

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKOS FAKULTETAS
KVANTINĖS ELEKTRONIKOS FIZIKOS KATEDRA

Marius Gželka

TERPĖS ĮTAKOS TETRAPIROLŲ FLUORESCENCIJOS GYVAVIMO TRUKMEI TYRIMAI

Pagrindinių studijų baigiamasis darbas

(studijų programa - Moderniųjų technologijų fizika ir vadyba)

Studentas

Marius Gželka

Recenzentas

Dr. R. Rudys

Darbo vadovas

Doc. S. Bagdonas

Katedros vedėjas

Prof. V. Sirukaitis

Vilnius 2016

Turinys

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	3
ĮVADAS.....	4
LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1. FLUORESCENCIJA.....	5
1.1. ELEKTROMAGNETINĖS BANGOS.....	5
1.2. ŠVIESOS SUGERTIS IR FLUORESCENCIJA.....	6
1.3. FLUORESCENCINĖ SPEKTROSKOPIJA.....	9
2. FLUORESCENCIJOS GYVAVIMO TRUKMĖ.....	10
3. FOTOSENSIBILIZATORIAI.....	12
3.1. FOTOSENSIBILIZACIJOS REIŠKINYS.....	12
3.2. HEMATOPORFIRINAS.....	13
TYRIMO METODAI.....	15
1. NAUDOTI ĮRENGINIAI.....	15
2. TYRIMO EIGA.....	16
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	18
IŠVADOS.....	34
SANTRAUKA.....	35
SUMMARY.....	36
LITERATŪRA.....	37

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

FNT – fotosensibilizuota navikų terapija;

Hp – hematoporfirinas;

DME – dimetilo esteris;

DHC – dihidrochloridas;

Ptp – protoporfirinas;

PBS – fosfatinio buferio tirpalas;

HpD – hematoporfirino darinys;

Sj – Soret juosta;

NaOH – natrio hidroksidas (šarmas);

DMSO – dimetilo sulfoksidas;

M – molinė koncentracija;

IRF – prietaiso atsako funkcija.

IVADAS

Mokslinio fotosensibilizacijos reakcijų tyrimo bei jų taikymo biomedicinoje pradžia laikomi 1900 metai. Per visą tą laiką, iki šios dienos, mokslininkai iš įvairių pasaulio šalių plačiai išnagrinėjo fotosensibilizacijos procesą, atrado daugybę naujų, efektyvesnių fotosensibilizatorių, aprašė reiškinį vykstančius fotosensibilizuotoje navikų terapijoje. Pirmasis medicinoje panaudotas fotosensibilizatorius - fotofrinas (specifiniu būdu apdorotas Hp) buvo sėkmingas navikų gydyme, tačiau nepaisant to, mokslininkai įžvelgė daugybę šios medžiagos trūkumų. Pirmos kartos fotosensibilizatoriai pasižymėjo ilgalaikiu liekamuoju jautrumu šviesai, gana mažu tripletinės būsenos ir singulentinio deguonies generavimo kvantiniu našumu, maža šviesos sugertimi raudonojoje spektro srityje bei nevienalyte chemine sudėtimi. [1]

Visi šie trūkumai mokslininkus skatino toliau plačiai tyrinėti fotosensibilizacijos reiškinį, ieškoti naujų fotosensibilizatorių, pasižyminčių geresnėmis savybėmis, leidžiančiomis pasiekti efektyvesnį gydymą. Mokslininkai tirdami šias medžiagas naudoja daugybę metodų: fluorescencijos spektroskopija, fluorescencijos gyvavimo trukmės tyrimai, nuostovioji ir nenuostovioji sugerties spektroskopija ir t.t. Šių metodų naudojimas leidžia ištirti spektrines ir fotofizikines fotosensibilizatorių savybes bei jų priklausomybę nuo aplinkos parametrų. Visų šių tyrimų rezultatai leidžia patobulinti FNT ir numatyti naujų fotosensibilizatorių paieškos kryptis.

