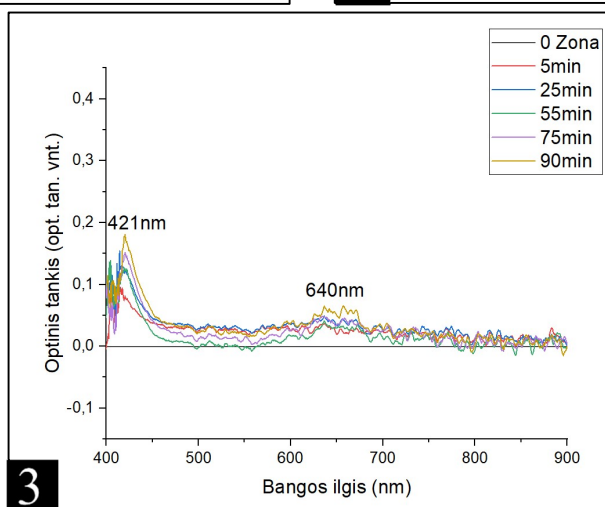
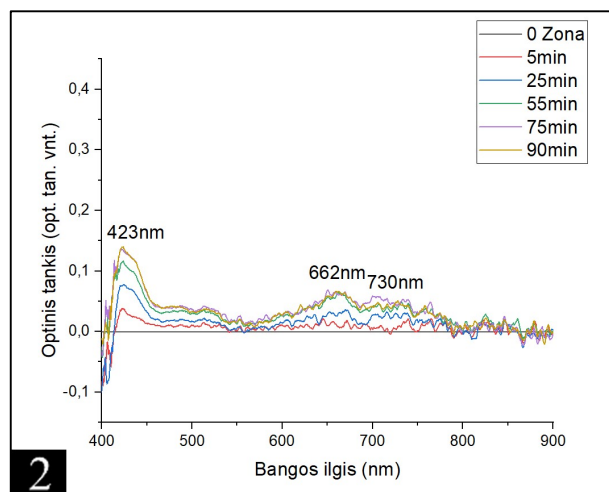
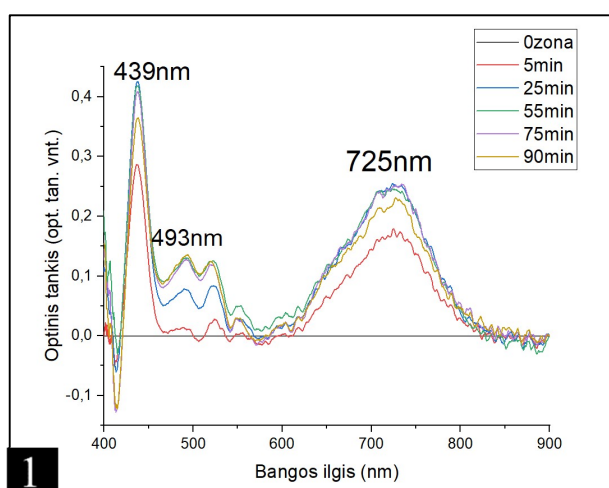
Žemiau pateikiami hematoporfirino, askorbo rūgšties ir BSA tirpalų bandinių sugerties spektrai skirtingos pH vertės terpėse. (18 pav.)



18 pav. Hp, askorbo rūgšties ir BSA tirpalų sugerties spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp, askorbo rūgštis ir BSA pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp, askorbo rūgštis ir BSA pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp, askorbo rūgštis ir BSA pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale yra matomos keturios Q sugerties juostos ir naujas po švitinimo susidaręs sugerties ruožas ties 650nm-780nm bangų ilgiais (pav. 18.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale taip pat yra keturios Q juostos ir naujai po švitinimo susidaręs sugerties ruožas ties 650nm - 780nm, turintis maksimumą ties 726nm bangos ilgiu (pav. 18.1). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale, naujai susidariusio ruožo optinio tankio maksimumo vertė (pav. 18.1) yra 0,21 optinio tankio vienetais didesnė negu neutraliame tirpale po švitinimo susidariusio sugerties ruožo maksimumo vertė (pav. 18.2). Taip pat pokyčiai ties Q juostomis rūgštiniame tirpale buvo didesni negu neutraliame tirpale. Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale po švitinimo susidarė sugerties ruožas ties 650nm - 700nm bangos ilgiais (pav. 18.3). Lyginant su bandiniu neutraliame buferiniame tirpale (pav. 18.2), ketvirtosios Q juostos, esančios ties 507nm bangos ilgiais, optinis tankis pH 8 tirpale buvo 0,04 vienetais didesnis.

