

Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Biofizikos studijų komitetas

Tomas Biekša

FOTOSENSIBILIZATORIAUS SUKELTŲ FOTOCHEMINIŲ REAKCIJŲ MECHANIZMO
TYRIMAS, NAUDOJANT HEMATOPORFIRINĄ IR L-ASKORBO RŪGŠTĮ

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

(Studijų programa – BIOFIZIKA)

Studentas

Darbo vadovas

Recenzentas

Biofizikos studijų komiteto pirmininkas

Tomas Biekša

Doc. dr. Saulius Bagdonas

Doc. dr. Alytis Gruodis

Doc. dr. Saulius Bagdonas

Vilnius 2016

Turinys

Įvadas.....	3
1 Literatūros apžvalga	5
1.1 Fotosensibilizuotos navikų terapijos principai.....	5
1.1.2 I tipo fotosensibilizuotos reakcijos	6
1.1.3 II tipo fotosensibilizuotos reakcijos.....	6
1.2 Tetrapiroliniai fotosensibilizatoriai	7
1.3 Hematoporfirinas.....	8
1.4 Askorbo rūgštis	9
1.4.1 Askorbo rūgštis vėžio terapijoje	9
1.4.2 Fentono reakcijos, pro-oksidacinis askorbo rūgšties poveikis	10
1.4.3 Askorbato radikalas	11
1.5 Vandenilio peroksidas.....	12
1.6 Hidroksilo radikalas	13
1.7 Naviko terpė.....	13
1.8 Askorbo rūgštis fotosensibilizuotoje navikų terapijoje.....	14
1.9 Pokyčių spektruose priežastys	15
1.9.1 Terpės ir tirpiklio įtaka	15
1.9.2 Fotoblukimas ir fototransformacijos.....	15
1.9.3 Sąveika su baltymais	17
1.9.4 Metalo-porfirinų susidarymas.....	17
1.10 Elektronų paramagnetinis rezonansas	18
2 Metodinė dalis	19
2.1 Sugerties spektrų matavimo įranga	19
2.2 Elektronų paramagnetinio rezonanso matavimo įranga.....	19
2.3 Naudotos medžiagos	19
2.4 Bandinių paruošimas.....	19
2.5 Bandinių švitinimo schema	20
3. Rezultatai.....	21
3.1 pH ir lazerio spinduliuotės intensyvumo įtaka.....	21
3.2 Vandenilio peroksido (H ₂ O ₂) poveikis	28
3.3 Vario chlorido (CuCl ₂) poveikis	30
3.4 Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrometrija.....	31
4. Rezultatų aptarimas	35
4.1 pH ir lazerio spinduliuotės intensyvumo įtaka, rezultatų aptarimas	35

4.2 Vandenilio peroksido (H ₂ O ₂) poveikis	38
4.3 Vario chlorido (CuCl ₂) poveikis	39
4.4 Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrų analizė.....	40
5. Išvados	43
Santrauka	44
Summary.....	45
Konferencijos.....	46
Padėka.....	47
Literatūra	48

Ivadas

Nors gydomosios šviesos savybės buvo žinomos jau senovės civilizacijoms, fotodinaminė navikų terapija deramo dėmesio sulaukė tik praėjusio amžiaus viduryje [1], kuomet 1960 m Lipsonas (Lipson) ir Baldesas (Baldes) pastebėjo, kad audiniai, turintys sudėtyje fotosensibilizatoriaus – hematoporfirino darinio (HpD), gali fluorescuoti ultravioletinėje šviesoje [2].

Hematoporfirinas – tai sudedamoji HpD dalis. Šis porfirinas yra šviesai jautrus junginys, perteklinę sužadavimo energiją galintis perduoti aplinkinėms molekulėms [3]. Žinduolių ląsteles, kuriose yra fotosensibilizatorių, tokių kaip hematoporfirinas ar jo darinys, veikiant šviesa inicijuojamos fotocheminės reakcijos, kurių rezultatas- ląstelių pažeidimas [4].

Išskiriami du fotocheminių reakcijų tipai. I tipo reakcijų metu sužadintas fotosensibilizatorius nuo molekulės atplėšia elektroną arba protoną, generuodamas laisvuosius radikalus. Tuo tarpu II tipo reakcijų metu fotosensibilizatorius energiją tiesiogiai perduoda deguonies molekulei, taip generuojant singuletinį deguonį [1]. Pastarųjų reakcijų efektyvumas priklauso nuo deguonies kiekio aplinkoje [5]. Tiek I tipo, tiek II tipo reakcijos gali vykti tuo pačiu metu, o procesų intensyvumo santykis priklausys nuo naudojamo fotosensibilizatoriaus, deguonies bei substrato molekulių koncentracijų [6]. Dėl efektyvios singuletinio deguonies sąveikos su skirtingomis biomolekulėmis, teigiama, jog fotodinaminės terapijos efektyvumą lemia būtent II tipo reakcijos [7].

Tačiau dideliuose navikuose dėl netolygaus audinių aprūpinimo krauju gali susidaryti hipoksinės sritys. Navikų hipoksija apsunkina vėžio gydymą, daro naviką atsparų jonizuojančiai spinduliuotei bei kai kuriems chemoterapijos preparatams [8]. Tokiomis sąlygomis FNT efektyvumas taip pat labai sumažėja [9]. Hematoporfirino ir askorbo rūgšties derinys bedeguonėje aplinkoje, ypač esant katalitinių metalų, galėtų iššaukti fotochemines reakcijas bei tokiomis sąlygomis sustiprinti fotodinaminės terapijos poveikį.

Darbe taikomi du metodai. Pirmasis – nuostovioji sugerties spektroskopija, metodas, pagrįstas medžiagos ir elektromagnetinių bangų sąveika [10]. Naudodamiesi šiuo metodu galime stebėti spektrinius pokyčius, atsirandančius fotosensibilizatoriui sąveikaujant su šviesa, aplinka ar tirpikliu. Kitas naudojamas metodas – elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektroskopija – metodas, plačiai taikomas fizikiniuose, cheminiuose, medžiagų ir medicininuose tyrimuose, leidžiantis medžiagose aptikti objektus, turinčius nesuporuotų elektronų porų, pvz., laisvuosius radikalus ar pereinamųjų metalų jonus [11].

Darbo tikslas:

Ištirti L-askorbo rūgšties poveikį ir jo mechanizmą hematoporfirino fotovirsmams modelinėse terpėse.

Uždaviniai:

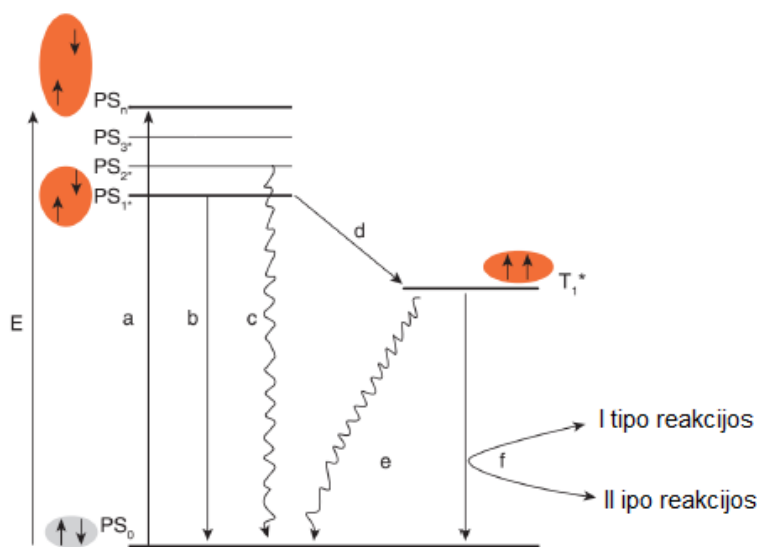
1. Ištirti terpės pH ir lazerio spinduliuotės intensyvumo poveikį hematoporfirino fotovirsmams modelinėse vandeninėse terpėse.
2. Ištirti hematoporfirino fotovirsmus modelinėse sąlygose, palankiose Fentono reakcijoms vykti.
3. Ištirti hematoporfirino fotovirsmus, naudojantis EPR spektrometrijos metodu.

1 Literatūros apžvalga

1.1 Fotosensibilizuotos navikų terapijos principai

Fotosensibilizuota navikų terapija (FNT) jungia du atskirai nekenksmingus komponentus, kurių kombinacija sukelia toksišką poveikį ligų pažeistoms ląstelėms ir audiniams. Pirmasis fotosensibilizuotos navikų terapijos komponentas – fotosensibilizatorius – šviesai jautri molekulė, kuri kaupiasi ligos ar traumų pažeistose ląstelėse ar audiniuose. Antrasis FNT komponentas – tam tikro bangos ilgio šviesa, kurią sugėręs fotosensibilizatorius yra sužadinamas, tuomet perteklinė sužadino energija perduodama aplinkinėms molekulėms [1]. Perdavus energiją inicijuojama eilė fotocheminių ir fotobiologinių procesų, kurie gali negrįžtamai pažeisti ląsteles ir audinius [12].

Energenė sensibilizatoriaus ir šviesos sąveika vaizduojama Jablonskio diagramoje (1 pav.).



1 pav. Jablonskio diagrama, vaizduojanti fotosensibilizatoriaus molekuleje vykstančius energinius vyksmus po sužadino šviesa. PS_n – fotosensibilizatoriaus būseną, a – sugertis, b – fluorescencija, c – vidinė konversija, d – interkombinacinė konversija, e – fosforescencija, f – singuletinio deguonies ar laisvųjų radikalų formavimas

Nesužadintas fotosensibilizatorius yra pagrindinėje būsenoje (PS₀), sugėręs tam tikros energijos fotoną (a), jis pereina į trumpai gyvuojančią ($10^{-10} - 10^{-9}$ s) singuletinę sužadintą būseną (PS_n*). Į pagrindinę būseną fotosensibilizatorius gali grįžti išspinduliuodamas fluorescencijos fotoną (b) arba atiduodamas energiją į aplinką šilumos pavidalu, vidinės konversijos metu (c). Taip pat, sužadintas fotosensibilizatorius interkombinacinės konversijos metu (d) gali pereiti į ilgiau gyvuojančią ($10^{-6} - 10^{-3}$ s) sužadintą tripletinę būseną (T₁*), kurioje esanti molekulė gali inicijuoti fotosensibilizuotas reakcijas (f) arba išspinduliuoti fosforescencijos fotoną ir grįžti į pagrindinę būseną (PS₀) [7, 13].

Priešvėžinis FNT poveikis geriausiai apibūdinamas citotoksiškų reaktyvių deguonies formų (angl. reactive oxygen species (ROS)) generacija [14]. Svarbiausios reaktyvios molekulės, aptinkamos žmogaus organizme yra hidroksilo radikalas ($\text{OH}\cdot$), singuletinis deguonis ($^1\text{O}_2$) ir superoksianijono radikalas ($\cdot\text{O}_2^-$). Oksidacinis stresas, kurį sukelia šie radikalai, labiausiai veikia ląstelių makromolekules: lipidus, nukleorūgštis ir baltymus, inicijuodami grandines reakcijas, tokias kaip lipidų peroksidacija arba baltymų ar DNR oksidacija ir taip sukeldami ląstelių pažeidimus [15].

FNT klinikinis taikymas atliekamas keliais žingsniais:

- Pacientui suleidžiamas fotosensibilizuojantis vaistas.
- Laukiama tam tikrą laiką, kol fotosensibilizatorius selektyviai susikaups navikinėse ląstelėse. Šioje stadijoje atliekama fluorescencinė diagnostika.
- Navikas švitinamas lazerio šviesą nukreipiant šviesolaidžiu [16].

Toksiškas poveikis fotosensibilizuotos navikų terapijos metu pasireiškia dviem reakcijų mechanizmais: I ir II tipo fotosensibilizuotomis reakcijomis.

1.1.2 I tipo fotosensibilizuotos reakcijos

Dėl ilgesnės sužadintos tripletinės būsenos gyvavimo trukmės fotosensibilizuotos reakcijos inicijuojamos būtent šioje būsenoje. Todėl svarbu, jog fotosensibilizatoriaus tripletinės būsenos generavimo kvantinis našumas būtų kuo didesnis.

I tipo fotosensibilizuotos reakcijos apima elektrono arba vandenilio atomo (protono) pernašą, gaminant fotosensibilizatoriaus arba substrato molekulių radikalus [17]. Į tripletinę būseną sužadintas fotosensibilizatorius šių reakcijų metu tiesiogiai sąveikauja su substrato molekulėmis. Vyksta vandenilio atomo ar elektrono atplėšimas arba atidavimas, o susidarę radikalai dalyvauja įvairiose reakcijose. Aplinkoje esant deguonies fotosensibilizatoriaus ar substrato radikalai reaguoja su O_2 , generuodami reaktyvias deguonies formas: H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$ ir $\text{OH}\cdot$ [18].

1.1.3 II tipo fotosensibilizuotos reakcijos

Kitas fotosensibilizuotų reakcijų tipas vadinamas II tipo reakcijomis. Jų metu sužadintas fotosensibilizatorius, esantis tripletinėje būsenoje, perteklinę energiją perduoda deguonies molekulei. Pagrindinė deguonies molekulės būseną yra tripletinė, kaip ir sužadinto fotosensibilizatoriaus. Jei energinis tarpas tarp fotosensibilizatoriaus sužadinto tripletinio ir pagrindinio lygmens yra nemažesnis nei tarp deguonies tripletinio ir singuletinio lygmenų, energijos pernaša tarp jų vyksta efektyviai. Perdavus energiją sugeneruojamas singuletinis deguonis $^1\text{O}_2$ [19], kurio gyvavimo trukmė

biologinėse terpėse $<0.04 \mu\text{s}$, o veikimo radiusas $<0,02 \mu\text{m}$ [12]. Lipiduose ir nepoliniuose tirpikliuose jo gyvavimo trukmė ilgesnė, o anglies tetrachloride (CCl_4) gali siekti 26 ms [20].

Organinės molekulės paprastai būna singuletinėje pagrindinėje būsenoje, todėl pagrindinės būsenos deguonis (tripletinis) dėl sukinio draudimo su jomis aktyviai reaguoti negali. Singuletiniam deguoniui sukinio draudimo nėra, be to, sužadintas $^1\text{O}_2$ yra elektrofiliškesnis, todėl aktyviau reaguoja su biomolekulėmis, linkusiomis atiduoti elektronus [19].

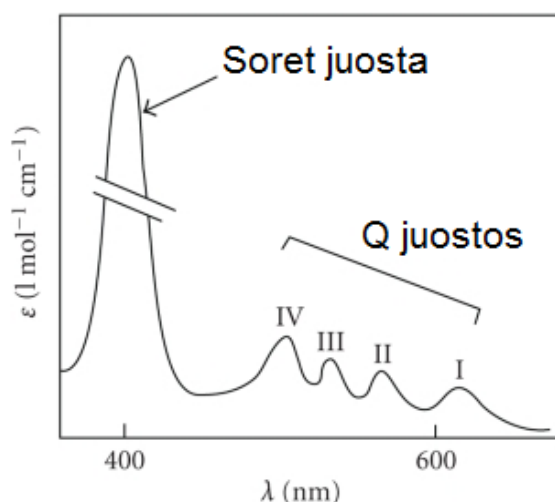
Singuletinio deguonies reakcijos dažnai įtraukia dvigubą $\text{C}=\text{C}$ jungtį, būdingą daugumai biomolekulių [21]. Jungdamasis prie nesočiųjų riebalų rūgščių ir cholesterolio sudaro hidroperoksidus, prie heterociklinių junginių (pvz., histidino) singuletinis deguonis sudaro endoperoksidus, o reaguodamas su organiniais sulfidais (pvz., metioninu), sudaro sulfoksidus [19].

1.2 Tetrapiroliniai fotosensibilizatoriai

Fotosensibilizatorius galima suskirstyti pagal jų cheminę struktūrą. Skirtinga fotosensibilizatorių cheminė struktūra lemia skirtingas spektrines ir sensibilizacines savybes bei jų kaupimosi ląstelėse selektyvumą [5]. Kai kurių biologiškai aktyvių molekulių sugerties ir fluorescencijos spektrai priklauso nuo dvigubų jungčių grandinės ilgio – kuo ilgesnė konjuguotų jungčių grandinė, tuo labiau spektrų ilgabangės sugerties juostos yra paslinktos į raudonąją sritį. Biomolekulę galima apibūdinti pagal jos struktūrą – tarpatominių ryšių seką molekulėje, konfigūraciją – erdvinį atomų ir grupių išsidėstymą, bei konformaciją – įvairias erdvinės struktūras, atsirandančios molekulės atomams ir jų grupėms sukantis apie viengubąjį ryšį arba nutrūkstant ir susidarant naujiems silpniems tarpatominiams ryšiams. Visi šie veiksniai turi įtaką molekulių spektrams. [19]

Molekulės sudarytos iš keturių pirolo žiedų, kurie tarpusavyje yra sujungti keturiais metino tilteliais – tetrapirolai – yra fotosensibilizatoriai. Ši struktūra yra vadinama porfinu ir sudaro jo junginių – porfirinų cheminės struktūros pagrindą. Porfirinų yra labai įvairių, nes metino tilteliuose ir pirolo žieduose H atomai gali būti pakeisti įvairiais pakaitais. Molekulės pakaitų ir cheminės struktūros įvairovė lemia tai, jog porfirinai gali pasižymėti tiek bazinėmis, tiek rūgštinėmis savybėmis, o kintant aplinkos pH N atomai ir pakaitų funkcinės grupės gali jonizuotis arba protonuotis [19].

Porfirinų sugerties spektrą sudaro dvi sritys. Pirmoji susijusi su elektroniniu šuoliu iš pagrindinės būsenos S_0 į antrą sužadintą būseną S_2 . Šuolį atitinkanti sugerties juosta vadinama Soret juosta. Antroji sritis susijusi su mažesnės energijos šuoliais iš S_0 į S_1 , juostos išdėstytos spektrinėje srityje 500-750 nm ir yra vadinamos Q juostomis. Šių juostų intensyvumas priklauso nuo pakaitų išsidėstymo žiede [22].



2 pav. Tipinis porfirino sugerties spektras [23]

1.3 Hematoporfirinas

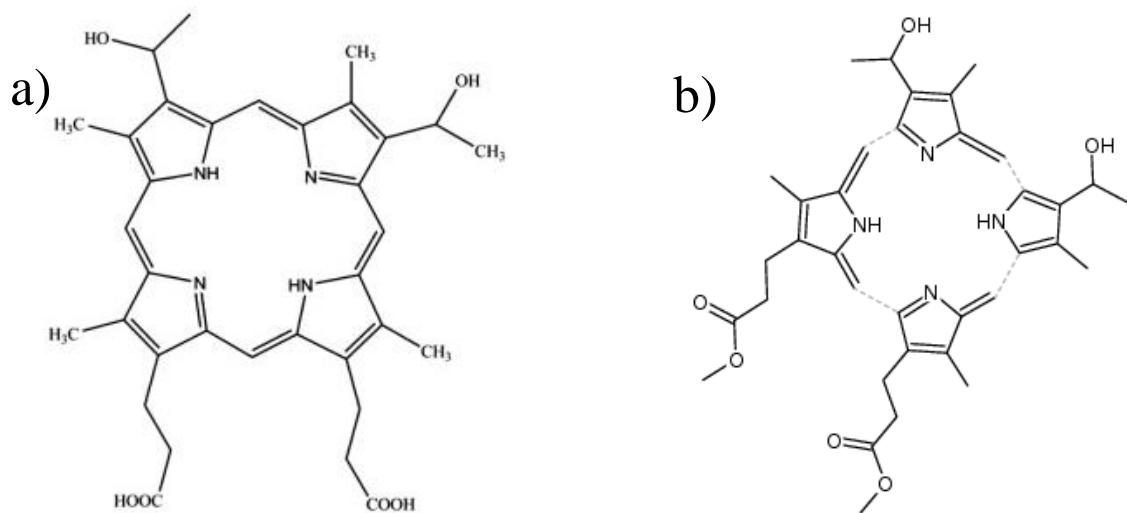
Hematoporfirinas (Hp) buvo pirmasis fotosensibilizatorius, išskirtas iš natūralių medžiagų. Tai padarė Tudichumas (Thudichum) 1867 metais, apdorodamas kraują sieros rūgštimi. Vykstančių reakcijų metu iš hemo molekulės centro pašalinama geležis, o vinilo šoninės grandinės hidratuojamos, suformuojant hidroksietilo grupes [24].

Hematoporfirinas – tai bemetalis pirmosios kartos fotosensibilizatorius. Jo cheminė formulė: $C_{34}H_{38}N_4O_6$, molinė masė yra 598 g/mol [25].