Šiame darbe iškeltas tikslas – optinės spektroskopijos metodais charakterizuoti ir identifikuoti tetrapirolinius fotosensibilizatorius skirtinguose tirpaluose. Išsikeltos pagrindinės užduotys:

1. Ištirti Hp dimetilo esterio ~ 97% ir Hp dihidrochlorido ~ 92% savybes vandeniniuose tirpaluose su skirtingomis medžiagų koncentracijomis.
2. Ištirti šviesos poveikį fotosensibilizatoriams.
3. Nustatyti Hp pokyčius etanolio tirpale nuostoviosios ir kinetinės spektroskopijos metodais.

LITERATŪROS APŽVALGA

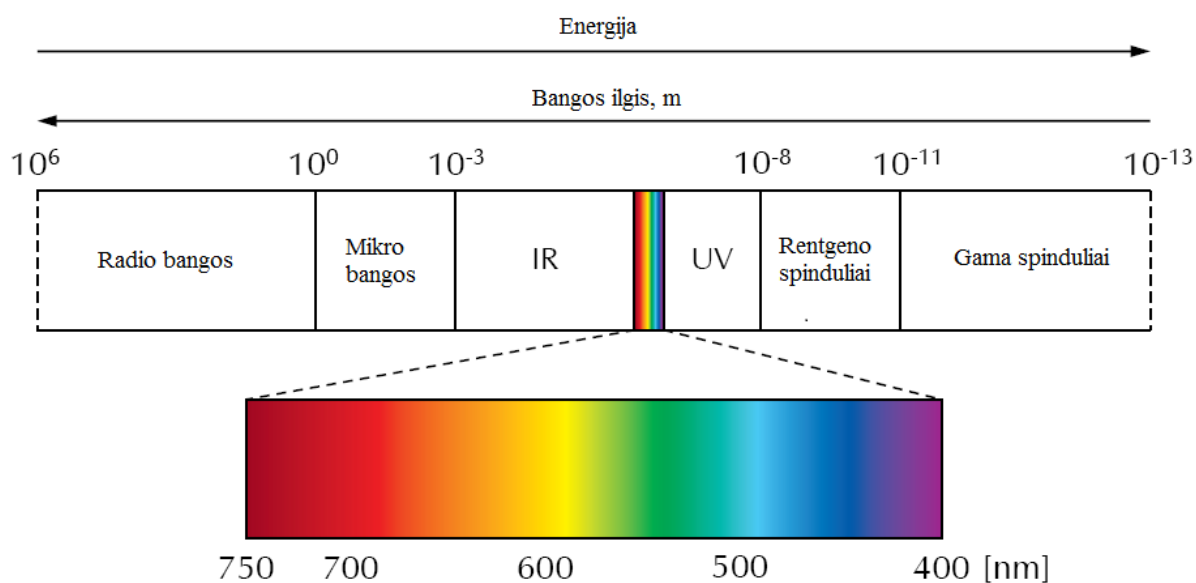
1. Fluorescencija

1.1. Elektromagnetinės bangos

Elektromagnetinių bangų spektras – elektromagnetinės spinduliuotės visų bangos ilgių (dažnių) visuma. Šis spektras apima sritį nuo radijo bangų ($\lambda = 10^0 - 10^6$ m) iki gama spindulių ($\lambda = 10^{-13} - 10^{-11}$ m). (1 pav.). Spektras pagal bangų ilgį yra suskirstytas į atskiras dalis. Ruožas nuo tolimosios infraraudonosios srities iki tolimosios ultravioletinės srities vadinamas optinių bangų diapazonu. Regimosios šviesos sritis yra nuo 400nm iki 700nm. Šviesa sukelia daugybę vyksmų biologinėse sistemose: augalai sugerdami šviesą gauna energijos fotosintzei, žmogaus organizme vyksta įvairios šviesos sukeltos cheminės reakcijos. [1]