Žemiau pateikiami hematoporfirino, BSA ir askorbo rūgšties skirtuminiai sugerties spektrai (19 pav.).



19 pav. Hp, BSA ir askorbo rūgšties tirpalų skirtuminiai sugerties spektrai skirtingos pH vertės buferiniuose tirpaluose. (1) Hp, BSA ir askorbo rūgštis pH 6 buferiniame tirpale. (2) Hp, askorbo rūgštis ir BSA pH 7 buferiniame tirpale. (3) Hp, askorbo rūgšties ir BSA pH 8 buferiniame tirpale.

Neutraliame pH 7 vertės buferiniame tirpale stebimas optinio tankio padidėjimas 600nm – 790nm bangos ilgių ruože su dvejais maksimumais ties 662nm ir 730nm bangos ilgiais, taip pat matomas optinio tankio padidėjimas 420nm – 440nm bangų ilgių ruože su maksimumu ties 423nm bangos ilgiu (pav. 19.2). Rūgštiniame pH 6 vertės buferiniame tirpale stebimi optinio tankio pokyčiai (pav. 19.1) buvo daug didesni negu neutraliame tirpale (pav. 19.2). Matomas optinio tankio padidėjimas 620nm – 790nm bangos ilgių ruože su maksimumu ties 725nm bangos ilgiu, taip pat stebimas optinio tankio išaugimas 460nm-520nm bangos ilgių ruože ir nauja susidariusi smailė ties 439nm bangos ilgiu (pav. 19.1). Baziniame pH 8 vertės buferiniame tirpale matomas optinio tankio padidėjimas 620nm-660nm bangos ilgių ruože, taip pat atsiranda smailės išaugimas ties 421nm bangos ilgiu (pav. 19.3).

4. Rezultatų aptarimas

4.1 Hematoporfirino bandiniai

Visuose švitintuose hematoporfirino bandiniuose pasireiškė optinio tankio smailės išaugimas ties 636nm bangos ilgiu (13 pav.). Tai parodo, jog H-tipo dimerai, paveikti fotosensibilizacijos reakcijų metu sugeneruotų agresyvių deguonies formų, transformavosi į chlorino tipo fotoproduktus. Chlorino tipo fotoproduktų sugerties juosta yra ties 640nm bangos ilgiu [42, 45].

Taip pat matomas optinio tankio padidėjimas 400nm-480nm bangų ilgių ruože (13.1, 13.2 pav.) byloja apie bilirubino fotoproduktų susiformavimą. Tai reiškia, jog vyko fotoblukimo reakcijos, kurių metu iš hematoporfirino monomerų susiformavo bilirubino fotoproduktai [42, 45].

Stebimas optinio tankio sumažėjimas 510nm -560nm bangų ilgių ruože (13.1, 13.2 pav.), kuriame yra išsidėsčiusios hematoporfirino Q juostos, parodo, jog hematoporfirinas dalyvavo fotoreakcijose ir jo koncentracija tirpale sumažėjo [43].

Lyginant skirtingas terpes, rūgštinėje pH 6 vertės terpėje, optinio tankis kito gana lėtai (13.1 pav.). Šioje terpėje vyrauja didesnės hematoporfirino agregatų formos, todėl H-tipo dimerų ir monomerų yra mažiau. Tuo tarpu bazinėje terpėje (13.3 pav.), kurioje vyrauja H-tipo dimerai, fototransformacijos ir fotoblukimo fotoproduktai gaminosi sparčiausiai [40, 41].

4.2 Hematoporfirino ir jaučio serumo albumino bandiniai

Baltymo molekulių poveikis sensibilizatoriaus molekulėms ir jų dariniams yra monomerizuojantis, didesni agregatai yra suardomi į smulkesnius darinius. BSA baltymo molekulė sukibdama su hematoporfirino molekule suardo Hp agregatus bei sudaro naujus Hp-BSA kompleksus, o šie kompleksai kartu su H-tipo dimerais dalyvauja fotosensibilizuojančiose reakcijose [48]. Dėl pasireiškusios agregatų monomerizacijos, pH 6 buferiniame tirpale esančio Hp su BSA sugerties spektro forma (14.1 pav.) yra panašesnė į labiau į neutralioje ir bazinėje Hp be BSA sugerties spektro formą (12.2, 12.3 pav.), nei rūgštinėje terpėje Hp be BSA bandinio spektro formą (12.1 pav.). H-tipo dimeruose ir didesniuose agregatuose molekulės viena kitą dengia, todėl baltymui suardžius šias struktūras padidėja hematoporfirino molekulės pagavos skerspjūvis [14]. Padidėjus pagavos skerspjūviui, pagal Bugerio-Lamberto-Bero dėsnį stebimas optinio tankio padidėjimas [14].