Hematoporfirinas ir jo dariniai 1940 metais buvo pradėti taikyti fotosensibilizuotoje terapijoje dėl pakankamai selektyvaus kaupimosi traumų ar ligos pažeistuose audiniuose. Atlikus išsamesnius tyrimus paaiškėjo, jog tai buvo neišgrynintas įvairių porfirinų mišinys, kurio sudėtyje yra hematoporfirino hidroklorido, hematoporfirino monoacetato izomerų, hematoporfirino diacetato ir kitų porfirinų. Mišinys pavadintas hematoporfirino dariniu (HpD), o jo kaupimasis navikiniame audinyje geresnis, nei gryno Hp [18].

Spektriniam tyrimams naudojamas grynas hematoporfirinas dėl spektro formos pastovumo. Hematoporfirino sugerties spektrui būdinga tipinė forma (2 pav.). Monomerų Soret juostos smailė yra ties 400 nm, o Q juostos yra išsidėsčiusios 460-630 nm srityje [5].

Hematoporfiriną esterifikuojant diazometanu gaunamas hematoporfirino dimetilo esteris. Šio junginio molekulinė masė yra 626,7 g/mol, o cheminė formulė: $C_{36}H_{42}N_4O_6$ [24]. Hematoporfirino dimetilo esteris yra hidrofobiškesnis fotosensibilizatorius, todėl jo kaupimasis navikinėse ląstelėse yra efektyvesnis, nei įprasto hematoporfirino [26].



3 pav. Hematoporfirino [27] (a) ir hematoporfirino dimetilo esterio (b) molekulės [28]

1.4 Askorbo rūgštis

Askorbo rūgštis (Vitaminas C) – tai vandenyje tirpus vitaminas. Jo cheminė formulė: C₆H₈O₆, o molekulinė masė 176,13 g/mol. Šis junginys yra silpnas reduktorius. Askorbo rūgštis pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, geba prisijungti laisvuosius radikalus organizmo skysčiuose, taip pat neutralizuoti singuletinį deguonį ir kitus oksidatorius [29]. Oksiduodamasis pats vitaminas C nukenksmina laisvuosius radikalus bei slopina oksidacijos reakcijas.

Daugelis organizmų natūraliai sintetina askorbo rūgštį, tačiau žmogus to padaryti negali, todėl privalo reikiamą jos kiekį gauti su maistu. Yra keletas askorbo rūgšties atmainų, šiame darbe naudojama viena, L-askorbo rūgštis, kitaip – askorbatas. Tai žmogaus organizmo pH vyraujanti askorbo rūgšties forma. Oksiduotos askorbo rūgšties formos nepažeidžia ląstelių, nes yra santykinai nereaktyvios [30].

1.4.1 Askorbo rūgštis vėžio terapijoje

1976 metais Evanas Kameronas (Ewan Cameron) ir Linus Paulingas (Linus Pauling) publikavo savo tyrimų rezultatus, kurių metu nustatė, jog vėžiu sergančių pacientų, kuriems kas dieną buvo duodama askorbato, išgyvenamumas buvo vidutiniškai 300 dienų ilgesnis, nei pacientų gydomų be askorbato. Tyrime dalyvavo 100 pacientų, kurie kasdien gaudavo 10 g askorbato. Kiekvienam iš askorbatu gydomų pacientui, pagal ligos istorijas buvo priskiriama 10 kontrolinių pacientų, tos pačios lyties, to paties amžiaus (iki 5 metų skirtumo) bei sergančių to paties tipo vėžiu ir stadijos vėžiu. Kontroliniams pacientams turėjo būti skirtas analogiškas gydymas, tačiau be papildomo askorbato [31].

Kadangi pacientų išgyvenamumas buvo lyginamas naudojantis jų ligos istorijomis, o ne tiesiogiai stebint kiekvieną iš pacientų, užtikrinant, kad eksperimento sąlygos būtų tos pačios, mokslo

pasaulyje šis tyrimas sukėlė daug abejonių. Vitaminą C gaunantys pacientai ir kontrolinės grupės galėjo būti netinkamai parinktos [32].

Nuo 1978 metų Mayo klinikos pradėjo analogiškus tyrimus. Daliai kruopščiai atrinktų buvo duodama 10 g askorbato per dieną, kitiems, kontroliniams pacientams, buvo duodama panašaus skonio laktozės placebo tabletė. Siekiant įvertinti E. Kamerono ir L. Paulingo rezultatų patikimumą, buvo atliktos trys nepriklausomų tyrimų serijos, tačiau jų metu gyvenimo trukmės skirtumo tarp askorbatu ir placebo gydomų pacientų nebuvo pastebėta [33]. Nepaisant neigiamų tyrimų rezultatų, daliai pacientų gydomų vitaminu C, praėjus dviem savaitėms nuo gydymo pradžios, žymiai padidėjo apetitas, jėga bei sumažėjo skausmas, tačiau praėjus 4-6 savaitėms, efektas išblėso [34].

Vėlesnių tyrimų metu buvo naudojama didesnė askorbo rūgšties dozė, iki 0,5 g/kg (0,5 g organizmo masės kilogramui), užuot vartojant per burną, askorbo rūgštis buvo leidžiama į veną, tokiu būdu pasiektos koncentracijos iki 20 mM, kuriose askorbo rūgštis pradeda veikti kaip pro-oksidantas ir generuoti vandenilio peroksidą (H₂O₂) [35].

1.4.2 Fentono reakcijos, pro-oksidacinis askorbo rūgšties poveikis

Taigi, praėjus daugiau, nei 80 metų nuo askorbo rūgšties atradimo, jos funkcijų supratimas prasiplėtė, nuo skorbuto prevencijos iki galimybės ją taikyti vėžio terapijoje. Askorbatas palaiko kolageno hidrosilazės Fe²⁺ aktyvioje būsenoje bei yra svarbus kolageno sintezei. Taip pat veikia kai kurių genų raišką [36].

L-askorbo rūgštis aplinkoje esant katalitinių metalų gali veikti kaip pro-oksidantas.. Be to, kad redukuoja oksidacijos šaltinius, tokius kaip singuletinis deguonis, askorbatas taip pat redukuoja metalo jonus, tokius kaip Fe³⁺ ar Cu²⁺, taip pats inicijuodamas laisvųjų radikalų generacijos procesus.



Tokios reakcijos vadinamos Fentono (Fenton) reakcijomis. Jų metu susidaro dehidroaskorbatas – oksiduota L-askorbo rūgšties forma, o redukuoti metalo jonai katalizuoja O–O jungties vandenilio peroksido nutraukimą, reakcijų metu susidarę hidroksilo radikalai gali sąveikauti su DNR molekulėmis, sukeldami trūkius ar modifikuodami DNR bazines [37]. Fe³⁺ ir Cu²⁺ yra aktyviausiai redokso reakcijose dalyvaujantys jonai, randami gyvoje ląstelėje [6, 38].

Askorbatas gali reaguoti su singuletinu deguonimi. Singuletinis deguonis- labai reaktyvi elektrofilinė forma, greitai reaguojanti su daug elektronų turinčiomis molekulių grupėmis, pvz., dvigubomis riebalų jungtimis ar tioliais. Singuletinio deguonies ir askorbato reakcija labai sparti, o reakcijos produktas – vandenilio peroksidas (H₂O₂).



Askorbatas su singuletinu deguonimi reaguoja santykiu 1:1, pagamindamas vieną H₂O₂ molekulę. Aplinkoje esant ir askorbo rūgštis, ir pridėtinių katalitinių metalų, H₂O₂ Fentono reakcijų metu (1.4.2.1) bus generuojamas, ir tuo pačiu metu naikinamas (1.4.2.2 reakcija) [39].

Ne tik katalitiniai metalai, bet ir kai kurie organiniai junginiai gali katalizuoti askorbo rūgštis oksidaciją, įmanoma, kad endogeniniai katalizatoriai pasižymintys panašiomis savybėmis egzistuoja [40].

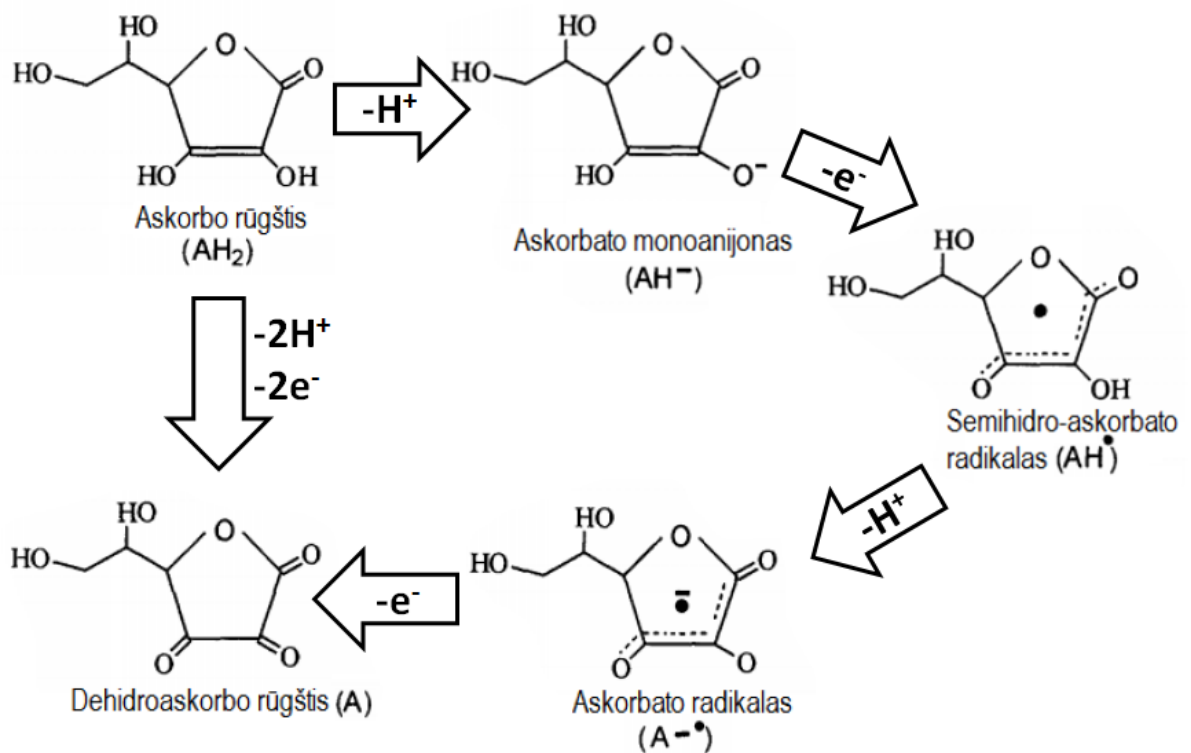
Koncentracija turi didelę įtaką askorbo rūgštis poveikiui. Esant per mažai medžiagos koncentracijai, apsauginis efektas gali nepasireikšti, o pakankamai didelė medžiagos koncentracija gali lemti pro-oksidacinį poveikį, generuojant vandenilio peroksidą. Terpėje esant geležies jonų, didinant askorbo rūgštis koncentraciją, didėja kenksmingas poveikis [41].

Tyrimų, atliktų su gyvūnais, metu vėžinėms ląstelėms kenksminga vandenilio peroksido koncentracija buvo aptikta tarpląsteliniam skystyje, tačiau ne kraujyje. Teigiama, kad H₂O₂ difunduoja į vėžines ląsteles, pažeidžia jų ląstelių membranas, sukeldamas fosfolipidų peroksidaciją, sutrikdo gliukozės metabolizmą bei pažeidžia DNR integralumą. Sveikos ląstelės nėra paveikiamos, nes vandenilio peroksidas jose tuoj pat neutralizuojamas antioksidacinių fermentų, kurių kiekis žmogaus navikinėse ląstelėse yra sumažėjęs [35].

1.4.3 Askorbato radikalas

Askorbo rūgščiai dalyvaujant įvairiose reakcijose žmogaus organizme, susidaro keletas jos atmainų, viena jų – askorbato laisvasis radikalas (A[•]) – tai rezonansiškai stabili trikarbonilo atmaina, kuri formuojama vykstant vienelektronei askorbato (AH) oksidacijai (1.4.3.2 reakcija) [42, 43]. Askorbatas suformuojamas, kuomet askorbo rūgštis molekulė netenka protono reakcijoje su deguonimi, kurios metu papildomai suformuojamas superoksianijono radikalas ([•]O₂⁻) (1.4.3.1. reakcija) [43]. Dėl mažo A[•]/AH⁻ poros redukcijos potencialo, beveik visi biologinėse sistemose sutinkami oksiduojantys radikalai iššauks vienelektronę askorbato oksidaciją, taip suformuojant askorbato radikalą [42].





4 pav. Askorbo rūgšties virsmai biologiniame pH [43]

Neutraliame pH askorbo rūgšties oksidacija yra lėta, tačiau terpei šarmėjant oksidacijos sparta padidėja dešimteriopai su kiekvienu pH vienetu [44].

Antioksidacinis askorbo rūgšties poveikis atsiranda dėl AH⁻ galimybės reaguoti su įvairiais laisvaisiais radikalais ir aktyviomis deguonies formomis. Taip pat, AH⁻ teikia redukuojančias atmainas fermentiniam vandenilio peroksido (H₂O₂) neutralizavimui, kurį atlieka askorbato peroksidazė – fermentas, randamas augaluose. Askorbatas regeneruojamas jo radikalui reaguojant su protonu (H⁺) [45].

1.5 Vandenilio peroksidas

Vandenilio peroksidas, cheminė formulė: H₂O₂, molekulinė masė: 34 g/mol. H₂O₂ yra geriausias vienatomo deguonies donoras po molekulinio deguonies. Perduodant deguonį, išskiriamas vienintelis šalutinis produktas – vanduo. Vandenilio peroksidas naudojamas popieriaus pramonėje, kaip balinimo priemonė, kaip dezinfekuojanti priemonė kosmetikos ir farmacijos pramonėje bei kaip oksidatorius kai kurių cheminių medžiagų sintezėje [46].

Gyvame organizme I tipo fotoreakcijų metu formuojasi superoksianijono radikalas (O₂⁻), kuris rūgštinėse terpėse sudaro peroksiradikalą HO₂[•]; tokie radikalai oksiduoja biologines medžiagas ir dismutacijos reakcijų metu sudaro vandenilio peroksidą (1.5.1 reakcija). Vandenilio peroksidui reaguojant su superoksianijono ir peroksi-radikalais, reakciją katalizuojant geležies (III) jonams,

susidaro stipresnis oksidatorius – hidroksilo radikalas, galintis pažeisti gyvybiškai svarbias ląstelių dalis [5].



Fentono reakcijose H_2O_2 oksiduoja geležies (II) joną į (III) ir leidžia šiam pakartotinai reaguoti su askorbatu (1.4.2.1,2 reakcijos).

1.6 Hidroksilo radikalas

Hidroksilo radikalas ($\text{OH}\cdot$) yra vienas stipriausių cheminių oksidatorių. Tai reaktyvus junginys, turintis trumpą gyvavimo trukmę [47]. Hidroksilo radikalas susidaro vandens ir deguonies reakcijų metu, katalizuojant įvairiems metalų oksidams [48]. Taip pat Fentono reakcijų metu bei H_2O_2 veikiamo UV spinduliuote disociacijos metu.

Hidroksilo radikalai yra generuojami ir I tipo fotocheminių reakcijų keliu. Nors tokių reakcijų metu susidarantys $\text{OH}\cdot$ kiekiai yra nedideli, tačiau iš žinomų laisvųjų radikalų hidroksilo radikalas turi teigiamiausią standartinį redokso potencialą (2310 mV) ir yra laikomas stipriausiai oksiduojančiu radikalų susiformuojančiu biologinėje sistemoje. Jis veikia visas biologinių molekulių rūšis ir lemia dalį oksidacinių pažeidimų [49].

Modelinėse terpėse, nesant taikinių molekulių, šis radikalas gali būti atsakingas už tetrapirolo ciklo suardymą, taip formuojant bilirubino tipo fotoproduktus.

1.7 Naviko terpė

Ilgamečiai tyrimai vertinant sveikų ir navikinių audinių pH parodė, jog naviko vidutinės pH vertės yra mažesnės nei sveikų audinių. Tai lėmė gydymo metodikų, atsižvelgiant į audinių pH, atsiradimo poreikį.

Tarpląstelinis navikinių audinių pH dažnai yra rūgštinis, dėl pieno rūgšties, susidarancios anaerobinės glikolizės metu. Didelė pieno rūgšties koncentracija gali rodyti metastazes ar naviko atsinaujinimą bei gali padėti nustatyti vėžiu sergančiam pacientui diagnozę. [50]. Vėžinio audinio pH nuo sveiko gali skirtis nuo 0,1 iki 2, ir, priklausomai nuo audinio tipo, svyruoti ribose pH 5-6, tuo tarpu sveikų audinių pH svyruoja tarp 6,2 ir 8. Dėl tokio pH skirtumo gali būti sutrikdytas vaistų transportas į naviką [51].

Be žemesnio pH dideliems navikams būdingos hipoksinės sritys. Jos navike gali susidaryti dėl kelių priežasčių, pvz., dėl mažo dalinio O_2 slėgio arteriniame kraujyje, dėl sumažėjusio kraujo O_2

pernešimo našumo ar dėl ląstelių nesugebėjimo pasisavinti O₂ dėl intoksikacijos [52]. Navikų hipoksija gali indukuoti tam tikrų genų raišką, didinančią navikų agresyvumą [53]. Negana to, daro naviką atsparų skirtingiems gydymams ir smarkiai sumažina FNT efektyvumą [8].

Sveikame organizme laisvoji geležis greitai pašalinama geležį prisijungiančių baltymų – transferino ar feritino, tokiomis sąlygomis geležis neaktyvi. Tačiau sutrikęs navikinių audinių metabolizmas gali sudaryti sąlygas, kai aplinkoje sumažėja jų prisijungiančių baltymų, ir tokioje aplinkoje galimas pro-oksidacinis askorbo rūgšties poveikis. Redukuojant Fe(III) jonus didės reaktyvių askorbo radikalų koncentracija [54].

1.8 Askorbo rūgštis fotosensibilizuotoje navikų terapijoje

Kaip jau minėta anksčiau, didelėse koncentracijose askorbo rūgščiai būdingas pro-oksidacinis poveikis, gaminant vandenilio peroksidą. Aplinkoje esant katalitinių metalų, šis procesas paspartėja [55]. Taigi FNT metu naudojant ir askorbo rūgštį tam tikromis sąlygomis galima padidinti oksidacinį stresą naviko ląstelėms.

1984 metais Albertas Girotis (Albert W. Girotti) su kolegomis publikavo darbą, kurio metu tyrė FNT sukeltos lipidų peroksidacijos našumą ir pastebėjo, jog askorbo rūgštį įvedus į bandinį prieš švitinimą, ženkliai padidėjo lipidų peroksidacijos sparta [56]. Rosentalis (I. Rosenthal) ir Benhuras (E. Ben-Hur) pastebėjo, jog askorbo rūgštis FNT metu paspartina raudonųjų kraujo kūnelių fotohemolizę, nepriklausomai ar bandinyje yra FeCl₃. Jie taip pat nustatė, jog reakcijos sparta tiesiogiai susijusi su askorbo rūgšties koncentracija bandinyje, parodydami, jog askorbo rūgštis veikia kaip reagentas, o ne kaip katalizatorius bei padarė išvadą, jog sensibilizatoriaus ir askorbo rūgšties sukeltos I tipo fotosensibilizuotos reakcijos vyksta paraleliai su singuletinio deguonies generavimo keliu – II tipo fotosensibilizuotomis reakcijomis [57].

EPR tyrimai, atlikti naudojant fotosensibilizatorių Fotofriną, parodė, jog FNT metu naudojant ir askorbo rūgštį, membranų lipidų kilmės laisvieji radikalai navikinėse ląstelėse formuojami sparčiau, o ląstelių išgyvenamumas sumažėja [58].

Taigi, askorbo rūgštis fotosensibilizuotoje navikų terapijoje nėra naujiena. Fotosensibilizatorių modelinėse terpėse spektriniai tyrimai leidžia stebėti spektrinius pokyčius, bei daryti išvadas bandinyje vykstančius procesus.

1.9 Pokyčių spektruose priežastys

1.9.1 Terpės ir tirpiklio įtaka

Porfirinų agregaciją lemia jų koncentracija tirpale, tirpalo pH bei tirpiklio savybės.

Porfirinai pasižymi tiek rūgštinėmis, tiek bazinėmis savybėmis, todėl esant skirtingam terpės pH jų polinkis protonuotis yra skirtingas. Dėl didelio hidrofobinio paviršiaus porfirinų molekulės yra linkusios sukibti ir sudaryti H-tipo dimerus bei didesnius agregatus. Tyrimai atlikti su protoporfirinu IX parodė, jog esant didesnėms pH vertėms nei 8, tirpale vyrauja H-tipo dimerai, terpės pH svyruojant tarp 3 ir 7 – didesni agregatai, esant žemoms pH vertėms 0-3 vyrauja dikatijoniniai monomerai [59].