Aprašant šviesos savybes dažniausiai įvardijame šviesą kaip elektromagnetines bangas, bet tam tikrais atvejais naudojame šviesos dalelės – fotono sąvoką. Fotono energijos išraiška:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$



1 pav. Elektromagnetinių bangų spektras [2]

Kiekvieno fotono energija (E) yra tiesiog proporcinga spinduliuotės dažniui (ν) (t. y. atvirkščiai proporcinga spinduliuotės bangos ilgiui λ). Kuo šviesos bangos yra trumpesnės, tuo daugiau energijos turi fotonas. Elektromagnetinei spinduliuotei sąveikaujant su medžiaga, poveikį lems fotono energija. Kuo didesnę energiją turi spinduliuotės fotonai, tuo stipriau gali būti paveiktas objektas, ultravioletinė (UV-B) šviesa turi pakankamai energijos biologiniams audiniams ardyti, o regimoji (mažesnės energijos spinduliuotė) gali paveikti tik silpnai su branduoliu sujungtus molekulių išorinių orbitalių valentinius elektronus [1].

Šviesos srautas [W] - energijos kiekis, kertantis ploto S paviršių per laiko vienetą:

$$\Phi = dE/dt \quad (2)$$

Šviesos intensyvumas [W/m^2] – šviesos srautas, kertantis šviesos sklidimo kryptimi statmeno ploto vienetą:

$$I = \Phi/S \quad (3)$$

Šviesos dozė [J/m^2] – šviesos intensyvumo ir švitinimo trukmės sandauga:

$$D = I t \quad (4)$$

Šviesa yra plačiai panaudojama medicininiais tikslams. Vieni plačiausiai taikomų panaudojimų yra navikinių darinių diagnostika bei fotosensibilizuota navikų terapija (FNT). Šviesai sąveikaujant su fotosensibilizatoriais jie tampa sužadinti, tuomet sužadinimo energija yra perduodama aplinkinėms molekulėms taip paverčiant jas jautrias šviesai. Apšvitinant fotosensibilizatorius pasirenkami tinkamiausi šviesos parametrai (bangos ilgis, šviesos dozė) siekiant pasiekti kuo efektyvesnį gydymą. [3] Plačiau apie vykstančius procesus kalbėsime tolimesniuose skyriuose.

1.2. Šviesos sugertis ir fluorescencija

Molekulei susidūrus su fotonu, prasideda fotofizikiniai ir fotocheminiai vyksmai. Molekulei sugėrus šviesos fotoną jos išorinėje orbitalėje esantis elektronas, įgavęs daugiau energijos šoka į

aukštesnį lygmenį (įvyksta molekulės sužadınimas). Molekulė siekdama grįžti į pradinę būseną, įgytą energiją turi atiduoti aplinkai ar išspinduliuoti ją šviesos pavidalu (fluorescencija arba fosforescencija).

Elektronai gali egzistuoti būdami tik tam tikros energinės būsenos (energijos lygmuo). Remiantis kvantinės mechanikos dėsniais, elektrono energijos E vertės yra kvantuotos. E_0 yra vadinamas pagrindinės būsenos energijos lygmuo. Norint, kad sąveikos metu fotonas būtų sugertas, jo energija turi būti lygi molekulės elektroninių lygmenų energijų skirtumui:

$$E_{\text{fotono}} = h\nu = E_1 - E_0 = \Delta E \quad (5)$$

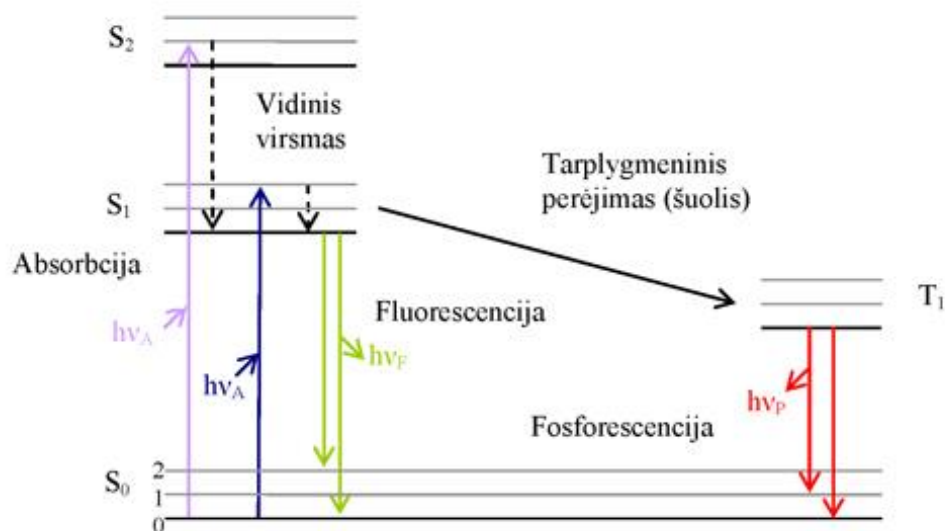
Čia h yra Planko konstanta, ν – fotono dažnis, E_0 ir E_1 – molekulės nesusžadintosios ir sužadintosios būsenų energijos. Fotonas atiduoda savo energiją molekulei – molekulė tampa sužadinta. [3]

Sugėrusios šviesos fotoną (sužadintos) molekulės elektronas iš E_0 būsenos persoka į aukštesnę orbitalę. Sužadintos būsenos molekulės sukiniai gali būti orientuoti ta pačia arba priešinga kryptimi. Pirmu atveju susidaro singulentinė būsena, antru – tripletinė. Dažniausiai daugiaatomių molekulių pagrindinės būsenos yra singulentinės. Tačiau būna išimčių, kaip kai kurios dviatomės molekulės, kurių pagrindinė būsena yra tripletinė.

Daugiaatomių molekulių elektronų šuoliai, galimi spinduliniai ir nespinduliniai vyksmai aiškinami A. Jablonskio lygmenų diagrama (2 pav.). Ši diagrama padeda paaiškinti fotofizikinių savybių sąsajas su optiniais spektrais. Molekulių energiniai lygmenys sudaryti iš daugybės vibracinių lygmenų, kurie taip pat turi rotacinius polygmenis. Molekulės bendrąją energiją galima gana tiksliai išreikšti jos rotacinės E_{rot} , virpesinės E_v ir elektroninės E_e energijų suma:

$$E = E_{\text{rot}} + E_v + E_e \quad (6)$$

Čia E_{rot} – molekulės sukimosi apie svorio centrą energija, E_v – molekulės virpesinė energija, priklausanti nuo atomų poslinkio iš pusiausvyros padėties, E_e – elektroninė energija, elektronų esančių atome, sudarančių cheminius ryšius energija. Visos šios energijos formos yra kvantuotos. Rotacinė energija yra pati mažiausia, elektroninė – didžiausia. Virpesiniai spektrai egzistuoja infraraudonojo spektro srityje, šie spektrai egzistuoja tik tose molekulėse, kuriose virpant atomams keičiasi molekulės dipolinis momentas. Vykstant šuoliams tarp elektroninių lygmenų spinduliuojama regimosios ir ultravioletinės srities šviesa. Visoms molekulėms yra būdingi elektroniniai spektrai, kadangi visuomet kinta jų dipolinis momentas. [4]



2 pav. Jablonskio diagrama [5]

Vykstantys procesai:

Sugertis (absorbcija) — molekulei sugėrus šviesos fotoną, elektronas persoką iš aukščiausio užpildyto energinio lygmens į aukštesnį neužpildytą lygmenį ($S_0 \rightarrow S_1, S_2$).