Visose terpėse pasireiškia panašios formos optinio tankio pokyčiai (15 pav.), tačiau neutralioje terpėje jie yra didžiausi (15.2 pav.). Neutralioje terpėje stebimas smailės išaugimas ties

642nm bangos ilgiu byloja apie fototransformacijų metu susidariusius chlorino tipo fotoproduktus [39, 43]. Matomos trys optinio tankio sumažėjimo smailės 500nm-570nm bangų ilgio ruože byloja apie hematoporfirino dalelių sumažėjimą [43]. Optinio tankio padidėjimas 420nm-490nm bangų ilgiu ruože rodo apie bilirubino fotoproduktų susidarymą [42, 44], tačiau naujai atsiradusi smailė ties 431nm bangos ilgiu, byloja, jog susidarė florino tipo fotoproduktai, kurių sugerties juostos yra ties 440nm ir 735nm bangų ilgiais (15.2 pav.) [46, 47].

4.3 Hematoporfirino ir askorbo rūgšties bandiniai

Askorbo rūgštis yra antioksidantas, todėl įdėjus ją į hematoporfirino bandinį, pasireiškė agresyvių deguonies formų neutralizacija [11]. Bazinėje terpėje, kurioje agresyvių formų generacija yra greičiausia, įdėjus askorbo rūgšties, nepasireiškė joks optinio tankio pokytis (17.3 pav.). Reiškia, visos agresyvios deguonies formos buvo neutralizuotos. Neutralioje terpėje stebimas minimalus optinio padidėjimas ties 735nm bangos ilgiu (17.2 pav.) byloja apie florino tipo fotoproduktų susidarymą [46, 47]. Florino tipo produktai susidaro, kai hematoporfirino molekulės centre esantis azoto atomas prisijungia protoną, bei yra nutraukiama viename metino tiltelyje esančios anglies dviguba jungtis [47]. Vykstant pakankamai greitam agresyvių deguonies formų neutralizavimui, askorbo rūgštis gali tiesiogiai sureaguoti su pačiu hematoporfirinu, ko pasėkoje redukuoti hematoporfiriną ir sugeneruoti florino tipo fotoproduktus. Rūgštinėje terpėje florinų tipo fotoproduktų susidarė daugiausiai (17.1 pav.), tai rodo lėčiausią agresyvių deguonies formų generaciją.

4.4 Hematoporfirino, jaučio serumo albumino ir askorbo rūgšties bandiniai

Švitinant hematoporfirino bandinius su BSA ir askorbo rūgštimi, buvo stebimi didžiausi optinio tankio pokyčiai (19.1 pav.). Bazinėje terpėje, lyginant su kitomis terpėmis, susidarė mažiausias kiekis chlorino tipo fotoproduktų. Optinio tankio padidėjimas 620nm-670nm bangų ilgiu ruože (19.3 pav.) parodo, jog susidarė ne vien tik chlorino tipo fotoproduktai, bet ir antriniai bakteriochlorino fotoproduktai, kurių sugerties juosta yra ties 665nm bangos ilgiu [41, 45]. Taip pat matomas staigus optinio tankio padidėjimas ties 421nm bangos ilgiu (19.3 pav.), tai byloja apie florino tipo fotoproduktų susidarymą [46, 47].

Neutralioje terpėje taip pat stebimas chlorino ir bakteriochlorino fotoproduktų susidarymas, tačiau bakteriochlorino produktų šioje terpėje susidarė daugiau negu chlorino fotoproduktų, dėl to stebimas didesnis optinio tankio padidėjimas ties 665nm bangos ilgiu negu ties 640nm bangos ilgiu (19.2 pav.) [42, 45]. Didesnis optinio tankio padidėjimas ties 700nm – 770nm bangų ilgių ruožu rodo, jog neutralioje terpėje susidarė didesnis kiekis florino tipo fotoproduktų negu bazinėje terpėje [46, 47].

Rūgštinėje terpėje pasireiškė ne antioksidantinės, o prooksidantinės askorbo rūgšties savybės [11]. Optinis tankio išaugimas matomas 620nm-790nm bangų ilgių ruože ir ties 439nm bangos ilgiu (19.1 pav.) rūgštinėje terpėje buvo beveik keturis kartus didesnis negu neutralioje terpėje, tai rodo labai didelį florino tipo fotoproduktų susidarymą [46, 47]. Optinio tankio išaugimas ties 493nm bangos ilgiu (19.1 pav.) byloja, jog įvyko fotoblukimo reakcijos, kurių metu susidarė bilirubino fotoproduktai [42, 44].