Didelėse koncentracijose, apie 10^{-5} M, tarpai tarp molekulių nedideli, todėl tikimybė joms susidurti ir sukibti išauga. Hematoporfirinas tokiomis sąlygomis yra smarkiai agreguotas, Soret juostos smailė yra pasislinkusi į mėlynąją spektro pusę. Skiedimo metu stebimas trijų etapų deagregacijos procesas.

Skiedžiant tirpalą Soret juosta slenka į ilgabangę pusę. Dideli agregatai skyla į trimerus ir dimerus, kurių sugerties šuolių energija yra mažesnė. Tirpale atsiranda ir monomerų.

Toliau mažėjant koncentracijai trimerai ir dimerai intensyviau skyla į monomerus. Soret juostos smailė ties 395 nm.

Pasiekus ribinę koncentracijos vertę beveik visi agregatai yra suirę į monomerus. Soret juostos smailė toliau skiedžiant tirpalą pozicijos nebekeičia [60].

Juostų pozicija spektruose gali kisti ir dėl molekulių sąveikos su tirpikliu. Tirpiklio molekulės gali prisitaikyti prie sužadintos konfigūracijos sensibilizatoriaus molekulės [19]. Molekulių agregaciją lemia tirpiklio molekulių poliškumas, todėl vandenyje sensibilizatoriai sudaro agregatus, o mažiau poliniuose organiniuose tirpikliuose agregatai yra suardomi [5].

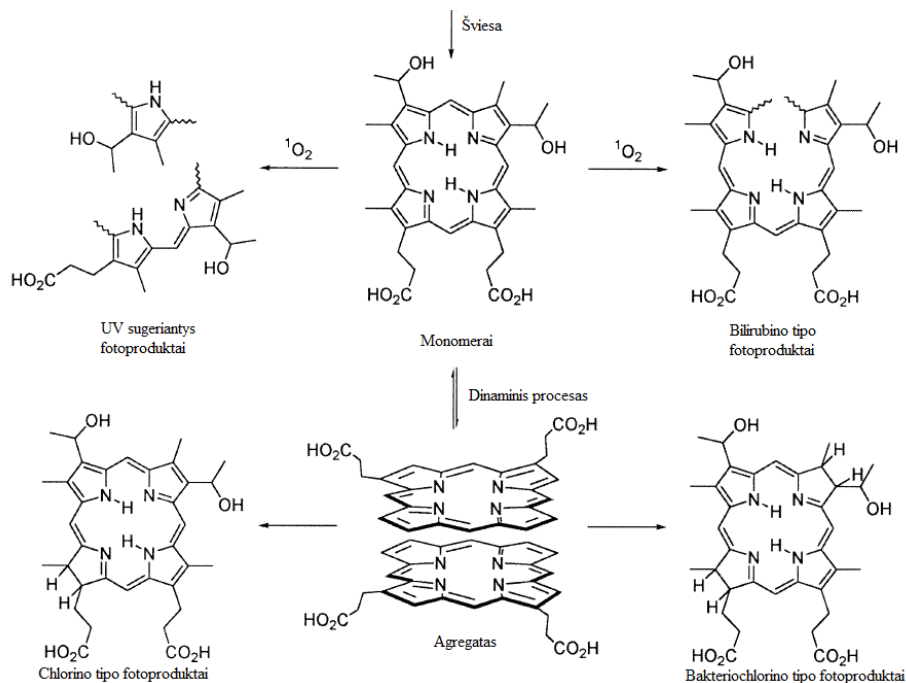
1.9.2 Fotoblukimas ir fototransformacijos

Kita spektrinių pokyčių atsiradimo priežastis – fotoblukimas. Jį galima suskirstyti į du tipus:

- Fotodegradacija – procesas, kurio metu porfino struktūra yra skaldoma į mažesnes UV srityje sugeriančias struktūras- mono- ir di- pirolus. Dėl šių vyksmų mažėja sugerties intensyvumas regimojoje srityje bei auga UV srityje.

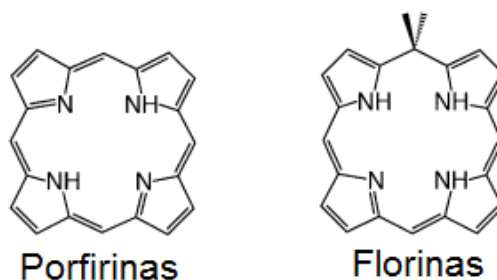
- Fototransformacija – procesas, kurio metu molekulė nėra suardoma, tačiau chromoforai modifikuojami. Tai lemia smailių išnykimą ar naujų smailių atsiradimą sugerties ir fluorescencijos spektruose. Fotoblukimas gali vykti tiek dėl oksidacijos, tiek dėl redukcijos. Daugumoje FNT pavyzdžių vyrauja oksidacinis fotoblukimo mechanizmas [3].

Švitinant agreguotą hematoporfirino tirpalą blunka agregatų sugertį atitinkanti juosta, formuojami chlorino tipo fotoproduktai su sugerties juosta tie 640 nm bei antriniai – bakteriochlorino tipo fotoproduktai, kurių sugerties juosta yra ties 660 nm. Monomerai švitinimo metu skyla į UV srityje sugeriančius mono- ir di- pirolus, bei į nestabilias bilirubino tipo molekules [61]. Šio mechanizmo schema pavaizduota 5 pav.



5 pav. Hematoporfirino fotooksidacijos mechanizmo schema

Dar vienas galimas fototransformacijų produktas – florinas. Šio tipo junginių formavimasi lemia laisvųjų porfirinų fotoredukcija protoniniuose skysčiuose. Nuo įprastos hematoporfirino molekulės florinas skiriasi tuo, jog šio centras yra protonuotas, t.y. ne du, o trys iš centrinių azoto atomų yra prisijungę vandenilį. Kitas skirtumas tarp šių molekulių yra tas, jog vienoje iš *meso* padėčių atsiranda sp^3 -hibridizuota anglis bei nutraukiama viena iš ciklo dvigubų jungčių (6 pav.). Tai lemia molekulių sugerties spektrinius pokyčius. Florino struktūroje Q juostos prasiplečia ir slenka į ilgabangę pusę. Taigi, nors konjuguotų jungčių grandinė sutrumpėja, florino struktūra rezonansinė, todėl sugeria ilgesniame bangos ilgių ruože [62]. Tipinio porfirino juostos yra ties 398, 502, 539, 560 ir 612 nm, tuo tarpu florino – ties 440 bei 735 nm [63].



6 pav. Porfirino ir florino molekulių struktūrinės formulės [64]

1.9.3 Sąveika su baltymais

Baltymai – didelės molekulinės masės organiniai junginiai, turintys daug ir įvairių šoninių grupių [65]. Sensibilizatoriai gali jungtis su baltymu, o dėl jų sąveikos pakinta sugerties ir emisijos spektrai.

Terpei su baltymu būdingas deagreguojantis poveikis, todėl stebimas tiesinis ilgabangis sensibilizatoriaus fluorescencijos spektro poslinkis. Soret juostos intensyvumas didėja, smailė slenka į raudonąją spektro pusę. Dėl sensibilizatoriaus ir baltymo sąveikos taip pat gali atsirasti naujų smailių [66].

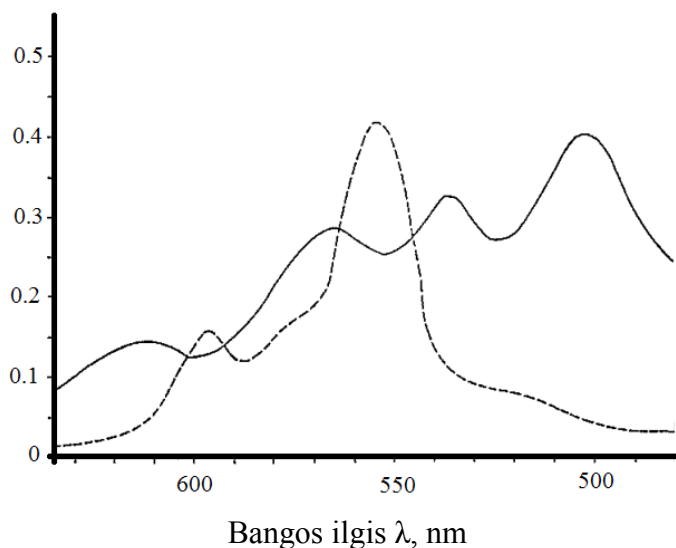
1.9.4 Metalo-porfirinų susidarymas

Porfirino molekulės, sudarytos iš keturių pirolo žiedų, sujungtų metino tilteliais, centre yra apie 3,7 Å niša, kurioje gali prisijungti metalo atomas. Įvykus prisijungimui, du protonai yra atkabinami nuo pirolo azoto atomų, paliekant du neigiamus krūvius toje, – vietoje jungiasi metalas.

Beveik visi metalai sudaro kompleksus su porfiriniais, santykiu 1:1. Vienvalenčiai metalų, Na, K, Li jonai formuoja kompleksus santykiu 2:1, kuriuose metalų atomai yra išsidėstę kiek aukščiau bei žemiau porfirino makrociklo plokštumos. Dvivalenčiai jonai, Co(II), Cu(II) ar Ni(II) sudaro kompleksą be likutinio krūvio. Tokie metalų jonų ir porfirinų kompleksai yra labai stabilūs [67].



Neutraliame vandeniniame buferyje susidarant porfirino ir metalo kompleksui, tipinis jo spektras regimojoje srityje kinta (4 pav.).



7 pav. Hematoporfirino spektras (—) ir jo metalo komplekso (----) spektrai regimojoje srityje [68]

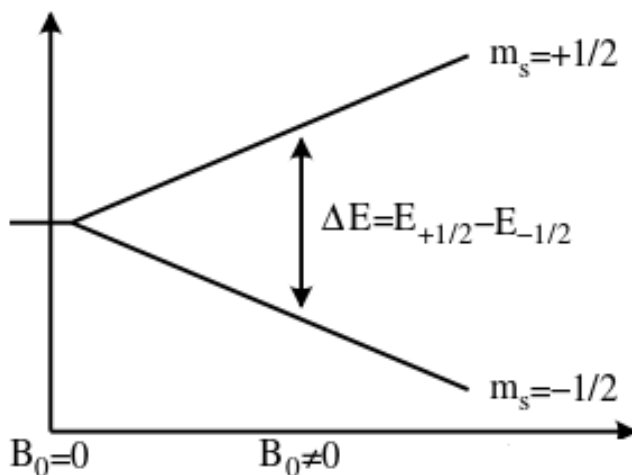
1.10 Elektronų paramagnetinis rezonansas

Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrometrija – tai metodas skirtas tirti feromagnetinėms ir paramagnetinėms dalelėms [69]. Elektronas turi sukinių $s = 1/2$ ir dvi priešingų ženklų magnetines komponentes $m_s = \pm 1/2$. Bandinį, turintį nesuporuotų elektronų porų, patalpinus į išorinį magnetinį lauką, elektronų magnetiniai momentai orientuojasi išorinio magnetinio lauko linijų kryptimi arba kryptimi priešinga jam ir sudaro skirtingų energijų lygmenis (8 pav.) [70].

Tarpas tarp lygmenų ΔE yra proporcingas magnetinio lauko stipriui B_0 :

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0 \quad (1.10.1)$$

Čia g_e - elektrono giromagnetinis faktorius, μ_B - Boro magnetonas. Bandinys yra veikiamas kintančiu magnetiniu lauku B_0 , kai patenkinama rezonanso sąlyga (1.10.1) elektronai iš žemesnio energinio lygmens $m_s = -1/2$, pereina į lygmenį $m_s = 1/2$, sugerdami elektromagnetinę spinduliuotę [71].



8 pav. Elektronų lygmenų diagrama, kai išorinis magnetinis laukas $B_0 = 0$ ir kai $B_0 \neq 0$ [70]

2 Metodinė dalis

2.1 Sugerties spektrų matavimo įranga

Ekspirimente bandinių sugerties spektrų matavimui naudojamas spektrofotometras Avantes-3648, (JAV). Įrangos sudedamosios dalys: kiuvečių laikiklis, šviesolaidinis spektrometras, šviesolaidinis šviesos šaltinis ir jungiamieji šviesolaidžiai.

2.2 Elektronų paramagnetinio rezonanso matavimo įranga

Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrai buvo registruojami Bruker Eleksys-E580 EPR spektrometru, veikiančiu ~10GHz dažnio mikrobangų ruože bei galinčiu dirbti tiek impulsinio, tiek nuolatinio zondavimo metodais. Pagrindinės įrangos sudedamosios dalys: mikrobangų rezonatorius, į kurį patalpinamas bandinys, mikrobangų tiltas, elektromagnetas ir jo maitinimo šaltinis bei elektroninis blokas, kuriame integruotas oscilografas ir kompiuteris duomenų registravimui bei analizei.

2.3 Naudotos medžiagos

1 lent. Naudotos medžiagos (skliausteliuose jų trumpiniai), gamintojai

Medžiaga	Gamintojas
Hematoporfirino dimetilo esteris (HP)	Porphyrin Products, Inc, JAV
Kalio fosfatinis buferinis tirpalas pH= 7, C= 50 mM ir pH= 5, C= 10 mM	
Vandenilio peroksidas (H ₂ O ₂)	Greenice, Lietuva
L- askorbo rūgštis (AR)	Sigma-Aldrich, Jungtinė Karalystė
Jaučio serumo albuminas (BSA)	Carl Roth, Vokietija

2.4 Bandinių paruošimas

Pirmiausia buvo pagamintas $C= 1 \times 10^{-3}$ M koncentracijos hematoporfirino bazinis tirpalas. Į pasvertą miltelių pavidalo hematoporfiriną buvo įlašinta 40 μ l natrio šarmo (NaOH). Indelis pamerktas į ultragarsinę vonelę. Į susidariusį tirpalą nuolatos maišant nedidelėmis porcijomis įpiltas atitinkamas kiekis kalio fosfatinio buferinio tirpalo (pH= 7) $C= 1 \times 10^{-3}$ M koncentracijai pasiekti. Pagamintas bazinis tirpalas laikomas šaltoje, tamsioje vietoje.

Askorbo rūgštis bandiniuose, kurių sugerties spektrai buvo registruojami, buvo sveriami ir tirpinami jau paruoštuose, $7,5 \times 10^{-5}$ M koncentracijos hematoporfirino bandiniuose. 3 % vandenilio peroksidas (H₂O₂) taip pat buvo lašinamas į jau paruoštus bandinius.

Matuojant hematoporfirino bandinius su BSA, pirmiausia buvo sveriami BSA milteliai, atsvėrus reikiamą kiekį, šie tirpinami kalio fosfatiniame buferyje. Naudojama BSA koncentracija bandiniuose lygi hematoporfirino koncentracijai.

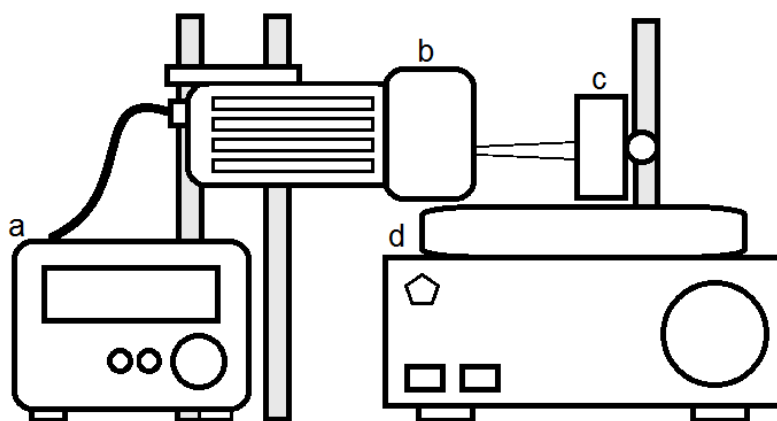
Paramagnetinio rezonanso spektrometru tirti bandiniai buvo gaminami prieš pat atliekant matavimus. Laboratorijoje buvo ruošiami atskirų jų komponentų tirpalai, kurie buvo sumaišomi prie EPR spektrometro, prieš pat matavimą. Atliekant šiuos bandymus askorbo rūgštis buvo tirpinama kalio fosfatiniame buferyje (pH= 7) ir vėliau dedama i bandinius.

2.5 Bandinių švitinimo schema

Bandiniai, kurių sugerties spektrai buvo registruojami, švitinti maišant magnetine maišykle $\lambda=532$ nm bangos ilgio diodu kaupinamu kieto kūno lazeriu atvirose 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. Bandinių švitinimo schema pateikta 8 pav.

Bandiniai buvo švitinti skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais, sugerties spektrai matuoti skirtingais laiko intervalais, taip, kad lazerio spinduliuotės dozės lyginamiems bandiniams būtų artimos viena kitai.

Elektronų paramagnetinio rezonanso spektrų registravimo metu bandiniai buvo švitinami tuo pačiu lazeriu. Spektrometro rezonatoriaus apačioje yra anga, kurioje specialiu laikikliu buvo įtvirtintas šviesolaidis. EPR spektrai buvo registruojami prieš švitinimą bei apšvitinus bandinį skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais.

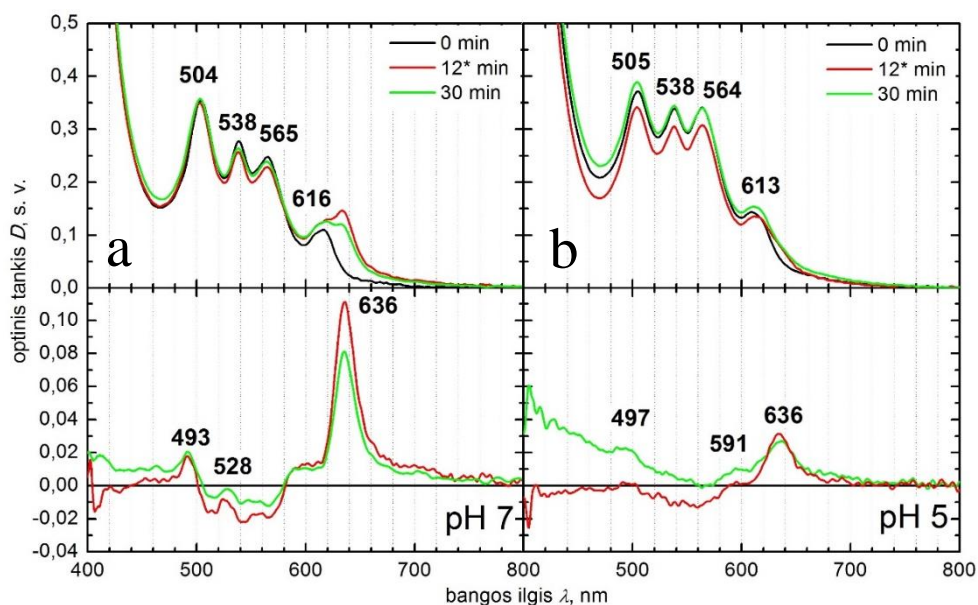


9 pav. Bandinių švitinimo schema (a – lazerio valdymo blokas, b – $\lambda=532$ nm lazeris, c – kiuvečių laikiklis, d – magnetinė maišyklė)

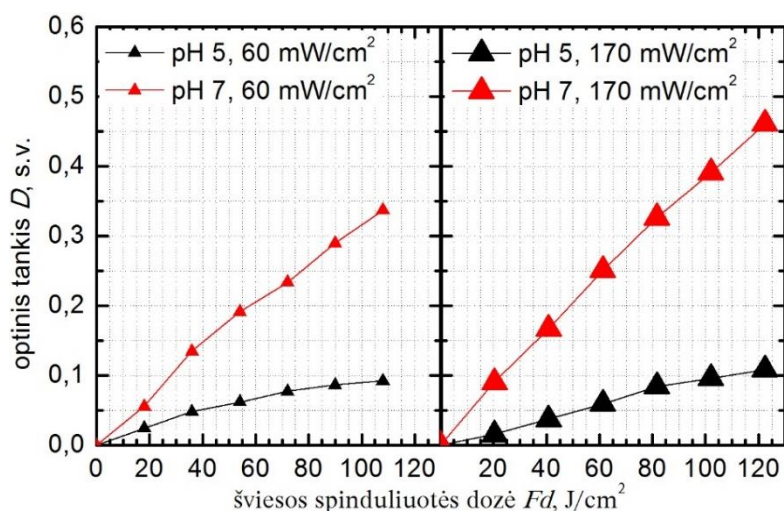
3. Rezultatai

3.1 pH ir lazerio spinduliuotės intensyvumo įtaka

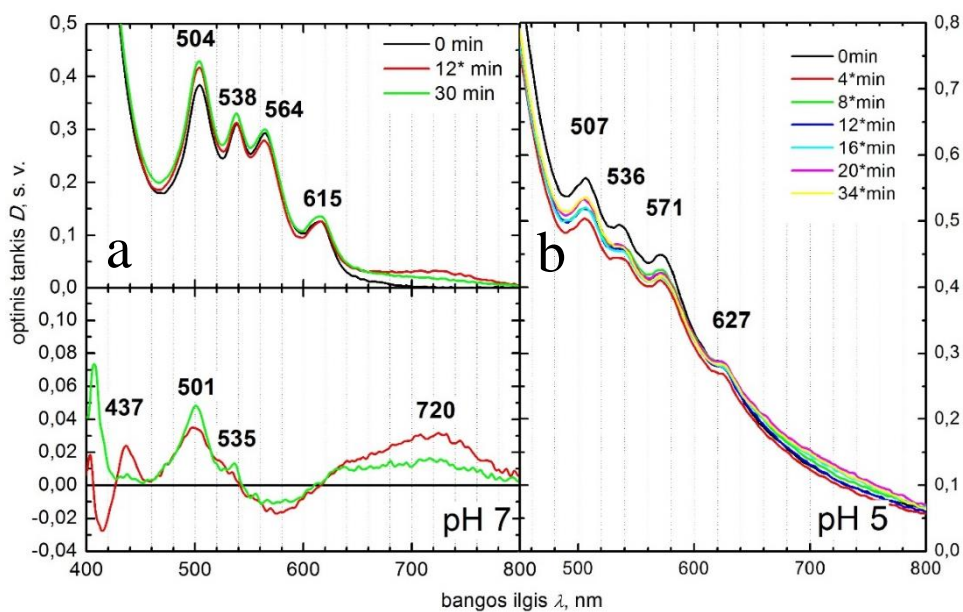
Žemiau pateikiami skirtingų hematoporfirino tirpalų bandinių sugerties ir sugerties skirtuminiai spektrai bei sugerties skirtuminių spektrų smalių optinio tankio kitimo kinetikos.