Vidinė konversija – nespindulinis sugerto fotono energijos praradimas šilumos pavidalu molekulei grįžtant į S_1 arba S_0 būseną ($S_2 \rightarrow S_1 + \text{šiluma}$).

Virpesinė relaksacija — sužadintos molekulės elektrono šuoilis į nulinį virpesinį polygmenį iš aukštesniojo.

Fluorescencija – spindulinis šuoilis tarp dviejų to paties multipletiško elektroninių lygmenų, beveik visuomet iš S_1 į S_0 būseną ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_f$).

Interkombinacinė konversija (tarplygmeninis perėjimas) — elektrono šuoilis iš singuletinės būsenos į tripletinę, pasikeičiant sukiniui ($S_1 \rightarrow T_1$).

Fosforescencija — spindulinis sugerto fotono energijos praradimas šviesos pavidalu molekulei grįžtant iš tripletinės į pagrindinę būseną ($T_1 \rightarrow S_0$). [3]

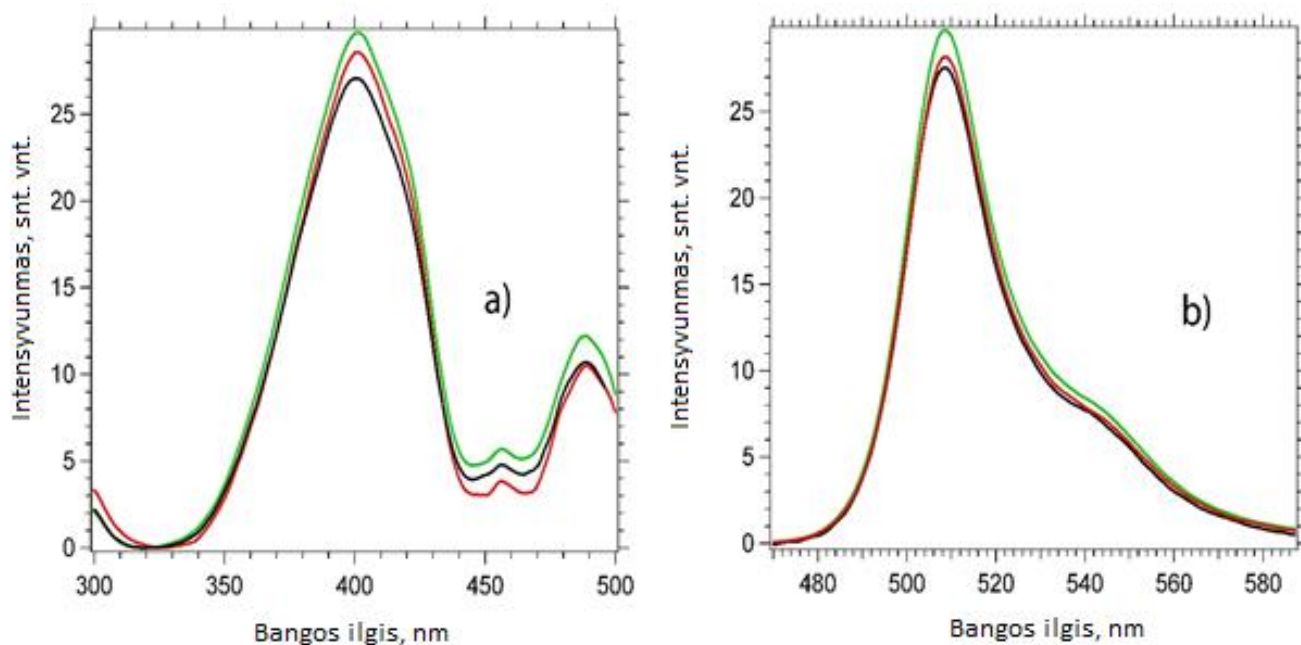
Kaip matome iš Jablonskio diagramos (2 pav.) fluorescencijos energija dėl vidinių virsmų yra mažesnė už sugertos šviesos energiją. Taigi šviesa sužadinta medžiaga fluorescuoja mažesnės energijos (ilgesnių bangų) šviesą. Šis reiškinys pavadintas Stokso poslinkiu.