4.5 Susidariusių fotoproduktų aptarimas ir rekomendacijos

Chlorino ir bilirubino fotoproduktų susidarymas parodo, jog aplinkoje buvo agresyvių deguonies formų, kurios oksidavo fotosensibilizatorių. Chlorino tipo fotoproduktai susidaro, kuomet yra oksiduojami H-tipo dimerai, o bilirubino fotoproduktai susidaro, kuomet yra oksiduojami monomerai [42, 45]. Tuo tarpu florino tipo produktai kaip tik rodo, jog aplinkoje vyko redukuojančios, o ne oksiduojančios reakcijos. Florino fotoproduktai yra gaunami kuomet hematoporfirinas yra redukuojamas. Hematoporfirino bandiniuose su askorbo rūgštimi chlorino tipo fotoproduktų nesusidarė, bet susidarė mažas kiekis florino tipo fotoproduktų [46, 47]. Tuo tarpu bandiniuose be askorbo rūgšties ir be BSA florinų tipo produktai iš viso nesusidarė, bet susidarė chlorino tipo. Taigi askorbo rūgštis bandiniuose be BSA redukavo hematoporfiriną ir neutralizavo reaktyvias deguonies forma, todėl bandiniuose be BSA susidarė florino tipo fotoproduktai, bet nesusidarė chlorino tipo.

Askorbo rūgščiai redukuojant agregatus (Hp ir askorbo rūgšties bandinys pH 6 buferiniame tirpale), susidarė nedidelis kiekis florino tipo fotoproduktų, tuo tarpu į pH 6 vertės Hp bandinį su askorbo rūgštimi įdėjus baltymo, optinio tankio pokytis ties florino tipo fotoproduktų sugerties juosta buvo daugiau nei 8 kartus didesnis lyginant su pokyčiu be BSA. Taigi agregatai nėra palankūs nei oksidacinėms, nei redukuojančioms reakcijoms vykti, todėl baltymo gebėjimas monomerizuoti didesnes struktūras fotosensibilizacijoje yra labai svarbus [48]. Apskritai jei aplinkoje, į kurią švirkščiamas fotosensibilizatorius, nėra baltymo molekulių, tuomet siūlyčiau baltymo įdėti papildomai kartu su fotosensibilizatoriumi, nes baltymas paskatina tiek redukuojančių reakcijų metu susidarančių radikalų generavimą, tiek reaktyvių deguonies formų generaciją.

Askorbo rūgštį kartu su fotosensibilizatoriumi siūlyčiau panaudoti dvejais atvejais. Pirmasis atvejis yra, kuomet fotosensibilizatorius turi galimybę patekti į sveikus audinius ir juose pradėti generuoti reaktyvias deguonies formas [30]. Tuomet askorbo rūgštis jas neutralizuotų ir apsaugotų sveikus audinius nuo reaktyvių deguonies formų pažeidų [7]. Antrasis atvejis yra, kuomet fotosensibilizacijos reakcijos vyksta beduonėje rūgštinėje naviko aplinkoje, kurioje reaktyvios deguonies formos yra generuojamos labai silpnai. Tuomet askorbo rūgštis kartu su BSA, atliktų redukcijos reakcijas ir paskatintų radikalų gamybą, kurių pagalba būtų naikinamos vėžio ląstelės [30].

5. Išvados

1. Švitinant hematoporfirino bandinius vandeninėse terpėse chlorino tipo fotoproduktų sugerties juostos amplitudė bazinėje pH 8 terpėje padidėjo daugiausiai, tuo tarpu neutralioje terpėje amplitudės prieaugis buvo 14proc. mažesnis, o pH 6 terpėje 80proc. mažesnis, tai byloja, jog rūgštinėje terpėje, kurioje vyrauja agregatai, lyginant su kitomis tirtomis terpėmis susidarė mažiausias kiekis reaktyvių deguonies formų, kurioms reaguojant su hematoporfirino H-tipo dimerais susidaro chlorino tipo fotoproduktai.