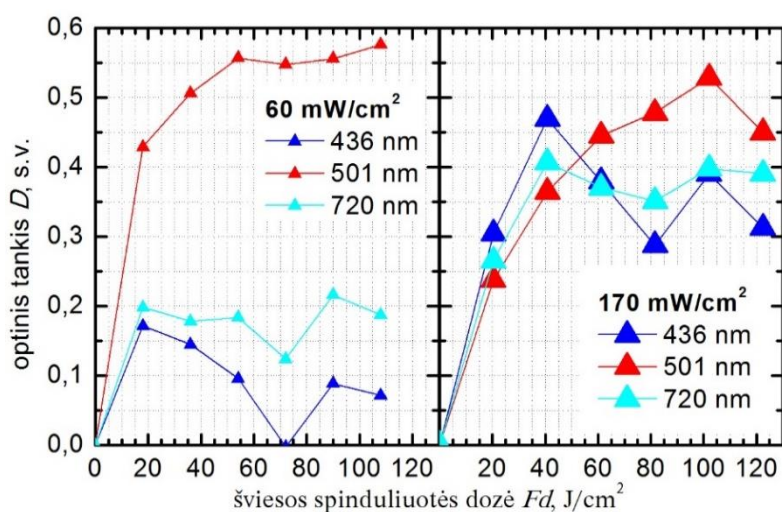
10 pav. Skirtingą laiką, skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais švitintų hematoporfirino kalio fosfatinių buferinių tirpalų bandinių sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai. a – buferio pH=7, koncentracija $C=50\text{ mM}$, b – buferio pH=5, koncentracija $C=10\text{ mM}$. Bandiniai švitinti 60 mW/cm^2 ir * nurodytą laiką 170 mW/cm^2 intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. $C[\text{HP}]=7,5 \times 10^{-5}\text{ M}$



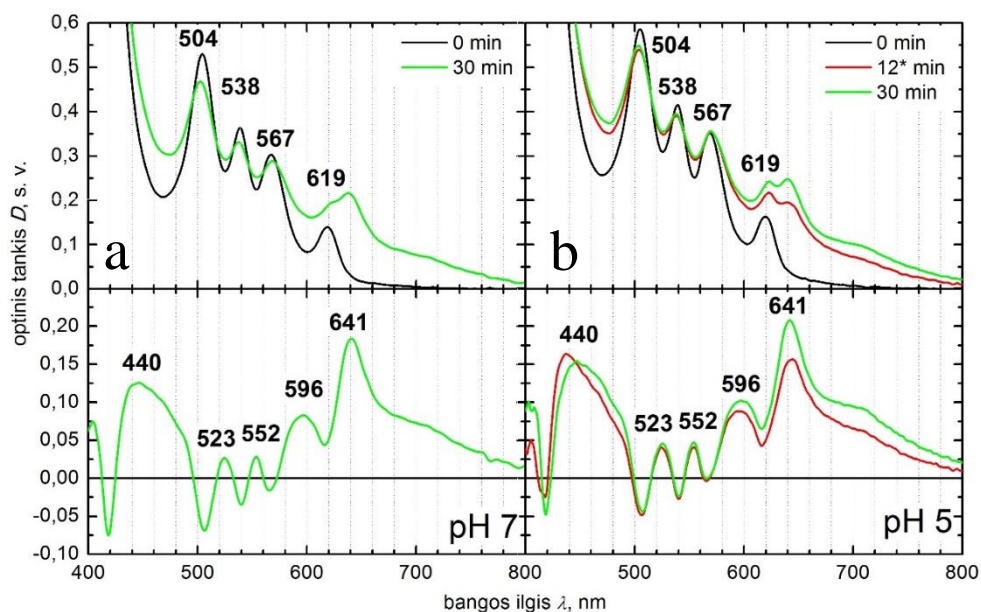
11 pav. Hematoporfirino kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH=7, $C=50\text{ mM}$) (kairėje) ir kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH=5, $C=10\text{ mM}$) (dešinėje) skirtuminių spektrų, normuotų į pradinio sugerties spektro $\lambda=532\text{ nm}$ optinio tankio vertę, smalių ties 636 nm optinio tankio kitimo kinetikos švitinimo metu. Švitinta skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais, 60 ir 170 mW/cm^2



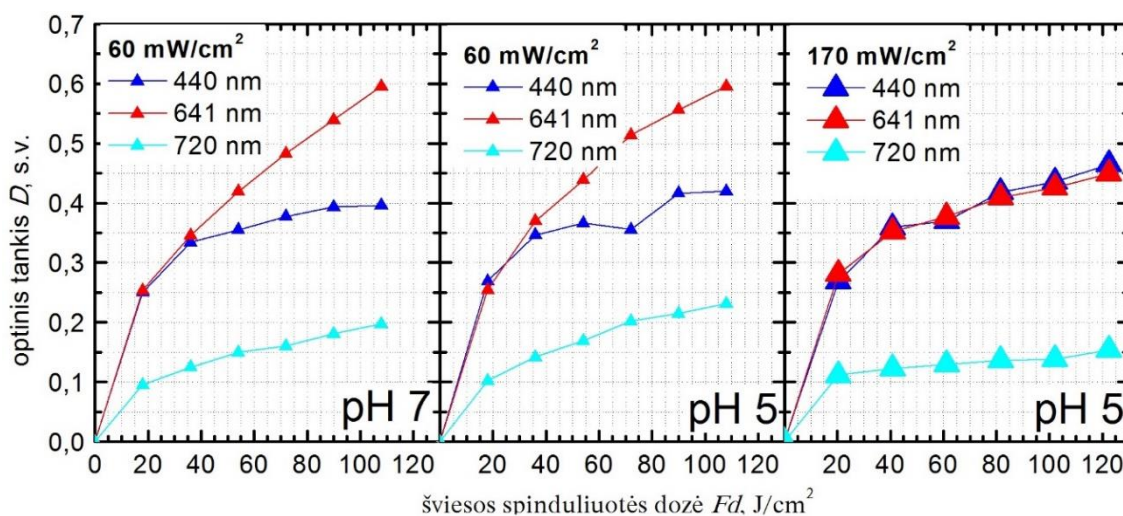
12 pav. Skirtingą laiką, skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais švitintų hematoporfirino kalio fosfatinių buferinių tirpalų bandinių su askorbo rūgštimi sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai. a – buferio pH= 7, koncentracija $C= 50$ mM, b – buferio pH= 5, koncentracija $C= 10$ mM. Bandiniai švitinti 60 mW/cm² ir * nurodytą laiką 170 mW/cm² intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. $C[HP]= 7,5 \times 10^{-5}$ M, $C[AR]= 5 \times 10^{-3}$ M



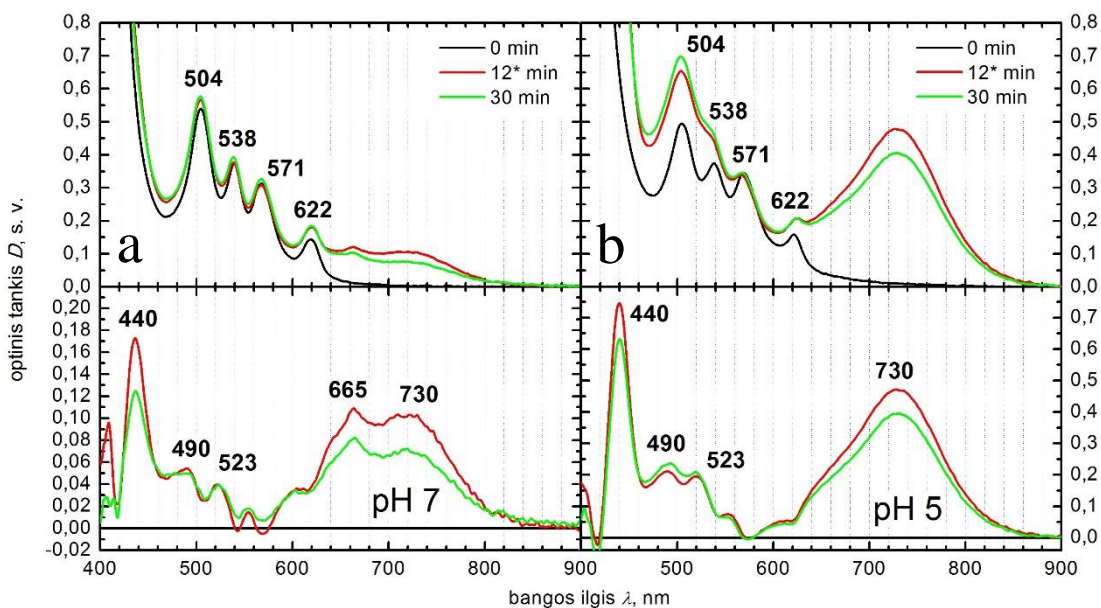
13 pav. Hematoporfirino su askorbo rūgštimi kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH= 7, $C= 50$ mM) skirtuminių spektrų, normuotų į pradinio sugerties spektro $\lambda= 532$ nm optinio tankio vertę, smailių ties nurodytais bangos ilgiais kitimo kinetikos švitinimo metu. Švitinta 60 mW/cm² lazerio spinduliuotės intensyvumu (kairėje) ir 170 mW/cm² (dešinėje)



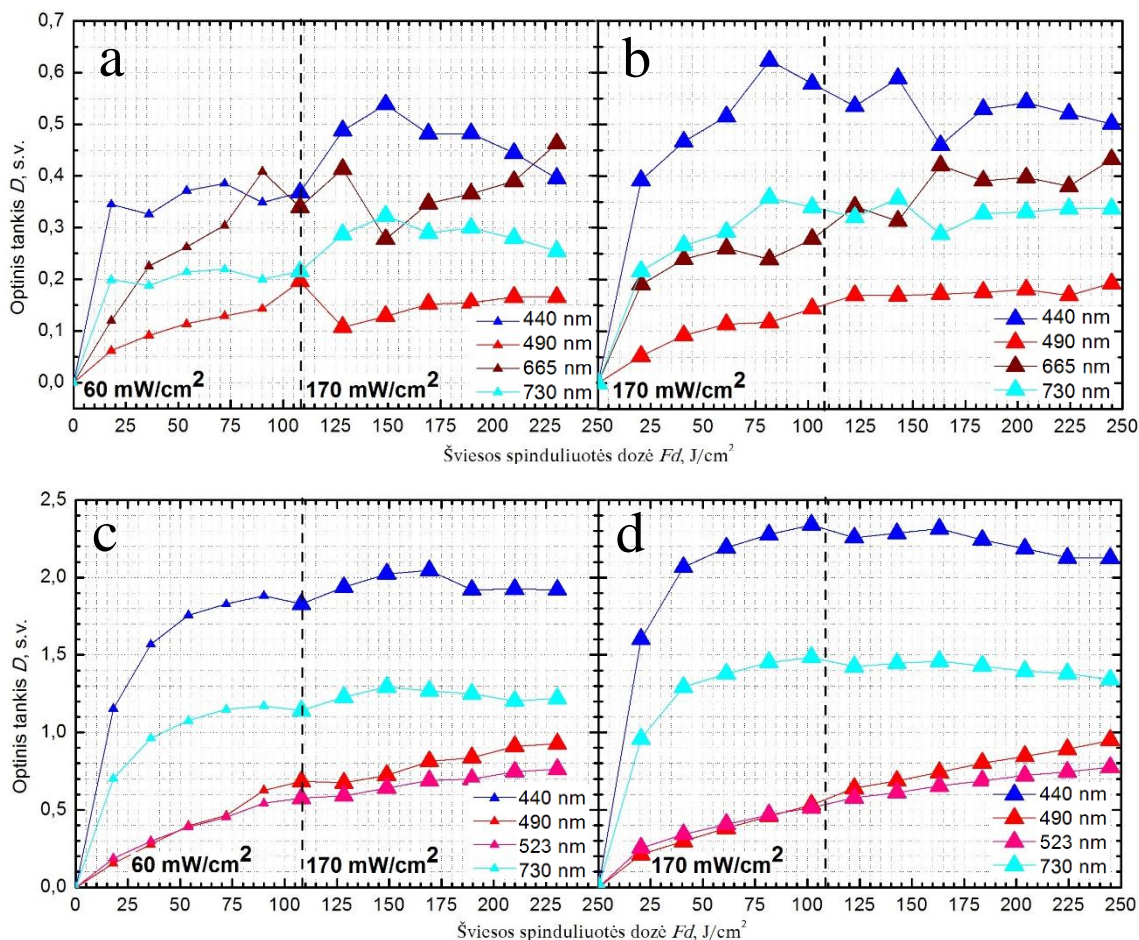
14 pav. Skirtingą laiką, skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais švitintų hematoporfirino kalio fosfatinių buferinių tirpalų bandinių su BSA sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai. a – buferio pH= 7, koncentracija C= 50 mM, b – buferio pH= 5, koncentracija C= 10 mM. Bandiniai švitinti 60 mW/cm^2 ir * nurodytą laiką 170 mW/cm^2 intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse, $C[\text{HP}] = C[\text{BSA}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$



15 pav. Hematoporfirino su BSA kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH= 7, C= 50 mM) (kairėje) ir kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH= 5, C= 10 mM) (viduryje ir dešinėje) skirtuminių spektrų smailių ties nurodytais bangos ilgiais kitimo kinetikos švitinimo metu. Švitinta skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais, 60 ir 170 mW/cm^2



16 pav. Skirtingą laiką, skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais švitintų hematoporfirino fosfatinių buferinių tirpalų bandinių su BSA ir askorbo rūgštimi sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai. a – buferio pH= 7, koncentracija $C= 50$ mM, b – buferio pH= 5, koncentracija $C= 10$ mM. Bandiniai švitinti 60 mW/cm² ir * nurodytą laiką 170 mW/cm² intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse, $C[\text{HP}]= C[\text{BSA}]= 7,5 \times 10^{-5}$ M, $C[\text{AR}]= 5 \times 10^{-3}$ M



17 pav. Hematoporfirino su BSA ir askorbo rūgštimi kalio fosfatiniame buferiniame tirpale sugerties skirtuminių spektrų, normuotų į pradinio sugerties spektro $\lambda=532$ nm optinio tankio vertę, smailių optinio tankio kitimo kinetikos ties nurodytais bangos ilgiais. a ir b kinetikos – buferio pH= 7, koncentracija C= 50 mM, c ir d kinetikos – buferio pH= 5, koncentracija C= 10 mM. Švitinta skirtingais lazerio spinduliuotės intensyvumais, 60 ir 170 mW/cm². - - - linija nurodo spinduliuotės intensyvumo pokytį

Aukščiau pateikti pradiniai bei galutiniai sugerties spektrai švitinant skirtingais intensyvumais, sugerties skirtuminiai spektrai bei jų smailių optinio tankio kitimo kinetikos. Jose pateikiamos smailių optinio tankio vertės po kiekvieno švitinimo intervalo: švitinant 60 mW/cm² lazerio spinduliuotės intensyvumu, sugerties spektrai buvo registruojami kas 5 min, švitinant 170 mW/cm² – kas 2 min.

Švitinant neutralaus pH hematoporfirino tirpalą (10 pav., a) spektro optinio tankio vertės mažėja srityje 500-600 nm. Matomas naujos sugerties juostos augimas ties 636 nm bei į ilgabangę spektro pusę nusidriekęs jos petys. Taip pat iš skirtuminio sugerties spektro matyti, jog atsiranda nauja smailė ties 493 nm.

pH=5 (10 pav., b) bandinio spektre matyti, jog Q2 ir Q3 juostų optinio tankis padidėjęs. Q1 juosta neutralaus pH bandinyje yra labiau pasislinkusi į raudonąją spektro pusę.

pH= 7 bandinyje (10 pav., a) smailė buvusi ties 493 nm, rūgštiniame pH yra 4 nm pasislinkusi į ilgabangę pusę, o smailė ties 636 nm yra daug mažesnio intensyvumo, nei neutraliame pH.

11 pav. pateiktos sugerties skirtuminių spektrų smailių optinio tankio kitimo kinetikos, gaunamos ties pasirinktu bangos ilgiu po kiekvieno švitinimo intervalo spektre išskiriant smailės optinio tankio vertę bei padalinant ją iš pradinio spektro optinio tankio ties švitinimo bangos ilgiu – 532 nm. Švitinimo trukmė išreiškiama doze naudojantis formule: $Fd = It$, kur Fd – šviesos dozė, I – intensyvumas, t – švitinimo trukmė. Jose matyti, jog $\lambda = 636$ nm smailės augimas tiesiškai proporcingas švitinimo dozei. pH 5 bandinyje juosta augo vienodai, nepriklausomai nuo lazerio spinduliuotės intensyvumo, tuo tarpu neutralaus pH bandinyje, švitinant didesniu intensyvumu (11 pav., dešinėje), bet esant tai pačiai spinduliuotės dozei, juosta pasiekė didesnes optinio tankio vertes.

Hematoporfirino pH= 7 fosfatinio buferinio tirpalo bandinio su askorbo rūgštimi spektre (12 pav., a) Q juostų padėtys sutampa su jų padėtimis bandinyje be askorbo rūgšties (10 pav., a). Matomas nežymus jų blukimas srityje 540-600 nm. Sugerties skirtuminiame spektre atsirado naujos smailės 437, 501 ir 535 nm, bei plati juosta – plato – 620-800 nm srityje su maksimumu ties 720 nm, kurios optinio tankio vertė švitinant dideliu intensyvumu yra didesnė.

12 pav., b paveikslėlyje pateikiamas hematoporfirino pH= 5 fosfatinio buferinio tirpalo su askorbo rūgštimi spektras. Matyti, kad rūgštiniame pH sugerties spektruose vyrauja sklaida, todėl sunku kiekybiškai vertinti šiuos spektrus. Smailės Q4 ir Q3 yra pasislinkusios arčiau viena kitos, Q2 ir Q1 smailės yra paslinktos į ilgabangę pusę, o plato raudonojoje spektro srityje nėra matoma.

13 pav. pateikiamos neutralaus pH bandinių smailių kinetikos. Matyti, jog švitinant mažu intensyvumu (13 pav., kairėje) smailės $\lambda = 501$ nm augimas yra labai staigus, jau po pirmojo švitinimo intervalo pasiekiami 75 % maksimalios optinio tankio vertės, o nuo $Fd = 60$ J/cm² įsivyrauja sotis. Tuo tarpu smailių ties 436 ir 720 nm kinetinių kreivių forma sutampa, po pirmojo švitinimo intervalo matomas staigus jų pakilimas, vėliau, kur smailė $\lambda = 501$ nm ir toliau auga, šių optinio tankio vertės mažėja, o didėti pradeda, tik sumažėjus smailės ties 501 nm optiniam tankiui, po $Fd = 72$ J/cm².

Švitinant bandinius dideliu lazerio spinduliuotės intensyvumu (13 pav., dešinėje) smailės $\lambda = 436$ ir 720 nm auga daug sparčiau, nei švitinant mažu intensyvumu (13 pav., kairėje). Taip pat smailės ties 501 nm optinis tankis šiomis sąlygomis auga lėčiau. Čia taip pat išvelgiama atvirkštinė koreliacija tarp smailės atitinkančių kreivių. 436 ir 720 nm optinio tankio vertėms ėmus mažėti, didėja $\lambda = 501$ nm vertė, o po paskutinio švitinimo intervalo visos smailės šiek tiek nubluo.