1.3. Fluorescencinė spektroskopija

Kadangi sužadintos molekulės išspinduliuota šviesa pasižymi specifinėmis savybėmis ir priklauso nuo ją supančios aplinkos, tai naudojantis fluorescencijos spektroskopijos pagalba galima sužinoti daug naudingos informacijos apie tiriamų objektų sudėtį, struktūrą bei tarpusavio sąveikas.

Fluorescencijos spektras gaunamas žadinant molekules tokio bangos ilgio šviesa, kurią geriausia ta medžiaga sugeria. Žadinant vieno bangos ilgio šviesa, gaunamas visas emisijos spektras iš kurio matome fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo bangos ilgio (3 pav. b). Taip pat diagnostikos tikslais galima matuoti fluorescencijos žadinimo spektrą (3 pav. a). Šiuo atveju nustatomas pastovus fluorescencijos bangos ilgis, o žadinimo šviesos bangos ilgis yra keičiamas. Naudodamiesi žadinimo spektrais, tirdami sveikus ir navikinius audinius iš jų spektrinių skirtumų galime diagnozuoti vėžį. [4]

Tačiau tai nėra vieninteliai būdai išgauti informaciją. Kiti itin svarbūs fluoroforų parametrai: fluorescencijos gyvavimo trukmė ir kvantinis našumas taip pat teikia svarbią informaciją.



3 pav. a - Žadinimo spektras b - Fluorescencijos spektras [6]

2. Fluorescencijos gyvavimo trukmė

Viena svarbiausių liuminescencijos charakteristikų yra sužadintos būsenos trukmė – gyvavimo trukmė. Tiriant gyvavimo trukmę, matuojama fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko, atskaitant nuo to momento, kai bandinys buvo sužadintas impulsinio lazerio spinduliuotės pluoštu. Kaip jau minėjome, dalis molekulių pereina į žemiausią sužadintą būseną S_1 ir spindulinio šuolio metu pereidamas į S_0 (pagrindinę) būseną emituoja fluorescencijos fotoną:



Čia B_{kv} – liuminescencijos kvantinis našumas, k – šuolio $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė per laiko vienetą. [4]

Vidutinė molekulės sužadintos būsenos gyvavimo trukmė (čia k - emisinio šuolio spartos konstanta):

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (8)$$

Molekulinė liuminescencija gęsta pagal eksponentinį dėsnį:

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (9)$$

τ – vidutinė švytėjimo centrų sužadintos būsenos trukmė arba kitaip – laiko intervalas, per kurį švytėjimo intensyvumas sumažės e kartų. τ reikšmė, eksponentinio gesimo atveju nusako visą gesimo procesą. Žinant trukmę ir gesimo dėsnį galime nustatyti liuminescencijos prigimtį, tai yra gauti daugybę informacijos apie tiriamą objektą. [7]

Realiais atvejais dėl nespindulinių šuolių bei dėl sąveikos su aplinka atsirandančio gesiklio (Q), bendra šuolio $S_1 \rightarrow S_0$ spartos konstanta yra $k_1 + k_2 + k_3(Q)$, o jei atvirkščias dydis yra vidutinė sužadintos būsenos trukmė:

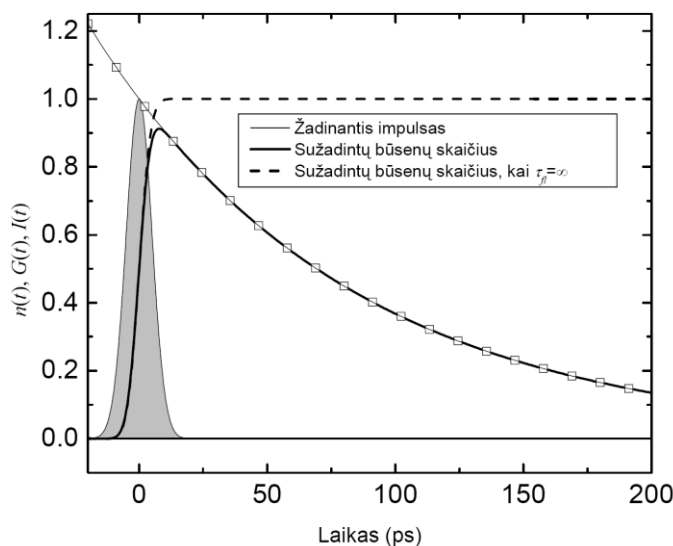
$$\tau = \frac{1}{k_1 + k_2 + k_3(Q)} \quad (10)$$

Fluorescencijos gyvavimo trukmę galime laikyti pastovia funkcija, kadangi ji nepriklauso nuo žadinančios šviesos bangos ilgio, apšvietos laiko, matavimo metodo, fluorescencijos intensyvumo ar fluoroforo koncentracijos. Kadangi šis procesas yra susijęs su energetiškai nestabiliu lygmeniu, fluorescencijos gyvavimo trukmė gali būti jautri daugybei vidinių faktorių apibūdinamų fluoroforo struktūra bei išorinių faktorių tokių kaip temperatūra, poliarizumas. Taigi jautrumas aplinkai bei priklausomybės parametrams nebuvimas šį procesą padaro puikiu papildomu tyrimo metodu tradiciniam fluorescencijos tyrimui. [8]

Naudojant fluorescencijos spektrą suintegruotą laike (nuostovusis fluorescencijos spektras), detektorius susumuoja visus bandinio molekulių išspinduliuotus fotonus. Iš nuostovios fluorescencijos eksperimento neįmanoma nustatyti kada ir kaip užgesa molekulės, taip pat negalime sužinoti kas su molekule vyksta per tą laiką kol ji yra sužadinta ar kaip yra prarandama energija. Fluorescencijos gyvavimo trukmės tyrimai (kinetinė spektroskopija), kuriuose nėra integravimo laiko atžvilgiu, gerokai praplečia tyrimų ribas ir leidžia stebėti labai sparčius pikosekundžių trukmės šviesos sukeltus vyksmus nepastebimus kitais būdais. Dėl aplinkos įtakos molekulės dinamiką veiks keletas procesų:

1. Energijos pernaša į gretimą molekulę;
2. Sovatacija (tirpiklio molekulių persiorientavimas, prisitaikant prie sužadintos molekulės elektroninės orbitalės konfigūracijos);
3. Fotoindukuota reakcija pvz., protono pernaša nuo sužadintos molekulės į tirpiklį. [9]

Visų šių procesų poveikį galime stebėti kinetinės fluorescencijos metodais.



4 pav. Fluorescencijos kinetika hipotetinėje molekulėje, sužadinus ją gausiniu impulsu [9]

3. Fotosensibilizatoriai

3.1. Fotosensibilizacijos reiškinys

Fotosensibilizatorius sugėręs šviesos fotoną perduoda energijos perteklių molekulėms esančiomis jo aplinkoje, taip molekulės tampa sužadintos ir jose gali pradėti vykti fotocheminės reakcijos. Taigi panaudojus fotosensibilizatorius ląstelės ar biologiniai organizmai tampa jautrūs šviesai ir gali žūti. Fotosensibilizacijos vyksmui reikalinga šviesa, fotosensibilizatorius (su tokia molekulių struktūra, kad galėtų sugerti reikiamo bangos ilgio šviesą) ir biologinė terpė kurioje vyksta reakcijos sukeltos fotosensibilizacijos.