2. Hematoporfirino ir BSA bandiniuose chlorino tipo fotoproduktų sugerties juostos amplitudės prieaugis rūgštinėje pH 6 terpėje 9-nis kartus, neutralioje 2 kartus, o bazinėje pH 1,5 didesnis, lyginant su tos pačios pH vertės bandinių be BSA prieaugiais, tai reiškia, jog baltymo molekulės sukibdamos su hematoporfirinu molekulėmis monomerizavo didesnius agregatus ir sudarė Hp-BSA kompleksus, kurie lyginant su agregatais generuoja daugiau reaktyvių deguonies formų, kurioms fotooksiduojant H-tipo dimerus ar BSA-Hp kompleksus susidaro chlorino tipo fotoproduktai, taip pat visų trijų tirtų pH verčių bandiniuose susidarė chlorino tipo fotoproduktai, kurie nesusidarė bandiniuose be BSA, tai byloja, jog baltymo molekulių pagalba buvo inicijuojami fotoredukcijos fotovirsmas.

3. Bandiniuose su askorbo rūgštimi be BSA tirtose pH6, pH7 ir pH8 verčių vandeninėse terpėse chlorino tipo fotoproduktai nesusidarė, o tos pačios pH vertės terpėse su askorbo rūgštimi ir BSA chlorino tipo fotoproduktų susidarė mažiau negu bandiniuose be askorbo rūgšties su BSA, tai reiškia, jog askorbo rūgštis neutralizavo reaktyvias deguonies formas, taip stabdydama fotooksidacinius virsmus, kurių metu susidaro chlorino tipo fotoproduktai.

4. Hematoporfirino, askorbo rūgšties ir BSA bandiniuose chlorino tipo fotoproduktų sugerties juostos amplitudės prieaugis rūgštinėje pH 6 terpėje buvo daugiau nei tris kartus didesnis negu neutralioje terpėje ar bazinėje pH 8 terpėje, taip pat šis prieaugis buvo 3,2 kartus didesnis negu prieaugis rūgštinėje pH 6 terpės bandinyje be askorbo rūgšties su BSA, tai byloja, jog askorbo rūgštis bandiniuose su BSA rūgštinėje pH6 terpėje paskatino fotoredukuojančius fotovirsmus, o neutralioje ir bazinėje terpėje nuslopino reaktyvias deguonies formas ir neskatino fotoredukuojančių fotovirsmų.

Santrauka

HEMATOPORFIRINO BANDINIŲ FOTOSTABILUMO SPEKTROMETRINIAI TYRIMAI MODELINĖSE VANDENINĖSE TERPĖSE

Šiame bakalauro studijų baigiamajame darbe apžvelgiama fotosensibilizuojančių reakcijų mechanizmai, reakcijų metu susikuriančios reaktyvios deguonies formos ir askorbo rūgšties galimas poveikis šiems mechanizms. Darbe išskiriamos dvi problemos. Pirmoji, agresyvių deguonies formų generavimo neutralizavimas, fotosensibilizatoriui patekus į sveikus organizmo audinius. Antroji, fotodinaminės terapijos efektyvumo padidinimas naviko srityse, turinčiose mažą deguonies kiekį aplinkoje. Abejoms problemoms spręsti, yra siūloma panaudoti askorbo rūgštį kartu su fotosensibilizatoriumi.

Darbe, nuostoviosios sugerties spektroskopijos metodu, buvo tirta askorbo rūgšties įtaką hematoporfirino fotocheminių virsmų mechanizms modelinėse vandeninėse skirtingos pH vertės terpėse. Pirmiausia buvo tirti hematoporfirino fotovirsmų mechanizmai ir terpės pH įtaka šiems virsmams, tuomet į naujus hematoporfirino bandinius buvo įdėta baltymo jaučio serumo albumino ir švitinant buvo tirta baltymo įtaka hematoporfirino fotovirsmams. Galiausiai buvo tyrinėjamas askorbo rūgšties poveikis hematoporfirino fotovirsmų mechanizms ir hematoporfirino ir jaučio serumo albumino mišinio fotovirsmų mechanizms. Bandiniai buvo švitinami diodu kaupinamo žalios šviesos kieto kūno lazeriu, kurio intensyvumas buvo 80 mW/cm^2 . Ruošiant bandinius buvo naudojami kalio fosfato pH 6, pH7 ir pH 8 buferiniai tirpalai.

Šiame darbe yra aptariami švitinimo metu susidarę fotoproduktai ir tų produktų sukelti spektriniai pokyčiai bandiniuose bei fotoreakcijos, kurių metu susiformavo fotoproduktai. Aptariamas baltymo ir askorbo rūgšties poveikis hematoporfirino fotovirsmų mechanizms.