Į neutralaus pH hematoporfirino fosfatinį buferinį tirpalą įdėjus BSA (14 pav., a), matomas bandinio optinio tankio padidėjimas. Q1 juosta 3 nm pasislinko į raudonąją spektro pusę. Švitinimo metu blunkant Q juostoms mažėja santykiai tarp spektro minimumų ir maksimumų, kitaip tariant – spektras plokštėja. Q1 juostos optinio tankio vertė švitinimo metu didėja, nes yra keliama šalia

augančios naujos juostos su smaile ties 641 nm. Sugerties skirtuminiame spektre matoma besiformuojanti plati juosta 400-500 nm srityje su maksimumu ties 440 nm, bei kelios nedidelio optinio tankio smailės ties 523, 552 ir 596 nm.

Lyginant skirtingo pH bandinius, matyti, kad tiek pradiniai spektrai, tiek spektrai po švitinimo sutampa, Q juostų padėtys vienodos abejuose bandinio pH. Rūgštiniame pH (14 pav. b) matyti, jog smailė ties 641 nm švitinant dideliu intensyvumu pasiekia mažesnę optinio tankio vertę.

Lyginant sugerties skirtuminių spektrų smailių augimo kinetikas (15 pav.) matyti, jog švitinant mažu intensyvumu, nepriklausomai nuo pH, kreivių formos, ir pasiekiamos optinio tankio vertės sutampa. Kinetikose abejuose pH $\lambda = 641$ nm smailę atitinkančių kreivių formos sutampa. Tačiau švitinant dideliu lazerio spinduliuotės intensyvumu (15 pav., dešinėje), rūgštiniame pH matyti, jog pastarosios augimas yra lėtesnis ir pasiekama 75% optinio tankio vertės, lyginant su švitinimu mažu intensyvumu. Tuo tarpų kitų dviejų kreivių lazerio spinduliuotės intensyvumas smarkiai nepaveikė.

Hematoporfirino fosfatinio buferinio tirpalo bandinio su BSA ir askorbo rūgštimi spektre (16 pav.) lyginant su bandiniu su BSA, bet be askorbo rūgšties (14 pav., a), matyti, jog pradiniai spektrai (juodi) panašūs, tik Q2 ir Q1 juostos kelis nm paslinktos į ilgabangę spektro pusę.

Po švitinimo neutralaus pH bandinio sugerties skirtuminiame spektre (16 pav., a) matoma ryški nauja smailė ties 440 nm, taip pat smailė ties 523 nm, būdinga bandiniui tik su BSA (14 pav., a) bei smailė ties 490 nm, būdinga gryno hematoporfirino bandiniui (10 pav., a). 620-800 nm srityje matomas didelio optinio tankio plato su maksimumu ties 730 nm, bei nauja smailė ties 665 nm.

Rūgštinio pH bandinyje (16 pav., b) matyti, jog Q2 juostos optinio tankio vertė yra padidėjusi, lyginant su neutralaus pH bandiniu, tačiau Q juostų padėtys sutampa. Po švitinimo šio bandinio sugerties skirtuminiame spektre matomos tos pačios juostos, kaip ir neutralaus pH bandinyje, tačiau šio bandine spektre juosta su smaile ties 440 nm ir ilgabangis plato yra kelis kartus padidėję, taip pat nebėra smailės ties 665 nm.

17 pav., a ir b pateiktose smailių optinio tankio kitimo kinetikose matyti, jog kreivių, atitinkančių bangos ilgius $\lambda = 440$ ir 730 nm formos vienodos, skiriasi optinio tankio vertės, tačiau augimo sparta santykinai vienoda. Kreivėms atitinkančioms smailių ties 490 ir 665 nm augimą būdingi tie patys panašumai. Rūgštinio pH bandiniuose (17 pav., c ir d) tokia pati koreliacija būdinga smailėms ties 440 ir 730 nm bei smailėms ties 490 ir 523 nm.

Švitinant mažu intensyvumu neutralaus pH bandinį (17 pav., a) smailių ties 440 ir 730 nm optinio tankio vertės jau po pirmojo švitinimo intervalo nusistovi ir toliau švitinant nežymiai svyruoja apie $D = 0,35$ ir $0,2$ s.v. Tuo tarpu kreivės 490 ir 665 nm švitinant auga, ir didžiausias augimo šuolis matomas vietoje, kur sumažėja pirmųjų kreivių intensyvumai. Padidinus lazerio spinduliuotės

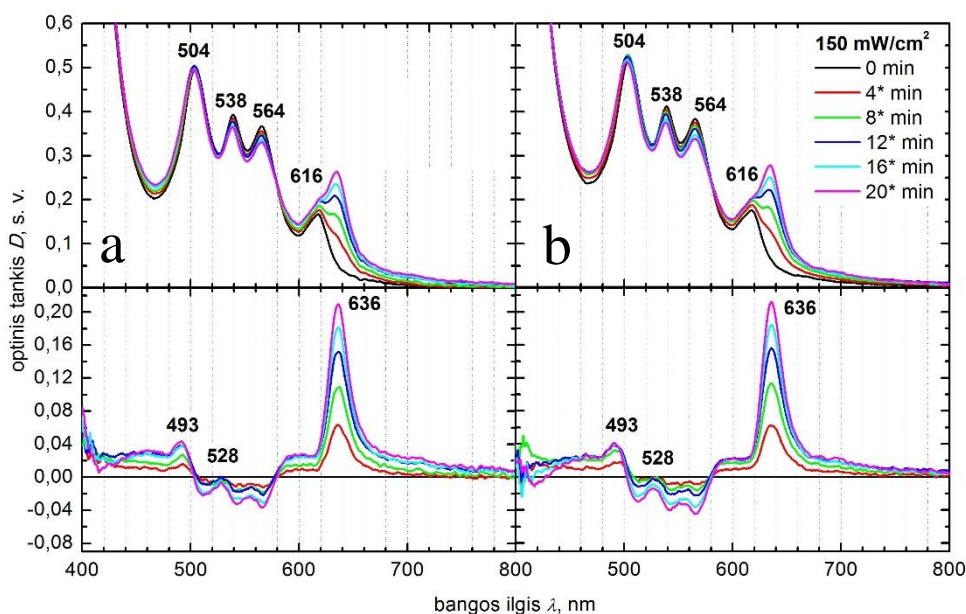
intensyvumą, nuo $Fd= 108 \text{ J/cm}^2$, šių smailių optinio tankio vertės mažėja, o smailių ties 440 ir 730 nm ima didėti. Toliau švitinant pastarosios ima leistis, o smailių 490 ir 665 nm intensyvumas didėja.

Švitinant dideliu intensyvumu (17 pav., b) smailės $\lambda= 490$ ir 665 nm auga lėčiau. Smailių 440 ir 730 nm augimas daug spartesnis, pasiekiamos didesnės optinio tankio vertės, o toliau švitinant šių smailių optinio tankio vertės nusistovi ir ima nežymiai svyruoti apie tam tikrą vertę. Tuo tarpu smailių 490 ir 665 nm kreivės lėtai kyla.

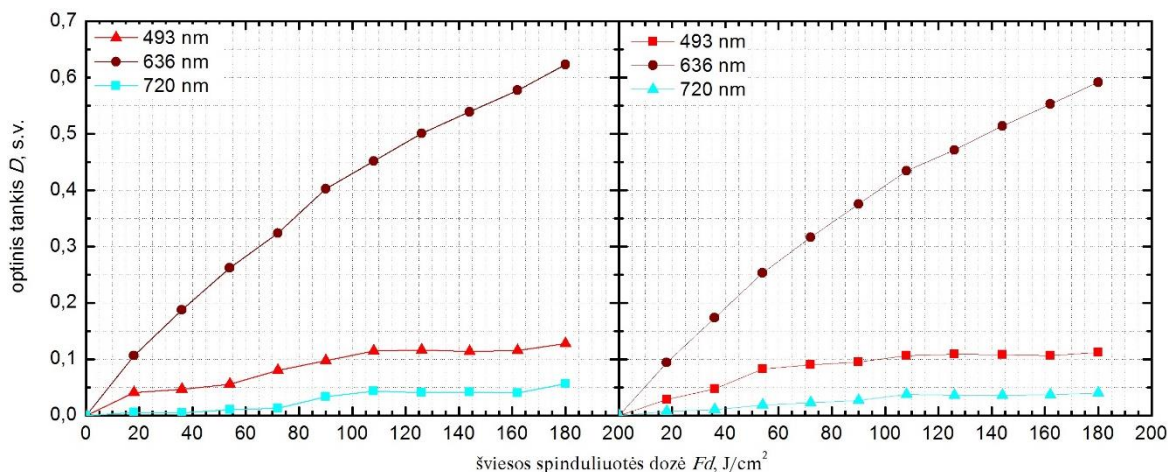
Rūgštinio pH bandinyje (17 pav., c ir d), lyginant skirtingus lazerio spinduliuotės intensyvumus, matyti, jog smailių ties 490 ir 523 nm augimas vienodas, nepriklausomai nuo lazerio spinduliuotės intensyvumo, tačiau švitinant mažu intensyvumu (17 pav., c) kreivių, atitinkančių smailės ties 440 ir 730 nm augimas lėtesnis, nei švitinant dideliu intensyvumu. Padidinus intensyvumą, jų optinio tankio vertė šokteli aukštyn vėliau nusistovi apie tam tikrą optinio tankio vertę. Bandinį švitinant dideliu intensyvumu (17 pav., d) šių smailių optinis tankis D pasiekia $\sim 20\%$ didesnę vertę ir maždaug nuo $Fd= 80 \text{ J/cm}^2$ intensyvumo ima svyruoti apie šią D reikšmę.

3.2 Vandensilio peroksido (H_2O_2) poveikis

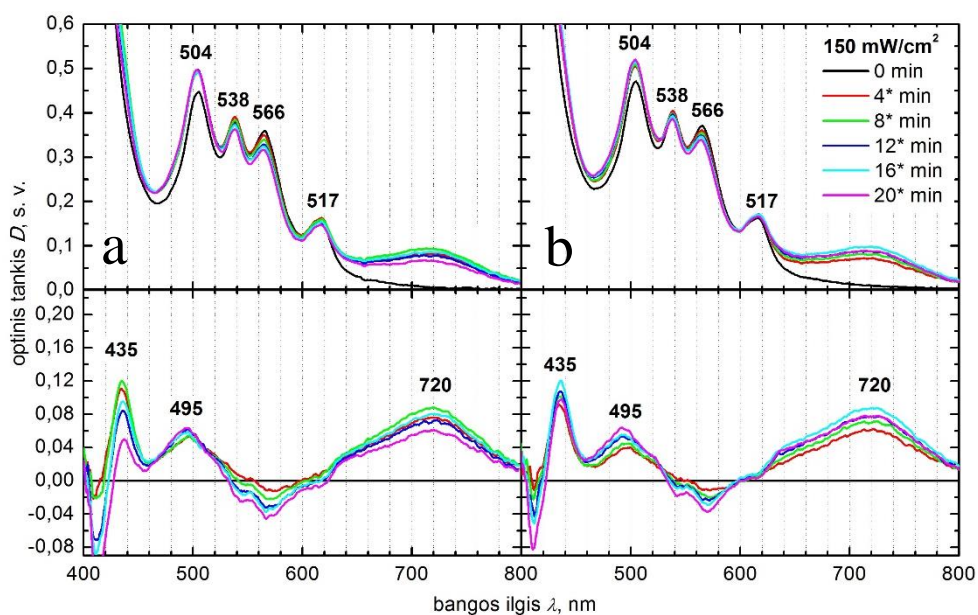
Žemiau pateikiami hematoporfirino ir hematoporfirino su askorbo rūgštimi, be ir su pridėtu vandensilio peroksidu tirpalų bandinių sugerties ir sugerties skirtuminiai spektrai bei sugerties skirtuminių spektrų smailių optinio tankio kitimo kinetikos.



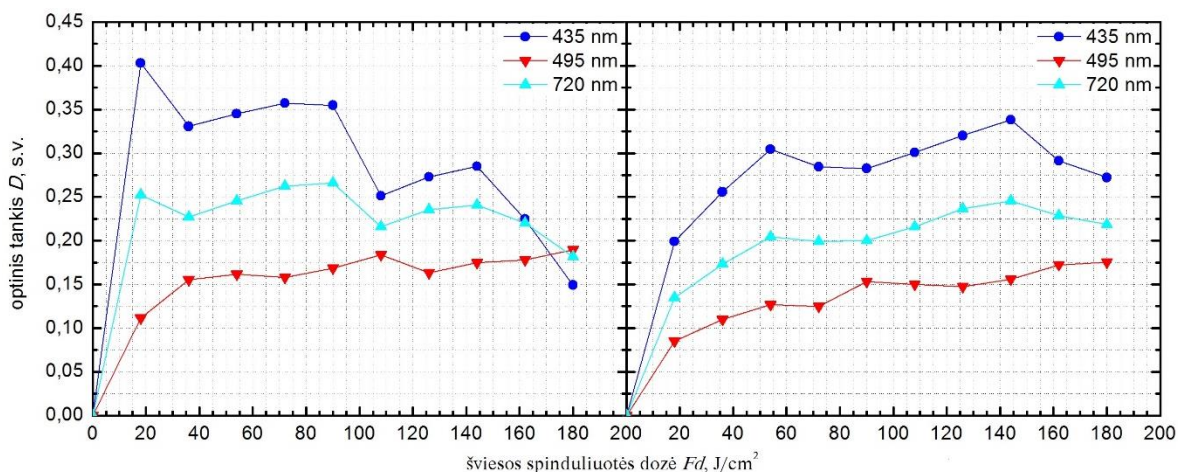
18 pav. Hematoporfirino – a ir hematoporfirino su H_2O_2 – b fosfatinių buferinių tirpalų sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai. Švitinta nurodytą laiką 150 mW/cm^2 lazerio spinduliuotės intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. $C[\text{HP}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, buferio koncentracija $C= 50 \text{ mM}$, $\text{pH}= 7$



19 pav. Hematoporfirino (kairėje) ir hematoporfirino su H₂O₂ (dešinėje) fosfatinių buferinių tirpalų sugerties skirtuminių spektrų, normuotų į pradinio sugerties spektro $\lambda = 532$ nm optinio tankio vertę, smalių optinio tankio kitimo kinetikos švitinimo metu ties nurodytais bangos ilgiais. Švitinta 150 mW/cm² intensyvumu. $C[\text{HP}] = 7,5 \times 10^{-5}$ M, $C[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \times 10^{-3}$ M, pH= 7



20 pav. Hematoporfirino su askorbo rūgštimi – a ir hematoporfirino su H₂O₂ ir askorbo rūgštimi – b fosfatinių buferinių tirpalų sugerties ir sugerties skirtuminiai (apačioje) spektrai.. Švitinta nurodytą laiką 150 mW/cm² lazerio spinduliutės intensyvumu, registruota 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. $C[\text{HP}] = 7,5 \times 10^{-5}$ M, $C[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \times 10^{-3}$ M, $C[\text{AR}] = 10^{-2}$ M, buferio koncentracija $C = 50$ mM, pH= 7



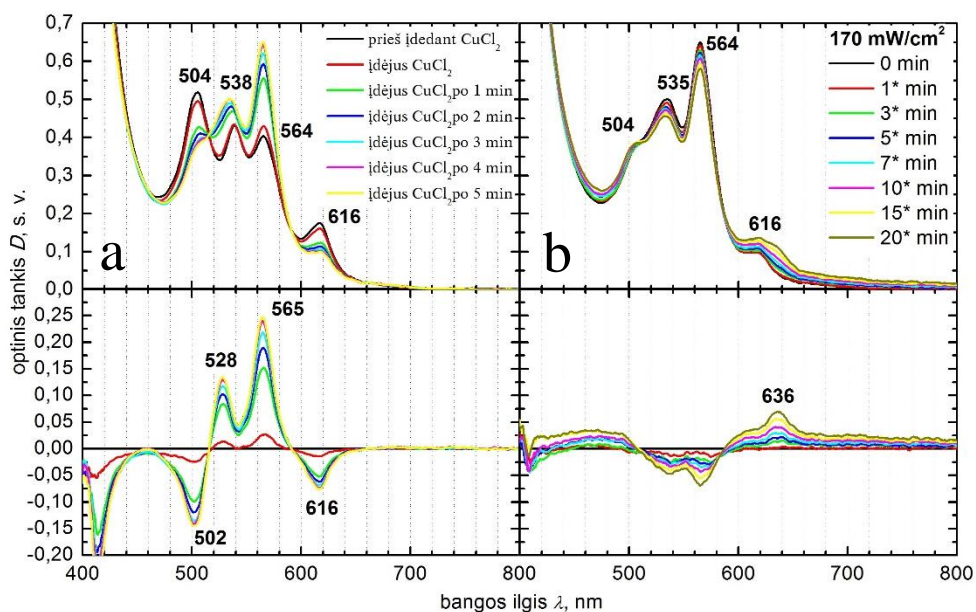
21 pav. Hematoporfirino su askorbo rūgštimi (kairėje) ir hematoporfirino su H_2O_2 ir askorbo rūgštimi (dešinėje) fosfatinų buferinių tirpalų sugerties skirtuminių spektrų, normuotų į pradinio sugerties spektro $\lambda = 532$ nm optinio tankio vertę, smalių optinio tankio kitimo kinetikos švitinimo metu ties nurodytais bangos ilgiais. Švitinta 150 mW/cm^2 intensyvumu. $C[HP] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C[H_2O_2] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $C[AR] = 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 7$

18 pav. pateikiami hematoporfirino neutraliame fosfatiname buferiniame tirpale sugerties ir sugerties skirtuminiai spektrai su vandenilio peroksido ir be jo. Pradinių spektrų smalių padėtys sutampa abėjuose spektruose. Švitinimo metu atsiranda tos pačios naujos smailės, matomos ir 10 pav., ties 636 nm ir ties 493 nm. Naujų spektro smalių optinio tankio kitimo kinetikose (19 pav.) matyti, jog visų kreivių elgsena vienoda, nepriklausomai nuo to ar bandinyje yra H_2O_2 . Kreivės, atitinkančios smailę ties 720 nm, elgsena sutampa su kitų 19 pav. pateiktų smalių kinetikomis.

Hematoporfirino su askorbo rūgštimi bandinyje, prieš pridėdant H_2O_2 (20 pav., a) švitinimo metu atsirandantys spektriniai pokyčiai sutampa su matomais 12 pav., a. Sugerties skirtuminiuose spektruose matomos tos pačios naujos juostos ties 435, 495 ir 720 nm. Prieš švitinimą į bandinį pridėjus vandenilio peroksido H_2O_2 (20 pav., b), pradinis spektras (juodas) nepatiko tačiau švitinimo matyti, jog juostos su smaile 720 nm optinio tankio augimas lėtesnis. Tai matoma ir sugerties skirtuminių spektrų smalių optinio tankio augimo kinetikose 21 pav. Bandinyje be H_2O_2 (21 pav., a) smalių ties 436 ir 720 nm optinis tankis pasiekia maksimalias vertes jau po pirmojo švitinimo intervalo, tuo tarpu bandinyje su vandenilio peroksidu, (21 pav., b) kreivės kinetikose kyla lėčiau.

3.3 Vario chlorido ($CuCl_2$) poveikis

Pateikiami hematoporfirino fosfatinio buferinio tirpalo bandinių su vario chloridu ($CuCl_2$) sugerties ir sugerties skirtuminiai spektrai.