Summary

THE SPECTROSCOPIC STUDIES OF HEMATOPORPHYRIN SAMPLES IN MODEL AQUEOUS MEDIA

This bachelor thesis provides an overview of the mechanisms of photosensitising reactions, the reactive oxygen species generated during the reactions and the possible effects of ascorbic acid on these mechanisms. The thesis identifies two problems. The first problem is the neutralisation of the generation of aggressive oxygen species when the photosensitiser enters healthy tissues. The second problem is to increase the effectiveness of photodynamic therapy in tumour areas with low oxygen content in the environment. To address both problems, the use of ascorbic acid in combination with a photosensitiser is proposed.

In this work, the influence of ascorbic acid on the mechanisms of photochemical transformations of hematoporphyrin in model aqueous media of different pH values has been investigated by steady absorption spectroscopy. Initially, the mechanisms of hematoporphyrin phototransformations and the influence of the pH of the medium on these transformations were investigated, then the protein bovine serum albumin was added to hematoporphyrin samples and the influence of the protein on the hematoporphyrin phototransformations was investigated under irradiation. Finally, the effects of an ascorbic acid on the photo-conversion mechanisms of hematoporphyrin and on the phototransformation mechanisms of a mixture of hematoporphyrin and bovine serum albumin were investigated. The samples were irradiated with a diode pumped green light solid-state laser with an intensity of 80 mW/cm². Phosphate buffered pH 6, pH 7 and pH 8 solutions were used for sample preparation.

This work focuses on the photoproducts formed during irradiation and the spectral changes in the samples caused by these products, as well as on the photoreactions leading to the formation of photoproducts. The effect of the protein and ascorbic acid on the mechanisms of the hematoporphyrin phototransformation is discussed.

Literatūros sąrašas

1. Daniell, M. D., & Hill, J. S. (1991). A History Of Photodynamic Therapy. *Anz Journal Of Surgery*, 61(5), 340–348. Doi: 10.1111/J.1445-2197.1991.T
2. Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New Photosensitizers For Photodynamic Therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. Doi:10.1042/Bj20150942
3. Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., & González, S. (2008). Photodynamic Therapy Of Cancer. Basic Principles And Applications. *Clinical And Translational Oncology*, 10(3), 148–154. Doi:10.1007/S12094-008-0172-2
4. 6. Rkein, A. M., & Ozog, D. M. (2014). Photodynamic Therapy. *Dermatologic Clinics*, 32(3), 415–425. Doi:10.1016/J.Det.2014.03.009
5. Moan, J., & Berg, K. (1991). The Photodegradation Of Porphyrins In Cells Can Be Used To Estimate The Lifetime Of Singlet Oxygen. *Photochemistry And Photobiology*, 53(4), 549–553. Doi:10.1111/J.1751-1097.1991.T
6. Huang, Z. (2005). A Review Of Progress In Clinical Photodynamic Therapy. *Technology In Cancer Research & Treatment*, 4(3),
7. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kulbacka, J. (2018). Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers And Combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098–1107. Doi:10.1016/J.Biopha.2018.07.0
8. Kessel, D. (2019). Photodynamic Therapy: A Brief History. *Journal Of Clinical Medicine*, 8(10), 1581. Doi:10.3390/Jcm8101581
9. Szeimies, R.-M., Dräger, J., Abels, C., & Landthaler, M. (2001). Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology. *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, 3–15. doi:10.1016/s1568-461x(01)80105-8
10. Freitas, I. (1985). Role Of Hypoxia In Photodynamic Therapy Of Tumors. *Tumori Journal*, 71(3), 251–259. Doi:10.1177/030089168507100306
11. Putchala, M. C., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P., & Natesan, A. (2013). Ascorbic Acid And Its Pro-Oxidant Activity As A Therapy For Tumours Of Oral Cavity – A Systematic Review. *Archives Of Oral Biology*, 58(6), 563–574. Doi:10.1016/J.Archoralbio.2013.01
12. Jung, Y. S., Lim, W. T., Park, J., & Kim, Y. (2009). Effect Of Ph On Fenton And Fenton-Like Oxidation. *Environmental Technology*, 30(2), 183–190. Doi:10.1080/09593330802468848

13. Floor A.Harmsegbert G.Mik. Chapter 9 - Monitoring Mitochondrial Oxygenation In Clinical Environment.
14. Bagdonas S., Rotomskis R., Valančiūnaitė J., Biofotonika, (Vilnius, 2007).
15. Senge, M. O., Sergeeva, N. N., & Hale, K. J. (2021). Classic Highlights In Porphyrin And Porphyrinoid Total Synthesis And Biosynthesis. Chemical Society Reviews, 50(7), 4730–4789. Doi:10.1039/C7cs00719a
16. Dayer, M., Moosavi-Movahedi, A., & Dayer, M. (2010). Band Assignment In Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four-Orbital Model Of Gouterman. Protein & Peptide Letters, 17(4), 473–479. Doi:10.2174/092986610790963645
17. Giovannetti, R. (2012). The Use Of Spectrophotometry Uv-Vis For The Study Of Porphyrins. Macro To Nano Spectroscopy. Doi:10.5772/38797 .
18. Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic Therapy And The Development Of Metal-Based Photosensitisers. Metal-Based Drugs, 2008, 1–23. Doi:10.1155/2008/276109
19. Ricchelli, F. (1995). Photophysical Properties Of Porphyrins In Biological Membranes. Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology, 29(2-3), 109–118. Doi:10.1016/1011-1344(95)07155
20. Manyak, M. J., Russo, A., Smith, P. D., & Glatstein, E. (1988). Photodynamic Therapy. Journal Of Clinical Oncology, 6(2), 380–391. Doi:10.1200/Jco.1988.6.2.380
21. Kessel, D. (1984). Hematoporphyrin And Hpd: Photophysics, Photochemistry And Phototherapy. Photochemistry And Photobiology, 39(S1), 851–859. Doi:10.1111/J.1751-1097.1984.Tb088
22. Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New Photosensitizers For Photodynamic Therapy. Biochemical Journal, 473(4), 347–364. Doi:10.1042/Bj20150942
23. Feng, G., Zhang, G.-Q., & Ding, D. (2020). Design Of Superior Phototheranostic Agents Guided By Jablonski Diagrams. Chemical Society Reviews. Doi:10.1039/D0cs00671h
24. Roblero-Bartolon G.V., Ramon-Galleros E., Use Of Nanoparticles (Np) In Photodynamic Therapy (Pdt) Against Cancer, Gac Med Mex, 151 78-89 (2015), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25739488/>
25. Lukšienė Ž., Photodynamic Therapy: Mechanism Of Action And Ways To Improve The Efficiency Of Treatment, Medicina, 39(12), 1137-1150 (2003)
26. Baptista, M. S., Cadet, J., Di Mascio, P., Ghogare, A. A., Greer, A., Hamblin, M. R., ... Yoshimura, T. M. (2017). Type I And Type Ii Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines And Mechanistic Pathways. Photochemistry And Photobiology, 93(4), 912–919. Doi:10.1111/Php.12716

27. Li, B., Lin, L., Lin, H., & Wilson, B. C. (2016). Photosensitized Singlet Oxygen Generation And Detection: Recent Advances And Future Perspectives In Cancer Photodynamic Therapy. *Journal Of Biophotonics*, 9(11-12), 1314–1325.
Doi:10.1002/Jbio.201600055
28. Zhang, K., Yu, Z., Meng, X., Zhao, W., Shi, Z., Yang, Z., ... Zhang, X. (2019). A Bacteriochlorin-Based Metal–Organic Framework Nanosheet Superoxide Radical Generator For Photoacoustic Imaging-Guided Highly Efficient Photodynamic Therapy. *Advanced Science*, 1900530. Doi:10.1002/Adv.201900530
29. Knight, J., Madduma-Liyanage, K., Mobley, J. A., Assimos, D. G., & Holmes, R. P. (2016). Ascorbic Acid Intake And Oxalate Synthesis. *Urolithiasis*, 44(4), 289–297.
Doi:10.1007/S00240-016-0868-7
30. Putchala, M. C., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P., & Natesan, A. (2013). Ascorbic Acid And Its Pro-Oxidant Activity As A Therapy For Tumours Of Oral Cavity – A Systematic Review. *Archives Of Oral Biology*, 58(6), 563–574.
Doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.01.016
31. Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C In Disease Prevention And Cure: An Overview. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, 28(4), 314–328. Doi:10.1007/S12291-013-0375-3
32. Timoshnikov, V. A., Kobzeva, T. V., Polyakov, N. E., & Kontoghiorghes, G. J. (2020). Redox Interactions Of Vitamin C And Iron: Inhibition Of The Pro-Oxidant Activity By Deferiprone. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(11), 3967.
Doi:10.3390/Ijms21113967
33. Ming, L., Cheng, K., Chen, Y., Yang, R., & Chen, D. (2020). Enhancement Of Tumor Lethality Of Ros In Photodynamic Therapy. *Cancer Medicine*. Doi:10.1002/Cam4.3592
- Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K., Photodynamic Therapy For Cancer, *Nat Rev Cancer*, 3(5), 380-387 (2003).
34. Dobson, J., De Queiroz, G. F., & Golding, J. P. (2018). Photodynamic Therapy And Diagnosis: Principles And Comparative Aspects. *The Veterinary Journal*, 233, 8–18.
Doi:10.1016/J.Tvjl.2017.11.012
35. Dittmeyer R., Grunwaldt J.D., Pashkova A., A Review Of Catalyst Performance And Novel Reaction Engineering Concepts In Direct Synthesis Of Hydrogen Peroxide, *Catalysis Today*, 248(0), 149-159 (2015)
36. Soares, H. T., Campos, J. R. S., Gomes-Da-Silva, L. C., Schaberle, F. A., Dabrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2016). Pro-Oxidant And Antioxidant Effects In Photodynamic