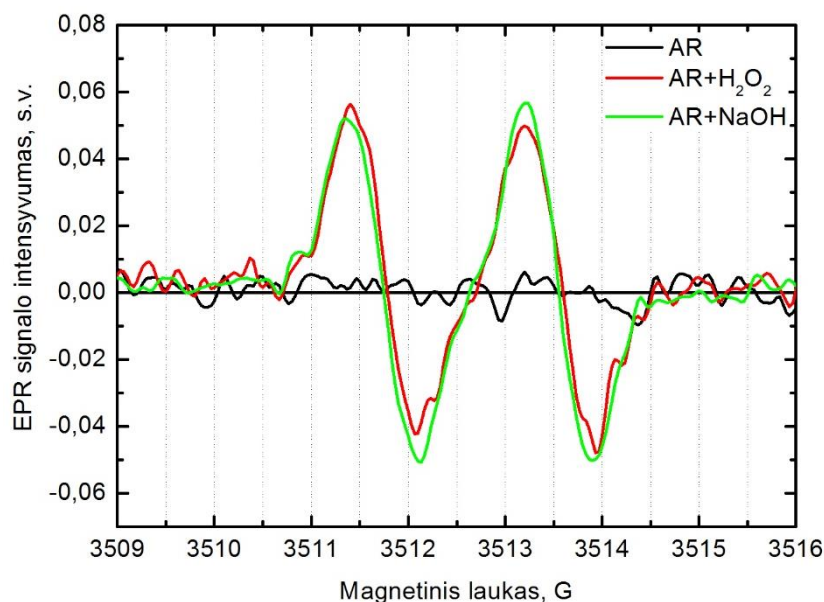


22 pav. Hematoporfirino fosfatinių buferinių tirpalų bandinių sugerties ir sugerties skirtuminiai spektrai. a – pridėjus CuCl_2 nešvitinant, b – tas pats bandinys švitinamas praėjus 5 min po CuCl_2 pridėjimo. Švitinta nurodytą laiką 170 mW/cm^2 lazerio spinduliuotės intensyvumu. Registruojama 10 mm storio kvarcinėse kiuvetėse. $C[\text{HP}] = C[\text{CuCl}_2] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, buferio koncentracija $C = 50 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$

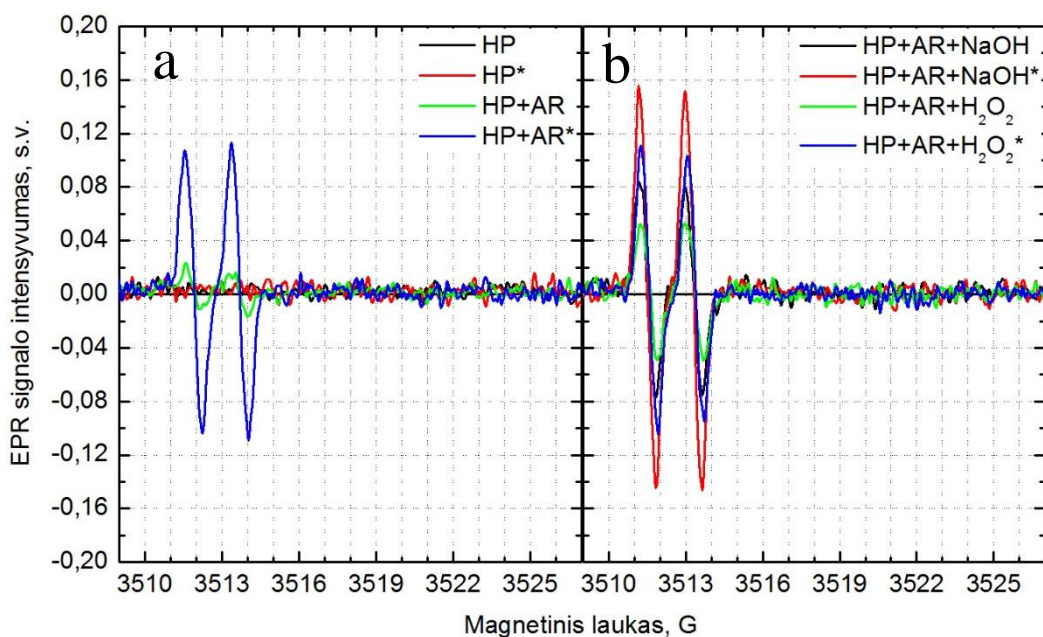
Į bandinius prieš švitinimą buvo pridėta vario (II) chlorido CuCl_2 , kurio koncentracija bandinyje lygi hematoporfirino koncentracijai. Nešvitinant bandinio kas 1 min registruoti spektrai (22 pav., a) rodo, jog nyksta Q4 ir Q1 juostos, smarkiai išauga Q2 ties 564 nm optinio tankio vertė. Q3 juostos sugertis taip pat auga ir slenka į trumpabangę spektro pusę, kol atsiduria ties $\sim 535 \text{ nm}$. praėjus 5 min po CuCl_2 pridėjimo, sugerties skirtuminiame spektre juostos ties 502 ir 616 nm nubluko. Švitinant šį bandinį (22 pav., b), sugerties skirtuminiame spektre matomas juostų blukimas srityje 600-600 nm, bei smailės, atsirandančios švitinant hematoporfiriną fosfatiniame buferiniame tirpale (10 pav.), augimas ties 636 nm, tačiau šio bandinio spektre juostos intensyvumas mažesnis.

3.4 Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrometrija

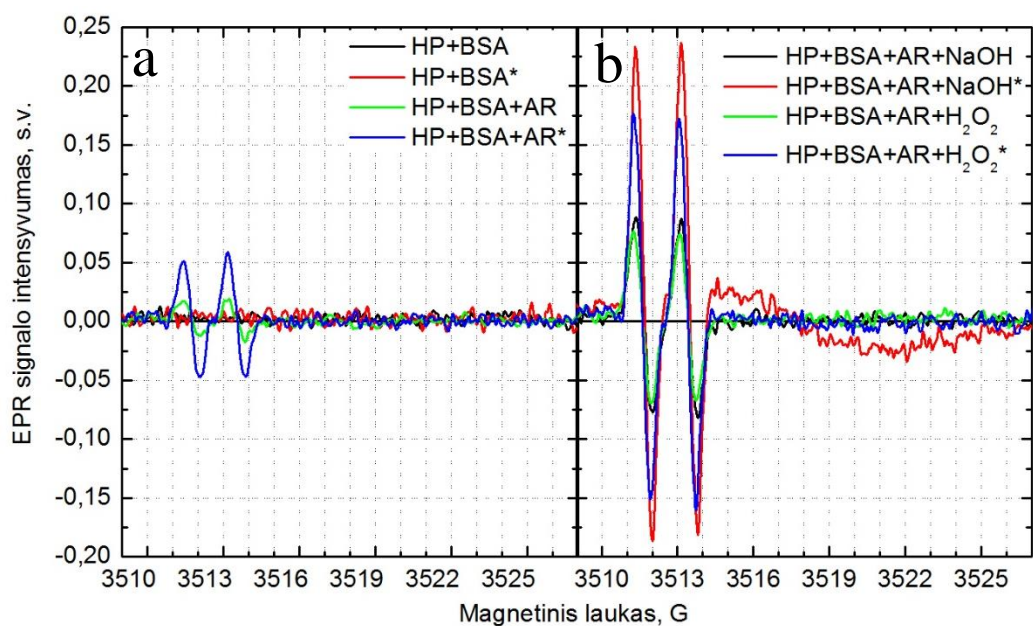
Buvo išmatuoti hematoporfirino fosfatinių buferinių tirpalų bandinių EPR spektrai. Bandinių spektrai buvo matuojami juos švitinant skirtingo intensyvumo diodu kaupinamo $\lambda = 532 \text{ nm}$ kieto kūno lazerio spinduliuote. Lazerio spinduliuotė į bandinį rezonatoriuje buvo nukreipiama šviesolaidžiu, kuris įtvirtinamas specialiu laikikliu rezonatoriaus apačioje esančioje angoje. Šioje eksperimento dalyje naudojamos medžiagų koncentracijos: $C[\text{HP}] = C[\text{BSA}] = 10^{-4} \text{ M}$, $C[\text{AR}] = C[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-2} \text{ M}$, $C[\text{NaOH}] = 4 \times 10^{-2} \text{ M}$. Spektrometro darbinis dažnis $\nu = 9,75 \text{ GHz}$, registruojant spektrus buvo naudota 0,8 G moduliacijos amplitudė ir 17 dB slopinimas. Siekiant sumažinti triukšmus, spektrai buvo kaupti po 5 kartus.



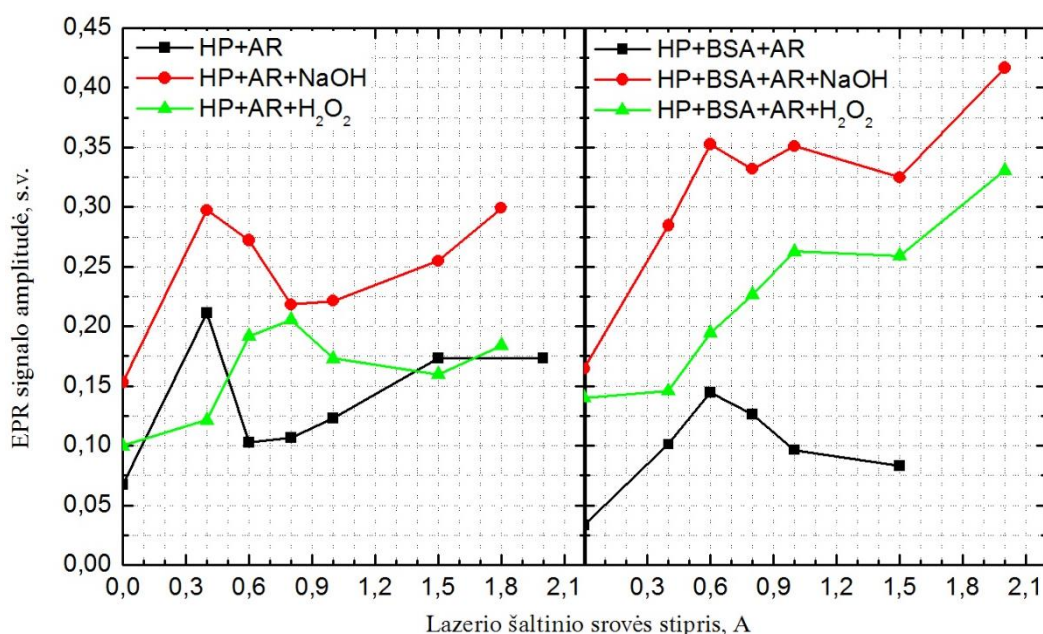
23 pav. Askorbo rūgšties fosfatinių buferinių tirpalų bandinių EPR spektrai. $C[\text{AR}] = C[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-2} \text{ M}$, $C[\text{NaOH}] = 4 \times 10^{-2} \text{ M}$, buferio koncentracija $C = 50 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$. Spektrai užregistruoti bandinių nešvitinant, kaupta 5 kartus



24 pav. Hematoporfirino fosfatinių buferinių tirpalų EPR spektrai tamsoje ir švitinant bandinius*. Pateikiami pradiniai ir didžiausio juostų intensyvumo spektrai. a – grynas hematoporfirinas ir su askorbo rūgštimi, b – hematoporfirinas su askorbo rūgštimi ir NaOH, bei hematoporfirinas su askorbo rūgštimi ir H_2O_2 . $C[\text{HP}] = 10^{-4} \text{ M}$, $C[\text{AR}] = C[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-2} \text{ M}$, $C[\text{NaOH}] = 4 \times 10^{-2} \text{ M}$, buferio koncentracija $C = 50 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$, kaupta 5 kartus



25 pav. Hematoporfirino su BSA fosfatinių buferinių tirpalų EPR spektrai tamsoje ir švitinant bandinius*. Pateikiami pradiniai ir didžiausio juostų intensyvumo spektrai. a – hematoporfirinas su BSA ir su BSA bei askorbo rūgštimi, b – hematoporfirinas su BSA, askorbo rūgštimi ir NaOH, bei hematoporfirinas su BSA, askorbo rūgštimi ir H₂O₂. C[HP]= C[BSA]= 10⁻⁴ M, C[AR]= C[H₂O₂]= 10⁻² M, C[NaOH]= 4×10⁻² M, buferio koncentracija C= 50 mM, pH= 7, kaupta 5 kartus



26 pav. Hematoporfirino fosfatinių buferinių tirpalų EPR spektrų juostų amplitudės kitimas, keičiant lazerio šaltinio srovę. Kairėje – hematoporfirinas su askorbo rūgštimi ir NaOH arba H₂O₂, dešinėje – hematoporfirinas su BSA bei askorbo rūgštimi ir NaOH arba H₂O₂

Pamatus askorbo rūgšties fosfatinio buferinio tirpalo EPR spektrą (23 pav.) matomi tik triukšmai, tačiau bandiniuose su NaOH arba H₂O₂ atsiranda 4 G pločio dubletinė juosta srityje 3510,5-3514,5 G, kurios intensyvumas abejuose bandiniuose sutampa ir yra ~0,05 s.v.

24 pav., a pateiktame gryno hematoporfirino tirpalo spektre naujų juostų neatsiranda nei tamsoje, nei švitinant bandinį, tuo tarpu pridėjus askorbo rūgšties, jau prieš švitinimą atsiranda nedidelio intensyvumo juosta, matoma ir 23 pav. Pašvitinus bandinį juostos intensyvumas padidėjo apie 5 kartus. Į hematoporfirino bandinį įdėjus NaOH (24 pav., b) juostos srityje 3510,5-3514,5 G intensyvumas smarkiai padidėjo dar tamsoje, o pašvitinus bandinį (ties 0,6 A lazerio šaltinio srovės stipriu) padvigubėjo. Į hematoporfirino tirpalą su askorbo rūgštimi pridėjus H₂O₂, juostos intensyvumas, lyginant su bandiniu be vandenilio peroksido (24 pav., a), tapo apie keturis kartus didesnis. Pašvitinus bandinį maksimalus juostos intensyvumas tapo dvigubai didesnis, nei prieš švitinimą.

Pagamins tokius pat bandinius, tačiau į kiekvieną jų pridėjus hematoporfirinui lygią BSA koncentraciją, matome, jog hematoporfirino bandinyje su BSA (25 pav., a) jokios juostos neatsirado. Pridėjus askorbo rūgšties, ankstesniuose EPR spektruose atsirandanti juosta bandinio spektre stebėta jau nešvitinant bandinio. Pašvitinus, jos intensyvumas padidėjo apie 2,5 karto, tačiau buvo mažesnis, nei bandinio be BSA spektre (24 pav., a). Papildomai pridėjus NaOH arba H₂O₂, tamsoje (25 pav., b) juostų intensyvumai sutapo ir buvo apie 0,08 s.v. Pašvitinus hematoporfirino bandinį su BSA, askorbo rūgštimi ir H₂O₂, juostos intensyvumas padvigubėjo. Bandinio, kuriame vietoje H₂O₂ pridėta NaOH, EPR spektre (25 pav., b) juostos srityje 3510,5-3514,5 G maksimalus intensyvumas tapo trigubai didesnis ir atsirado ankstesnių bandinių EPR spektruose nesiformavusi „sigmoidė“ srityje 3510-3527 G, kertanti x = 0 ašį ties 3518 G.

26 pav., kairėje pateiktoje EPR spektro signalų amplitudžių priklausomybėje nuo lazerio spinduliuotės intensyvumo, matome jog bandiniuose su askorbo rūgštimi bei askorbo rūgštimi ir NaOH abiejų kreivių forma panaši. Abiejose maksimali EPR juostos signalo amplitudė srityje 3510,5-3514,5 G pasiekė maksimalią vertę vos pašvitinus bandinį, tuomet krito ir (nuo 0,8 A) ėmė iš lėto kilti. Bandinyje su H₂O₂ juostos intensyvumo pokyčiai panašūs, tačiau maksimali signalo amplitudė buvo pasiekta ties didesniu lazerio spinduliuotės intensyvumu. Į bandinius pridėjus BSA (26 pav., dešinėje), pirmasis amplitudės kreivės pikas pasiekiamas švitinant didesniu intensyvumu (ties 0,6 A), nei bandinyje be BSA (26 pav., kairėje), stebimas lėtas amplitudės kritimas, o dar padidinus lazerio spinduliuotės intensyvumą (ties 1.5 A) amplitudė vėl ima didėti. Bandinyje su H₂O₂ amplitudės kreivės pikas, kaip ir bandinyje be BSA, pasiekiamas vėliau. Be to, bandiniuose su BSA maksimali signalo amplitudės vertė pasiekiamą ties didžiausiu pasirinktu lazerio spinduliuotės intensyvumu. Bandiniuose be H₂O₂, nepriklausomai, ar bandinyje yra BSA, amplitudžių kreivių pokyčiai (raudonų ir juodų) panašūs, – pridėjus NaOH visos amplitudės išauga keletą kartų.

4. Rezultatų aptarimas

4.1 pH ir lazerio spinduliuotės intensyvumo įtaka, rezultatų aptarimas

Švitinant hematoporfirino fosfatinį buferinį tirpalą (10 pav.) auganti smailė ties 636 nm, atitinka pirminių oksidacinių chlorino tipo fotoproduktų sugertį [72]. Šie fotoproduktai formuojami iš hematoporfirino H-tipo agregatų. Sužadintas į singuletinę būseną deguonis oksiduoja vieną iš dimero hematoporfirino molekulių, hidrindamas vieną konjuguotą jungtį [3]. Vykstant hematoporfirino monomerų oksidacijai formuojami bilirubino tipo fotoproduktai, kuriuose yra nutrauktas tetrapirolo ciklas, bei UV srityje sugeriantys mono- ir di- pirolai [73]. Klasikinė hematoporfirino fotovirsmų schema pateikiama 5 pav. Rūgštiniame pH šio tipo fotoproduktų formavimasis yra lėtesnis. Tokiame pH vyrauja didesnės hematoporfirino agregatų formos, todėl H-tipo agregatų, iš kurių formuojami chlorino tipo fotoproduktai, sumažėja [59].

Tai matoma ir smailių optinio tankio verčių kitimo kinetikose, švitinant rūgštinio pH bandinį (11 pav.), chlorino tipo fotoproduktų formavimasis lėtesnis, po švitinimo jų susiformuoja mažiau. Švitinant neutralaus pH bandinį dideliu intensyvumu (11 pav., dešinėje), fotosensibilizatoriaus molekulės sužadinamos sparčiau, intensyviau generuojamas singuletinis deguonis, todėl hematoporfirino molekulių autooksidacija ir fotoprodukto formavimasis suintensyvėja.

Į hematoporfirino fosfatinį buferinį tirpalą įdėjus askorbo rūgšties (12 pav.) fotovirsmų mechanizmas keičiasi. Askorbo rūgštis dėl savo redukuojančio poveikio neutralizuoja reaktyvias deguonies formas ir, slopindama oksidacijos reakcijas, apsaugo hematoporfirino molekulę nuo autooksidacijos [29]. Todėl 12 pav. pateiktame spektre matome, jog tokiomis sąlygomis chlorino tipo fotoproduktų ties 636 nm formavimasis yra labai sulėtėjęs. Smailė ties 501 nm – bilirubino tipo fotoprodukto, susidarančio oksiduojant hematoporfirino monomerus sugerties smailė [61].

Kinetikoje, pateiktoje 13 pav., matyti, jog smailių ties 436 ir 720 nm optinio tankio kitimo kreivių formos vienodos, dėl fono šiek tiek skiriasi jų intensyvumai. Šios smailės priklauso redukcijos reakcijų keliu susidarančiam florino tipo produktui. Nuo hematoporfirino jis skiriasi tuo, jog molekulės centre ne 2, o 3 iš keturių azoto atomų yra prisijungę protoną, taip pat vienoje iš *meso* padėčių yra nutraukta dviguba jungtis. Literatūroje pateikiamos jo smailių padėtys yra ties 440 ir 735 nm [63], beveik sutampa su šiame darbe tiriamų bandinių švitinimo metu atsirandančiomis florino tipo fotoprodukto smailėmis. Jei askorbo rūgšties koncentracija pakankamai didelė, singuletinio deguonies neutralizavimas gali vykti pakankamai sparčiai, kad išaugtų tikimybė askorbo rūgšties molekulei tiesiogiai sąveikauti su sužadinta hematoporfirino molekule. Tuomet sužadinta askorbo rūgšties molekulė gali redukuoti hematoporfirino molekules, taip formuojant floriną.

Pridėjus jaučio serumo albumino (BSA), spektruose (14 pav.) matomas optinio tankio padidėjimas atsiranda dėl baltymo ir hematoporfirino molekulių sąveikos. Baltymas sukimba su hematoporfirino molekule, todėl jo poveikis monomerizuojantis [66]. Optinį tankį išreiškia Lamberto Bugerio ir Bero dėsnis, o sugerties adityvumo principas tiriamojoje sistemoje yra:

$$D = \varepsilon_{ACA}l + \varepsilon_{MCM}l + \varepsilon_{FpCFp}l, \quad (4.1.1)$$

kur D – optinis tankis, c_A , c_M ir c_{Fp} – tirpale esančių agregatų, monomerų ir fotoproduktų koncentracijos, l – optinis kelias, ε_A , ε_M ir ε_{Fp} – tirpale esančių agregatų, monomerų bei fotoproduktų ekstinkcijos koeficientai [19]. Medžiagų koncentracija bandinyje nekinta, tačiau nuolatos kinta agregatų bei monomerų, o tirpalą švitinant – ir fotoproduktų koncentracijos. Ekstinkcijos koeficientas skirtingas kiekvienam nariui. Optinis kelias (kiuvertės storis) nekinta, ir yra lygus 10 mm. Optinio tankio padidėjimas bandinyje su BSA (14 pav.) atsiranda dėl kintančio pavienių molekulių ir jų agregatų santykio. H-tipo agregatuose molekulės dengia viena kitą, jam suirus į monomerus pagavos skerspjūvis, nuo kurio priklauso ekstinkcijos koeficientas [19], padidėja, todėl padidėja ir optinis tankis. Dinaminė porfirino molekulių pusiausvyra agregatas/monomeras joms sąveikaujant su BSA pastumiama agregato yrimo į monomerus kryptimi [3].