- Therapy: Cells Recognise That Not All Exogenous Ros Are Alike. *Chembiochem*, 17(9), 836–842. Doi:10.1002/Cbic.201500573
37. Rafat Husain, S., Cillard, J., & Cillard, P. (1987). Hydroxyl Radical Scavenging Activity Of Flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489–2491. Doi:10.1016/S0031-9422(00)83860
 38. Kapočiūtė R., Rotomskis R., Rotomskienė J., Toth K., Gadonas R., Ronto G., Hematoporphyrin Diacetate Aggregation And Protonation Properties In Terms Of Absorption Spectroscopy, *Lasers And Ultrafast Processes*, 2 115-130 (1989).
 39. Henri-Pierre Lassalle. Study Of The Photobleaching Mechanisms Of The 5,10,15,20-Tetrakis(M-Hydroxyphenyl) Bacteriochlorin (M-Thpbc), In Solution, In Vitro And In Vivo, July 2005
 40. Scolaro L.M., Castriciano M., Romeo A., Patane S., Cefali E., Allegrini M., Aggregation Behavior Of Protoporphyrin Ix In Aqueous Solutions: Clear Evidence Of Vesicle Formation, *Phys. Chem.*, (106), 2453- 2459 (2002)
 41. Andrade, S. M., Teixeira, R., Costa, S. M. B., & Sobral, A. J. F. N. (2008). Self-Aggregation Of Free Base Porphyrins In Aqueous Solution And In Dmpe Vesicles. *Biophysical Chemistry*, 133(1-3), 1–10. Doi:10.1016/J.Bpc.2007.11.007
 42. Rotomskiene J., Kapociute R., Rotomskis R., Jonusauskas G., Szito T., Nizhnik A., Lightinduced Transformations Of Hematoporphyrin Diacetate And Hematoporphyrin, *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, 2 373-379 (1988).
 43. Lacerda Rangel Esper, M. Â., Junqueira, J. C., Uchoa, A. F., Bresciani, E., Nara De Souza Rastelli, A., Navarro, R. S., & De Paiva Gonçalves, S. E. (2019). Photodynamic Inactivation Of Planktonic Cultures And Streptococcus Mutans Biofilms For Prevention Of White Spot Lesions During Orthodontic Treatment: An In Vitro Investigation. *American Journal Of Orthodontics And Dentofacial Orthopedics*, 155(2), 243–253. Doi:10.1016/J.Ajodo.2018.03.027
 44. Evaluation Of Skin Oncologic Pathologies By Multispectral Imaging Methods Authors: Ilze Lihacova, July 2015. Doi:10.13140/RG.2.2.12585.70242
 45. Tomas Biekša Fotosensibilizatoriaus Sukeltų Fotocheminių Reakcijų Mechanizmo Tyrimas, Naudojant Hematoporfiriną Ir L-Askorbo Rūgštį. 2016m.
 46. Pistner, A. J., Lutterman, D. A., Ghidui, M. J., Ma, Y.-Z., & Rosenthal, J. (2013). Synthesis, Electrochemistry, And Photophysics Of A Family Of Phlorin Macrocycles That Display Cooperative Fluoride Binding. *Journal Of The American Chemical Society*, 135(17), 6601–6607. Doi:
 47. Dolphin D., *The Porphyrins V5: Physical Chemistry, Part C*, (London, Academic Press, 1978).

48. Reyftmann J.P., Morliere P., Goldstein S., Santus R., Dubertret L., Lagrange D.,
Interaction Of Human Serum Low Density Lipoproteins With Porphyrins: A
Spectroscopic And Photochemical Study, *Photochemistry And Photobiology*, 40(6),
721-729 (1984).