Fototransformacijos bandinyje su baltymu vyksta intensyviau. Baltymas imobilizuoja prisijungtas hematoporfirino molekules, todėl jos tampa lengvesniais taikiniai reaktyvioms deguonies formoms ir radikalams [74]. Po smaile ties 641 nm matomas pjedestalas, keliantis smaile yra redukcijos reakcijų keliu susidarančio florino tipo fotoprodukto juosta [75]. Terpėje su baltymu fototransformacijos gali tolygiai vykti tiek oksidacijos, tiek redukcijos keliu. Terpės pH didelės įtakos spektrui neturi, nes hematoporfirino molekulės sąveikauja su baltymu, tačiau mažesniame pH švitinant dideliu intensyvumu (15 pav., dešinėje) florino formuojama šiek tiek daugiau, dėl didesnės protonų koncentracijos terpėje [63, 66], o oksidacinių chlorino tipo fotoproduktų formavimasis sulėtėjęs, dėl išaugusios redukcijos reakcijų konkurencijos.

Švitinant hematoporfirino bandinį su askorbo rūgštimi ir BSA (16 pav.) stebimi ryškiausi spektriniai pokyčiai. Šiame bandinyje hematoporfirino molekulės gali būti tiek susijungusios į H-tipo agregatus, tiek sukibusios su BSA molekulėmis. Taigi kompleksai Hp-Hp ir Hp-BSA nagrinėjant fotovirsmų mechanizmą, vienodai svarbūs. Tas pats galioja ir bandiniui su BSA, bet be askorbo rūgšties (14 pav.). Sužadinus hematoporfiriną tokiame komplekse, šis savo perteklinę energiją perduoda deguoniui, taip generuojamos reaktyvios deguonies formos, kurios oksiduodamos hematoporfiriną formuoja chlorino tipo fotoproduktus. Tačiau švitinant neutralaus pH bandinį, iš chlorino tipo fotoprodukto formuojamas antrinis oksidacinis bakteriochlorino tipo fotoproduktas su sugerties juosta ties 665 nm [72]. Šis fotoproduktas gaunamas, kai dvi jungtys yra hidrintos [5]. Dėl

sąveikos su BSA pirminio chlorino tipo fotoprodukto molekulės taip pat imobilizuojamos, todėl išauga tikimybė jas pakartotinai oksiduoti, šitaip suformuojant bakteriochlorino tipo fotoprodukta.

Hematoporfirino redukcijos metu formuojamas florino tipo fotoproduktas, kurio plato maksimumas šiame bandinyje (16 pav.) yra ties 730 nm, ir, lyginant su bandiniu be BSA (14 pav.), yra 10 nm pasislinkęs į ilgabangę pusę. Mažesnio pH bandinyje 16 pav., b) bakteriochlorino tipo fotoproduktai nėra formuojami, tačiau po švitinimo smarkiai padidėjęs bilirubino tipo fotoproduktų kiekis [73]. Dėl nutrauktos dvigubos jungties *meso* padėtyje, ši florino molekulės vieta tampa lengvai oksiduojama.

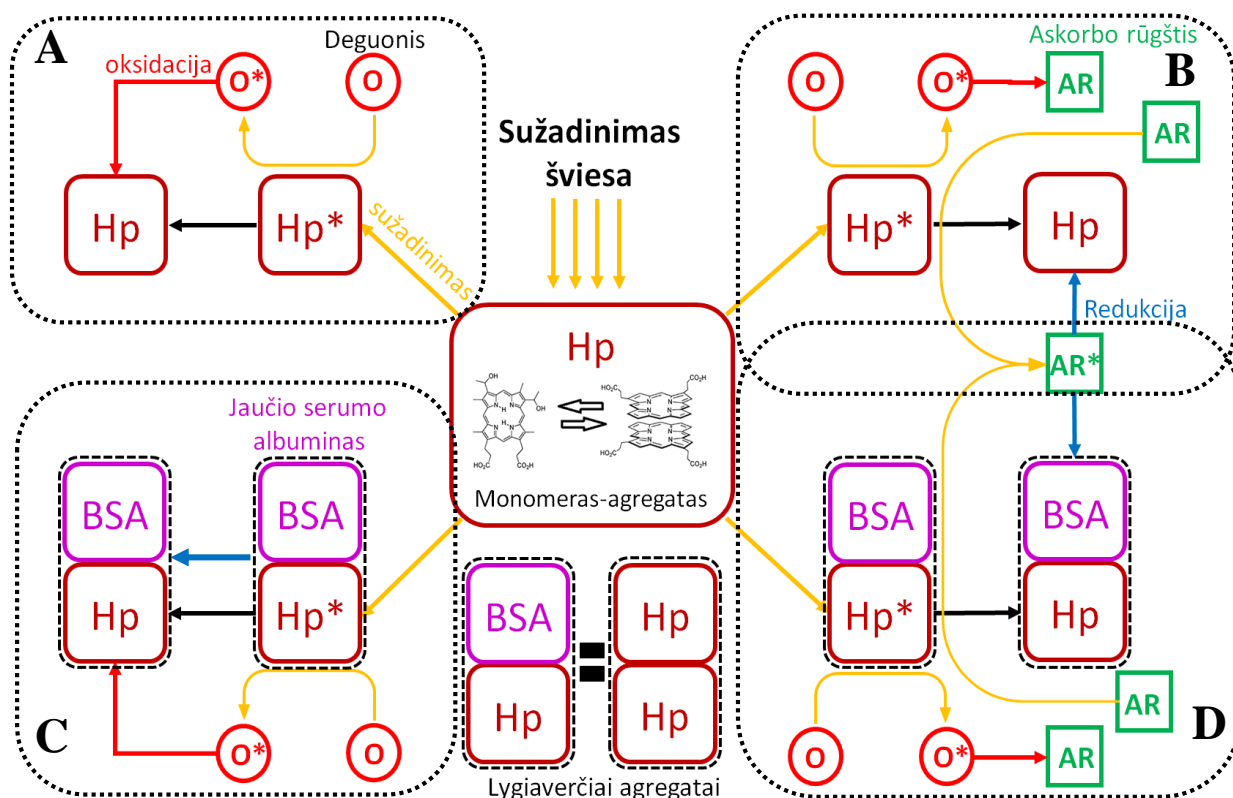
17 pav. pateiktose kinetikose kreives galima sugrupuoti į dvi grupes, a ir b kinetikose smailės ties 440 ir 730 nm priskiriamos vienam redukcijos reakcijų keliu besiformuojančių florino tipo fotoproduktų spektrui, kitos dvi smailės oksidaciniams fotoproduktams: $\lambda = 665$ nm – chlorino tipo fotoproduktui, o $\lambda = 490$ nm – bilirubino tipo fotoproduktui. 17 pav., c ir d kinetikose smailės ties 440 ir 730 nm priskiriamos tam pačiam redukciniam florino tipo fotoproduktui, o $\lambda = 490$ ir 523 nm taip pat bilirubino tipo fotoproduktui. Pastarosios smailės priklauso vienai juostai, bet dėl spektro blukimo ties ~ 510 nm, sugerties skirtuminiuose spektruose (17 pav., c ir d) matomos dvi smailės. Matyti, jog kreivių elgsena priešinga viena kitoms, kur oksidacinių fotoproduktų kreivė ima kilti, redukcinių fotoproduktų kreivės ten leidžiasi, ir atvirkščiai. Tiek oksidacijos, tiek redukcijos reakcijos bandinyje vyksta vienu metu, o kreivių antikoreliacija rodo, jog šie procesai konkuruojantys [57].

Šiose kinetikose (17 pav.) taip pat matome, jog švitinant didesniu lazerio spinduliuotės intensyvumu redukcijos reakcijų keliu besiformuojantys fotoproduktai gaminami sparčiau, o oksidacinių gamybos sparta yra sumažėjusi.

Švitinant bandinį dideliu lazerio spinduliuotės intensyvumu, hematoporfirino molekulės sužadamos sparčiau, taip pat intensyvesnė reaktyvių deguonies formų generacija [76]. Askorbo rūgštis reaktyvias deguonies formas neutralizuoja [29], todėl ryškus oksidacinių fotoproduktų formavimasis nėra matomas. Nors kiuvetės atviros ir bandinys nuolat papildomas deguonimi iš aplinkos, švitinant dideliu intensyvumu, bandinyje esantis deguonis reaguoja greičiau, nei bandinys papildomas juo iš aplinkos. Bandinyje gaunamas deguonies nuskurdinimas, kuro metu sumažėja oksidacinių fotoproduktų formavimasis, tačiau dėl antioksidanto redukuojančio poveikio paspartėja redukcinio fotoprodukto gamyba.

Porfirinai labiau linkę formuoti florinus rūgštinėje terpėje, nes porfirino redukcijai į floriną reikalingi du protonai [63], todėl rūgštiniame pH šių fotoproduktų formuojama daugiau.

Apibendrinus skirtingų bandinių spektruose švitinimo metu stebimus fotovirusmus, pateikiama hematoporfirino fotovirusų modelinėse terpėse schema.



27 pav. Apibendrinta hematoporfirino fotovirsmų schema modelinėse terpėse. Schemos centre dinaminė pusiausvyra monomeras-agregatas. **A** – hematoporfirinas fosfatiniame buferiniame tirpale, **B** – hematoporfirinas su askorbo rūgštimi, **C** – hematoporfirinas su BSA, **D** – hematoporfirinas su BSA ir askorbo rūgštimi. Schemoje naudojami trumpiniai: Hp – hematoporfirinas, AR – askorbo rūgštis, BSA – jaučio serumo albuminas, O – deguonis. Geltonos rodyklės rodo sužadinimą, mėlynos – redukcijos, raudonos – oksidacijos procesus

4.2 Vandensilio peroksido (H_2O_2) poveikis

Siekiant sumodeliuoti sąlygas, palankias Fentono reakcijoms (1.4.2.1 ir 1.4.2.2 lygtys) vykti, pirma buvo pakartotas eksperimentas su hematoporfirinu fosfatiniame buferiniame tirpale. Prieš švitinimą 150 mW/cm^2 intensyvumu bandinys padalintas į dvi kiuvetes, į kurių vieną buvo pridėta vandensilio peroksido. 18 pav. Švitinimo metu atsirandančios tos pačios smailės, matomos ir gryno hematoporfirino spektre (10 pav.). Tai – chlorino tipo fotoproduktai ties 636 nm ir bilirubino tipo fotoproduktai ties 493 nm . Fotoproduktų smailių optinio tankio kitimo kinetikose (19 pav.) matyti, jog visų smailių optinio tankio kitimo kreivės vienodos, nepriklausomai nuo to, ar bandinyje yra H_2O_2 . Kreivės, atitinkančios smailės ties 720 nm kinetiką, elgsena sutampa su oksidacinių fotoprodukto kreivių elgsena, todėl priskiriame ją chlorino tipo fotoprodukto juostai, ir tai yra jos ilgabangis kraštas.

Lyginant 19 pav. pateiktas kinetikas matome, jog bandinyje be H_2O_2 po švitinimo chlorino tipo fotoproduktų kiekis didesnis. Šio bandinio pradinio spektro optinio tankio vertės šiek tiek didesnės, nei bandinio su H_2O_2 (19 pav., b), taigi, ir hematoporfirino koncentracija šiame bandinyje didesnė. Juo didesnė bandinio koncentracija, tuo labiau molekulių dinaminė pusiausvyra bandiniuose krypsta į agregatų pusę, todėl bandinyje be H_2O_2 (19 pav., a) chlorino tipo fotoproduktų formuojama šiek tiek daugiau [60]. Nepaisant šio nedidelio skirtumo, matyti, jog vandenilio peroksidas terpėje be askorbo rūgšties hematoporfirino fotovirsmams įžvelgiamos įtakos neturi.

Taip pat buvo pakartotas eksperimentas su hematoporfirinu ir askorbo rūgštimi neutraliame kalio fosfatiniame buferyje. Šis bandinys taip pat padalintas į dvi kiuvetes, kaip ir pirmasis, be askorbo rūgšties. Į vieną iš dalių pridėta H_2O_2 . Švitinimo metu užregistruoti spektrai pateikti 20 pav.

Pirmiausia iš sugerties skirtuminių spektrų matyti, jog aiškiai išreikštos redukcinio florino tipo fotoprodukto juostos, taip pat, lyginant su bandiniu be askorbo rūgšties (18 pav.), daug intensyvesnė bilirubino tipo fotoproduktų smailė ties 495 nm.

Švitinant bandinį be H_2O_2 (21 pav., dešinėje), florino tipo fotoprodukto smailės ties 435 ir 720 nm pasiekia maksimalią vertę, t. y. fotoprodukto sotis pasiekama jau po pirmojo švitinimo intervalo, o toliau švitinant bandinį smailės ties 720 nm optinio tankio vertės svyruoja apie soties vertę, kol ima mažėti – florinas pats pradėdamas ardyti. Tuo tarpu oksidacinio bilirubino tipo fotoprodukto juosta pradeda augti, kai ima mažėti florino tipo fotoprodukto juostų optinis tankis. Taigi iš florino tipo gali būti formuojami bilirubino tipo fotoproduktai su smaile ties 495 nm. Kinetikose vėl matoma fotoproduktų susiformuojančių oksidaciniu ir redukciniu keliu konkurencija.

Vandenilio peroksidas – viena iš reaktyvių deguonies formų [18]. H_2O_2 yra geras vienatomio deguonies donoras [46], o reaguodamas su kitomis reaktyviomis deguonies formomis, pvz., superoksianijono radikalais, šis gali generuoti hidroksilo radikalą (1.5.2 reakcija) [5] – stipriausiu oksidaciniu poveikiu pasižymintį radikalą, susiformuojantį biologinėse sistemose [49]. Kadangi H_2O_2 būdingas oksidacinis poveikis, pridėjus jo į bandinį su askorbo rūgštimi reakcijų pusiausvyra pastumiama oksidacijos reakcijų link, todėl florino tipo fotoprodukto formavimasis sulėtėja, o papildomai susidarantys hidroksilo radikalai gali ardyti florino tipo fotoproduktų molekules, ties nutraukta dviguba jungtimi, šitaip suformuojant bilirubiną.

4.3 Vario chlorido ($CuCl_2$) poveikis

Fentono reakcijoms (1.4.2.1 ir 1.4.2.2 lygtys) vykti taip pat reikalingi metalo jonai. Į bandinius pridėjus vario (II) chlorido $C[CuCl_2] = C[HP]$ nešvitinant bandinio (22 pav., a) matomas juostų persiskirstymas rodo, jog hematoporfirinas su $Cu(II)$ jonu sudaro kompleksą, metalo atomas atsiduria tetrapirolo ciklo viduryje, kur prisijungia vietoje dviejų protonų. Tai lemia energinių lygmenų

persiskirstymą ir spektro kitimą [67]. Hematoporfirino monomerų fluorescencijos gyvavimo trukmė ~15 ns, tuo tarpu hematoporfirino ir metalo komplekso fluorescencijos gyvavimo trukmė sumažėja iki ~2 ns [77]. Kuo trumpesnė molekulės fluorescencijos gyvavimo trukmė, tuo mažesnė tikimybė jai pereiti į sužadintą tripletinę būseną, kurioje esant molekulei inicijuojamos fotosensibilizuotos reakcijos, todėl metalo ir porfirino kompleksai stabilūs, jų singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas yra daug mažesnis [78].

Švitinant šį bandinį (22 pav., b) matomas juostų blukimas 500-580 nm srityje bei chlorino tipo fotoprodukto juostos sugerties didėjimas ties 636 nm. Tai rodo, jog ne visos hematoporfirino molekulės sudarė kompleksus su metalo jonais, dėl ilgos metalo atomo prisijungimo reakcijos trukmės [67] arba, kad vario chlorido koncentracija tirpale yra per maža.

Taigi, pridėję vario chlorido, užuot padidinę oksidacinių reakcijų efektyvumą, gavome priešingą efektą. Porfirinai gali veikti kaip metalų chelatai, todėl bandinyje sumažėja fotosensibilizuotose reakcijose galinčių dalyvauti molekulių. Taikant FNT reikia atkreipti dėmesį, kad tam tikrais ligos atvejais, atsiradus ischemijai arba hemochromatozei, žmogaus organizme gali padaugėti neizoliuotos geležies, todėl tokiomis sąlygomis užuot sustiprinę FNT poveikį, galime gauti priešingą efektą [36].

4.4 Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrų analizė

Bandinių su askorbo rūgštimi EPR spektruose atsirandanti juosta srityje 3510,5-3514,5 G – tai askorbato radikalo juosta [79]. Askorbato radikalas susiformuoja dėl askorbo rūgšties oksidacijos [42]. Askorbo rūgšties fosfatinio buferinio tirpalo EPR spektre (23 pav.) askorbato radikalo juosta neatsiranda, nes bandinyje nepakankamai oksiduojančių molekulių. Neutralaus pH terpėje askorbo rūgšties oksidacija yra lėta, tačiau pridėjus NaOH, šarminėje terpėje jos oksidacija labai paspartėja [44], todėl bandinyje su NaOH matoma askorbato radikalo juosta. H₂O₂ yra geras deguonies donoras [46], pridėjus jo, padidėja terpės oksidacinis potencialas, todėl paspartėja askorbo rūgšties oksidacija ir yra formuojamas askorbato radikalas.

Bandiniuose su hematoporfirinu ir askorbo rūgštimi (24 pav.) dar nešvitinant stebimas askorbato radikalo formavimasis. Eksperimento metu laboratorijoje galėjo būti nepakankamai tamsu, todėl dalis hematoporfirino molekulių galėjo būti sužadinta. Sužadinus hematoporfirino molekulę, perteklinę energiją ši atiduoda bandinyje esančiam deguoniui, generuojamas singuletinis deguonis ¹O₂ [12], kuris oksiduoja askorbo rūgštį, sugeneruodamas askorbato radikalą. Pridėjus NaOH arba H₂O₂ spartinama askorbo rūgšties oksidacija, sparčiau gaminamas askorbato radikalas, todėl juostų intensyvumas tokiuose bandiniuose didėja.

Jaučio serumo albumino (BSA) molekulės yra dideli dariniai, oksiduojami singuletinio deguonies ar kitų reaktyvių deguonies formų [80]. Hematoporfirino bandinyje su askorbo rūgštimi ir BSA (25 pav., a) askorbato radikalo formuojama mažiau. BSA tampa oksidacinių reakcijų taikiniu, todėl švitinimo metu maksimalus askorbato radikalo kiekis terpėje susidaro oksidavusis mažiau askorbo rūgšties molekulių, nei bandinyje be BSA (24 pav., a). Tačiau dėl hematoporfirino molekulių imobilizacijos [66] ir padidėjusios bandinio sugerties, lemiančios intensyvesnę fotosensibilizatoriaus sužadimą, paspartėja tiek oksidaciniai tiek redukciniai procesai. Bandinyje su askorbo rūgštimi, BSA ir NaOH arba H_2O_2 , (25 pav., b) dar labiau padidinamas oksidacinis terpės potencialas, todėl askorbato radikalo kiekis šiuose bandiniuose didesnis, nei atitinkamuose bandiniuose be BSA.

26 pav. pateiktose radikalo juostos EPR signalo amplitudės kinetikose galime išskirti tris sritis. Visuose bandiniuose įžvelgiamos tos pačios amplitudės kitimo fazės: pirma – amplitudės augimas, antra – amplitudės mažėjimas, trečia – amplitudės augimas.

Pirmojoje fazėje askorbato radikalo kiekis didėja, sužadintas hematoporfirinas generuoja singuletinį deguonį, kuris oksiduoja askorbo rūgšties molekules. Bandinyje su askorbo rūgštimi ir NaOH radikalo suformuojama daugiau, nei bandinyje be NaOH, nes be hematoporfirino sugeneruoto singuletinio deguonies, askorbo rūgštis oksiduojama ir dėl šarmo poveikio. Bandinyje su askorbo rūgštimi ir BSA, askorbo rūgšties oksidacija santykinai lėtesnė, didžiausias askorbato radikalo kiekis susidaro ties didesniu lazerio spinduliuotės intensyvumu. Pridėjus NaOH, suintensyvėję oksidaciniai procesai lemia didesnę stebimo askorbato radikalo kiekį.

Antrojoje fazėje askorbato radikalų EPR spektrų juostų amplitudės ima mažėti. Bandinyje pasiekiamas deguonies nuskurdimas – singuletinis deguonis neutralizuotas askorbo rūgšties, todėl padidėja tikimybė askorbo rūgščiai ar askorbato radikalui tiesiogiai sąveikauti su sužadinta hematoporfirino molekule. Askorbato radikalo kiekis bandinyje ima mažėti, šis sąveikauja su sužadintomis fotosensibilizatoriaus molekulėmis ir yra pradedamas gaminti florino tipo fotoproduktas.

Trečiojoje fazėje askorbato radikalo ima daugėti, nes florinas gaminamas lėčiau, nei generuojamas askorbato radikalas.

Iš 26 pav. matyti, jog vandenilio peroksidas lemia maksimalaus askorbato radikalo kiekio susidarymą ties didesniu lazerio spinduliuotės intensyvumu. H_2O_2 gali sąveikauti su fotosensibilizatoriumi ir lėtinti singuletinio deguonies generavimą, tuo pačiu – askorbato radikalo formavimąsi ir deguonies sunaudojimą bandinyje, o padidindamas terpės oksidacinį potencialą, H_2O_2 lėtina redukcijos reakcijas, todėl bandinių su H_2O_2 sugerties spektruose (20 pav., b) ir jų skirtuminių spektrų smailių optinio tankio kitimo kinetikose (21 pav., dešinėje) stebimas sumažėjęs redukcinio florino tipo fotoprodukto formavimasis.

Terpėje su NaOH pH yra šarminis, aplinkoje mažai H^+ . Florinai efektyviau formuojami rūgštiniame pH – terpėje, kur daug protonų [63], taigi, šarminiame pH jų formavimasis ne toks efektyvus. Tai matyti bandinių sugerties spektruose (16 pav.) ir sugerties skirtuminių spektrų smailių optinio tankio kitimo kinetikose (17 pav., c ir d).

Švitinimo metu EPR spektre atsirandanti „sigmoidė“ srityje 3510-3527 G matoma tik hematoporfirino tirpalo su askorbo rūgštimi, BSA ir NaOH spektre (25 pav., b). Tai hematoporfirino monokatijono radikalas, susidarantis askorbato radikalui sąveikaujant su sužadinta hematoporfirino molekule. Kitų bandinių EPR spektruose ši juosta nėra stebima, nes hematoporfirino radikalas iš aplinkos pasiimtą H^+ įjungia į savo tetrapirolo žiedo centrą, suformuodamas florino tipo fotoprodukta. Šarminėje terpėje florino tipo fotoprodukto formavimosi efektyvumas mažesnis, nes aplinkoje nepakanka protonų, todėl stebime šio radikalo juostą EPR spektre.

Taigi, švitinant hematoporfirino su askorbo rūgštimi bandinį generuojamas singuletinis deguonis, kuris oksiduoja askorbo rūgšties molekules, gamindamas askorbato radikalą. Kai bandinyje sukuriama deguonies nuskurdimas, askorbato radikalai sąveikauja su hematoporfirino molekulėmis, ir yra generuojamas hematoporfirino radikalas, kuris iš aplinkos pasiima protoną ir įjungęs jį į savo molekulės centrą suformuoja florino tipo fotoprodukta. Juo terpė rūgštesnė ir joje mažiau deguonies – juo efektyvesnis florino tipo fotoprodukto formavimasis.

Taigi, bedeguonėmis sąlygomis, kai įprastinės fotosensibilizuotos reakcijos tampa neefektyvios, fotosensibilizatorių generuojami askorbato radikalai gali tapti radikalinių reakcijų pirmtakais ir galimai sukelti biomolekulių pažeidimus.

5. Išvados

- Sparčiau mažėjant deguonies kiekiui hematoporfirino tirpale (švitinant didesniu lazerio spinduliuotės intensyvumu) slopinami oksidaciniai bei skatinami redukciniai fotoprocėsai, kurių metu susidaro florino tipo fotoproduktas, efektyviau formuojamas rūgštinėje terpėje.
- Terpėje, palankioje Fentono reakcijoms vykti, vandenilio peroksidas didina terpės oksidacinį potencialą, slopindamas redukcinio fotoprodukto gamybą, o porfirinų kaip metalų chelatų poveikis gali lemti fotocheminių procesų efektyvumo sumažėjimą aplinkoje, kurioje yra laisvų metalų jonų.
- Bandinyje sukūrus deguonies nuskurdimą, askorbato radikalai, sąveikaudami su sužadintomis hematoporfirino molekulėmis, generuoja hematoporfirino radikalus, kurie, prisijungę protoną iš aplinkos, formuoja florino tipo fotoproduktą.

Santrauka

Tomas Biekša

Fotosensibilizatoriaus sukeltų fotocheminių reakcijų mechanizmo tyrimas, naudojant hematoporfiriną ir L-askorbo rūgštį

Šiame magistro studijų baigiamajame darbe apžvelgiama askorbo rūgšties naudojimo vėžio terapijoje istorija, aptariamos jos reakcijos, galinčios vykti žmogaus organizme. Išskiriamos problemos, su kuriomis susiduriama gydant didelius navikus, turinčius hipoksinių sričių. Siūlomas sprendimas, jog fotodinaminės terapijos efektyvumą tokiomis sąlygomis galima pagerinti naudojant askorbo rūgštį.

Darbe naudojami nuostoviosios sugerties ir elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometrijos metodai. Buvo tiriamas L-askorbo rūgšties poveikio hematoporfirino fotovirsmams modelinėse terpėse mechanizmas. Švitinant bandinius skirtingais diodu kaupinamo $\lambda = 532$ nm bangos ilgio kieto kūno lazerio spinduliuotės intensyvumais, buvo stebimi spektriniai pokyčiai, atsirandantys neutralaus pH (pH = 7) ir rūgštinio (pH = 5) bandinių spektruose. Taip pat, buvo tiriami hematoporfirino fotovirsmi modelinėse sąlygose, palankiose Fentono reakcijoms vykti, stebint spektrinius pokyčius hematoporfirino bandinių su vario chlorido (CuCl_2) ir vandenilio peroksido (H_2O_2) spektruose. Galiausiai elektronų paramagnetinio rezonanso metodu, keičiant lazerio spinduliuotės intensyvumą, buvo stebimas laisvųjų radikalų formavimasis bandiniuose švitinimo metu.

Šiame darbe aptariami švitinimo metu skirtingo pH bandinių spektruose atsirandantys pokyčiai, identifikuojami susidarantys fotoproduktai. Taip pat pateikiama išplėsta hematoporfirino fotovirsmų modelinėse terpėse schema bei, pasitelkus elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometrijos metodą, aiškinamas L-askorbo rūgšties poveikio hematoporfirino fotovirsmams mechanizmas.

Summary

Tomas Biekša

Study on photosensitiser induced photochemical reaction mechanism, using hematoporphyrin and L-ascorbic acid

In this final Master's work the history of ascorbic acid in cancer therapy is overviewed and its reactions which may take place in human body are discussed. Also, the problems encountered during the treatment of tumors possessing hypoxic areas were discussed. The solution for enhancement of the efficiency of photodynamic therapy under such conditions by using ascorbic acid is proposed.

In this work a steady state absorption and electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometric methods were used. The effect mechanism of L-ascorbic acid to phototransformations of hematoporphyrin was investigated. By irradiating the samples by means of diode pumped $\lambda = 532$ nm solid-state laser radiation at different intensities, spectral changes arising in neutral pH (pH = 7) and acidic (pH = 5) were observed. Also, the hematoporphyrin phototransformations in model conditions favorable for Fenton reactions were examined by observing spectral changes after addition of CuCl_2 and H_2O_2 . Finally, using electron paramagnetic resonance spectrometry, free radical formation in the samples was observed by changing laser radiation intensity.

In this work spectral changes resulting during sample irradiation at different pH are discussed, and photoproducts formed are identified. Also, an expanded scheme of hematoporphyrin phototransformations in different model media is presented and by using electron paramagnetic spectrometry the effect mechanism of L-ascorbic acid to phototransformations of hematoporphyrin is explained.

Konferencijos

Dalis darbo rezultatų yra pristatyta konferencijose:

T. Biekša, S. Bagdonas, „Fotosensibilizatoriaus fotoviršmai modelinėse terpėse – dvejetainis antioksidanto poveikis“, Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija, 2015, Vilnius, Lietuva.

S. Bagdonas, T. Biekša, „The dual effect of vitamin C on the light-induced transformations of photosensitizers hematoporphyrin derivative and chlorin e6“, 16-asis Europos Fotobiologų Kongresas, 2015, Aveiro, Portugalija.

Padėka

Dr. A. Maršalkai už konsultacijas ir metodinę pagalbą dirbant su elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometru.

Literatūra

1. Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K., Photodynamic therapy for cancer, *Nat Rev Cancer*, **3**(5), 380-387 (2003).
2. Huang Z., A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy, *Technology in cancer research & treatment*, **4**(3), 283-293 (2005).
3. Bonnett R., Martínez G., Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, **57**(47), 9513-9547 (2001).
4. Moan J., Porphyrin-sensitized photodynamic inactivation of cells: A review, *Lasers in Medical Science*, **1**(1), 5-12 (1986).
5. Rotomskis R., Streckytė G., Gričiūtė L.L., *Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai: monografija*, (Vilniaus Universitetas, 2002).
6. Castano A.P.T.N., Demidova T.N., Hamblin M.R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1** 279-293 (2004).
7. Roblero-Bartolon G.V., Ramon-Galleros E., Use of nanoparticles (NP) in photodynamic therapy (PDT) against cancer, *Gac Med Mex*, **151** 78-89 (2015).
8. Vaupel P., Kelleher D.K., Höckel M., Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy, *Seminars in Oncology*, **28**, **8**(0), 29-35 (2001).
9. Ding H., Yu H., Dong Y., Tian R., Huang G., Boothman D.A., Sumer B.D., Gao J., Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia, *Journal of Controlled Release*, **156**(3), 276-280 (2011).
10. Čikotinė I., Labanauskas L., Žilinskas A., *Organinių junginių spektrinė analizė*, (Vilnius, Vilniaus universiteto leidykla, 2008).
11. http://www.technologijos.lt/n/mokslas/fizika/S-47719/straipsnis/Elektronu-paramagnetinio-rezonanso-spektroskopija-Taikymas-dozimetrijai_tikrinta_2015_06_06.
12. Dougherty T., Photodynamic therapy, *JNCI Cancer Spectrum*, **90** 889-905 (1998).
13. Quintero B., Miranda M.A., Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey, *Ars Pharma*, **41** 27-46 (2000).
14. Clichici S., Filip A., Daicoviciu D., Ion R., Mocan T., Tatomir C., Rogoian L., Olteanu D., Muresan A., The dynamics of reactive oxygen species in photodynamic therapy with tetra sulfophenyl-porphyrin., *Acta Physiol Hung*, **97**(1), 41-51 (2010).
15. Ion R.M., Suica-Bunghes I.R., *Oxidative Stress-Based Photodynamic Therapy with Synthetic Sensitizers and/or Natural Antioxidants*, (InTech, 2015).

16. Hillemanns P., Petry K.U., Soergel P., Collinet P., Ardaens K., Gallwas J., Luyten A., Dannecker C., Efficacy and Safety of Hexaminolevulinate Photodynamic Therapy in Patients with Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia, *Lasers in Surgery and Medicine*, **46** 456-461 (2014).
17. Lukšienė Ž., Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment, *Medicina*, **39**(12), 1137-1150 (2003).
18. Streckytė G., Rotomskis R., Bagdonas S., Didžiapetrienė J., Kirvelienė V., *Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos*, (Vilnius, 2008).
19. Bagdonas S., Rotomskis R., Valančiūnaitė J., *Biofotonika*, (Vilnius, 2007).
20. Salokhiddinov K.I., Byteva I.M., Gurinovich G.P., Lifetime of singlet oxygen in various solvents, *Journal of Applied Spectroscopy*, **34**(5), 561-564 (1981).
21. Ameta S.C., Punjabi P.B., Chiobisa C.S., Mangal N., Bhardwaj R., Singlet Molecular Oxygen, *Asian Journal of Chemistry Reviews*, **1**(2), 106-124 (1990).
22. Giovannetti R., *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins*, (InTech, 2012).
23. Leanne B J., Ross W B., Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers, *Metal-based drugs*, **2008** (2008).
24. Dolphin D., *The Porphyrins V2: Structure and Synthesis, part B*, (London, Academic press, 1978).
25. Ricchelli F., Photophysical properties of porphyrins in biological membranes, *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, **29** 109-118 (1995).
26. Berg K., Anholt H., Moan J., Rønnestad A., Rimington C., Photobiological properties of hematoporphyrin diesters: Evaluation for possible application in photochemotherapy of cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **20**(1), 37-45 (1993).
27. Yang Y.-T., Chen C.-T., Tsai T., Absorption and fluorescence spectral properties of hematoporphyrin in liposomes, micelles, and nanoparticles, *Dyes and Pigments*, **96**(3), 763-769 (2013).
28. <http://orders.frontiersci.com/Orders/WebPlugin/ProdDetail.aspx?cat=H626-9>, tikrinta 2016 gegužės 2d.
29. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnaitė N., Burneckienė J., Rodovičius H., Lukoševičius L., Kondratas D., *Biochemija*, (Kaunas, KMU leidykla, 2003).
30. Carr A., Frei B., Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?, *The FASEB Journal*, **13**(9), 1007-1024 (1999).

31. Cameron E., Pauling L., Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**(9), 4538-4542 (1978).
32. DeWys W., How to evaluate a new treatment for cancer, *Your Patient and Cancer* **2**(5), 31-36 (1982).
33. Creagan E., Moertel C., O'Fallon J., Schutt A., O'Connell M., Rubin J., Frytak S., Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial, *N Engl J Med*, **301**(13), 687-690 (1979).
34. Tschetter L., Creagan E., O'Fallon J., A community-based study of vitamin C (ascorbic acid) in patients with advanced cancer, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, **2**(92), (1983).
35. Nandal S., Ghalaut P., Shekhawat H., Nagar P., Ghalaut R., Meena B., High-dose intravenous vitamin C as an Anticancer Agent - A Literature Review, *International Journal of Enhanced Research in Medicines & Dental Care*, **1**(5), 1-8 (2014).
36. Ceolin V., Ghia C., THE FENTON REACTION: pro-oxidant role of vitamin C, (2014).
37. Putchala M.C., Ramani P., Sherlin H.J., Premkumar P., Natesan A., 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 (2013).
38. S.M. Hadi, M.F. Ullah, U. Shamim, Bhatt S.H., Azmi A.S., Catalytic Therapy of Cancer by Ascorbic Acid Involves Redox Cycling of Exogenous/Endogenous Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen Species Chemotherapy, **56** 280-284 (2010).
39. Galina G. Kramarenko, Hummel S.G., Martin S.M., Buettner G.R., Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide, *Photochem Photobiol*, **82**(6), 1634–1637 (2006).
40. Roginsky V.A., Stegmann H.B., Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities, *Free Radical Biology and Medicine*, **17**(2), 93-103 (1994).
41. Różanowska M., Bakker L., Boulton M.E., Bózanowski B., Concentration Dependence of Vitamin C in Combinations with Vitamin E and Zeaxanthin on Light-Induced Toxicity to Retinal Pigment Epithelial Cells, *Photochemistry and Photobiology*, **88** 1408–1417 (2012).
42. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A., Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: An EPR study, *Free Radical Biology and Medicine*, **14**(1), 49-55 (1993).
43. Nappi A.J., Vass E., Hydroxyl Radical Production by Ascorbate and Hydrogen Peroxide, *Neurotoxicity Research*, **2**(4), 343-355 (2000).
44. Buettner G.R., In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **16**(27-40), (1988).

45. Asada K., Radical production and scavenging in the chloroplasts, *Plant Physiology*, **141**(2), 391-396 (2006).
46. 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).
47. Dorfman L.M., Adams G., *Reactivity of Hydroxyl Radical in Aqueous Solutions*, (U.S. Department of commerce, National Bureau of standards, 1973).
48. Hewett K.B., Anderson L.C., Rosynek M.P., H. L.J., Formation of Hydroxyl Radicals from the Reaction of Water and Oxygen over Basic Metal Oxides, *Journal of the American Chemical Society*, **118** 6992-6997 (1996).
49. Steveninck J.V., Tijssen K., Boegheim J.P.J., Van Der Zee J., Photodynamic Generation of Hydroxyl Radicals by Hematoporphyrin Derivative and Light, *Photochemistry and Photobiology*, **44**(6), 711-716 (1986).
50. Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maehata Y., Suzuki A., Maeda T., Baba Y., Acidic extracellular microenvironment and cancer, *Cancer Cell International*, **13**(1), 1-8 (2013).
51. Gerweck L.E., Seetharaman K., Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer, *Cancer research*, **56**(6), 1194-1198 (1996).
52. Hockel M., Vaupel P., Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects, *Journal of the National Cancer Institute*, **93**(4), 266-276 (2001).
53. Chapman J.D., Engelhardt E.L., Stobbe C.C., Schneider R.F., Hanks G.E., Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays, *Radiotherapy and oncology*, **46**(3), 229-237 (1998).
54. Fisher A.E.O., Naughton D.P., Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note, *Medical Hypotheses*, **61**(5-6), 657-660 (2003).
55. Du J., Cullen J.J., Buettner G.R., Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 443-457 (2012).
56. Girotti A.W., Thomas J.P., Jordan J.E., Prooxidant and Antioxidant Effects of Ascorbate on Photosensitized Peroxidation of Lipids in Erythrocyte Membranes, *Photochemistry and Photobiology* **41**(3), 267-276 (1984).
57. Rosenthal I., Ben-Hur E., Ascorbate-assisted, Phthalocyanine-sensitized Photohaemolysis of Human Erythrocytes, *International Journal of Radiation Biology*, **62**(4), 481-486 (1992).
58. Buettner G.R., Kelley E.E., Burns C.P., Membrane Lipid Free Radicals Produced from L1210 Murine Leukemia Cells by Photofrin Photosensitization: An Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Study, *Cancer research*, **53** 3670-3673 (1993).

59. 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).
60. 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).
61. Rotomskiene J., Kapociute R., Rotomskis R., Jonusauskas G., Szito T., Nizhnik A., Light-induced transformations of hematoporphyrin diacetate and hematoporphyrin, *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.*, **2** 373-379 (1988).
62. Pistner A.J., Yap G.P.A., Rosenthal J., A Tetrapyrrole Macrocycle Displaying a Multielectron Redox Chemistry and Tunable Absorbance Profile, *The Journal of Physical Chemistry*, **116**(16918-16924), (2012).
63. Dolphin D., *The Porphyrins V5: Physical Chemistry, Part C*, (London, Academic Press, 1978).
64. Pistner A.J., Lutterman D.A., Ghidui M.J., Ma Y., Rosenthal J., Synthesis, Electrochemistry, and Photophysics of a Family of Phlorin Macrocycles That Display Cooperative Fluoride Binding, *American Chemical Society*, **135**(17), 6601-6607 (2013).
65. Kadziauskas J., *Biochemijos pagrindai*, (Vilnius, Vilniaus universitetas, 2012).
66. 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).
67. Biesaga M., Pyrzyńska K., Trojanowicz M., Porphyrins in analytical chemistry. A review, *Talanta*, **51**(2), 209-224 (2000).
68. BRISBIN D.A., BXLAHUR R.J., *EQUILIBRIUM CONSTANTS OF ZINC(II) AND COPPER(II) WITH HEMATOPORPHYRIN IX*. 1965.
69. Naktinis R., ELEKTRONŲ PARAMAGNETINIO REZONANSO METODO TAIKYMAS, *Jurisprudencija*, **76**(68), 50-58 (2005).
70. http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_paramagnetic_resonance, tikrinta 2015-06-06.
71. B. A. Goodman, Hall P.L., *Electron paramagnetic resonance spectroscopy*, Springer Netherlands, 1994).
72. Drosdova N.N., Krasnovsky A.A., Reversible photochemical oxidation and reduction of chlorophyll, bacteriochlorophyll and bacterioviridin in viscous media*, *Biochemistry*, **30**(3), 605-618 (1965).

73. Rotomskienė J., Kapočiūtė R., Rotomskis R., Jonušauskas G., Sztó T., Nizhnik A., Light-induced transformations of hematoporphyrin diacetate and hematoporphyrin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2**(3), 373-379 (1988).
74. Al-Khaza'leh K.A., Omar K., Jaaffar M.S., Photobleaching of Sn(IV) chlorine e6 dichloride trisodium salt in different environments, *African Journal of Biotechnology*, **10**(45), 9137-9147 (2011).
75. Krasnovsky A.A., Voinovskaja K.K., Reversible photochemical reduction of porphyrin to chlorin and bacteriochlorin*, *Reports of the USSR Academy of Sciences*(Biochemistry)*, **96**(6), 1209-1212 (1954).
76. Foote C.S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochemistry and Photobiology*, **54**(5), 659 (1991).
77. Andreoni A., Cubeddu R., De Silvestri S., Jori G., Laporta P., Reddi E., Time-Resolved Fluorescence Studies of Hematoporphyrin in Different Solvent Systems, *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, **38c** 83-89 (1983).
78. Mathai S., Smith T.A., Ghiggino K.P., Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **6** 995-1002 (2007).
79. Galatro A., Puntarulo S., Ballare C.L., The inhibitory effects of UV-B radiation (280–315nm) on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with oxidative damage to lipids, *Plant, Cell and Environment*, **27** 1415-1423 (2004).
80. Davies K., Delsignore M., Lin S., Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, *J. Biol Chem*, **262**(20), 9902-9907 (1987).