Fotosensibilizacija paprastai vyksta iš tripletinės sužadintosios būsenos (fosforescencija), kadangi jos gyvavimo trukmė yra ilgesnė nei singulentinės būsenos (fluorescencija), dėl to tikimybė kad šioje būsenoje bus inicijuoti sensibilizacijai svarbūs pirminiai fotocheminei vyksmai yra didesnė. Kad fotosensibilizatorius galėtų inicijuoti fotosensibilizuotus vyksmus, jis turi turėti pakankamai didelį interkombinacinės konversijos į sužadintą tripletinę būseną kvantinį našumą, taip pat ilgą tos būsenos gyvavimo trukmę.

Fotosensibilizuotos navikų terapijos efektyvumas, priklauso nuo to, kiek sensibilizatorius sugebės sugerti fotochemines reakcijas inicijuojančių šviesos fotonų. Bendros tinkamo fotosensibilizatoriaus charakteristikos:

1. Efektyvus reikiamos bangos ilgio šviesos fotonų sugėrimas;
2. Didelis energijos pernašos į tripletinę būseną kvantinis našumas;
3. Ilga tripletinės būsenos gyvavimo trukmė. [10]

Biologinis audinys mažiausia sugeria 650-1000 nm diapazono šviesą (fototerapinis langas), šioje srityje audinys yra skaidriausias šviesai. Taigi fotosensibilizatoriams yra svarbu turėti stiprią šviesos sugertį šioje srityje.

Kuomet sensibilizatorius sužadintas į tripletinę būseną sąveikauja su biologine aplinka, yra galimi du pagrindiniai reakcijų tipai – pirmasis (I) ir antrasis (II). Pirmojo tipo metu sensibilizatoriui tiesiogiai sąveikaujant su molekule vyksta elektrono arba vandenilio atomo pernaša bei susidaro laisvieji radikalai. Antrojo tipo metu sužadintos tripletinės būsenos sensibilizatorius sąveikauja su audinių molekuliniais deguonimi esančiu tripletinėje būsenoje, reakcijos metu deguonis yra pervedamas į singulentinę sužadintą būseną, tokiu būdu susidaro singulentinės būsenos deguonis. [11]

3.2. Hematoporfirinas

Pirmieji fotosensibilizuotoje navikų terapijoje naudojami fotosensibilizatoriai buvo porfirinai. Iš pradžių naudotas hematoporfirinas (Hp) (5pav.). Iš tiesų tai buvo neišgrynintas įvairių porfirinų mišinys. Vėliau paaiškėjo, kad priemaišos kaupiasi navikiniame audinyje geriau už hematoporfiriną. Dėl to buvo ieškoma būdų kaip iš Hp gauti efektyvesnį fotosensibilizatorių. Veikiant acto ir sieros rūgščių mišiniu, bei susidariusį produktą hidrolizuojant natrio šarmu, buvo gautas mišinys pavadintas hematoporfirino dariniu (HpD). [11]

Po gausių HpD agreguotosios frakcijos tyrimų nustatyta, kad ją sudaro hematoporfiriniai, eterinėmis ir esterinėmis jungtimis arba C-C ryšiu susijungę į dimerus ar didesnius agregatus. Ši frakcija turi geras sensibilizacines savybes ir puikiai kaupiasi audiniuose.

Vandeniniuose porfirinų tirpaluose egzistuoja monomerų ir agregatų mišiniai. FNT efektyvumas priklauso nuo sensibilizatorių agregacinių savybių, todėl porfirinų agregacija yra itin svarbus klausimas. Porfirinų agregacijos laipsnis kinta priklausomai nuo sensibilizatoriaus koncentracijos mišinyje, tirpiklio poliškumo, temperatūros. [12]

Porfirinų sugerties spektrai yra jautrūs įvairioms sąveikoms. Sugertis gali pakisti molekulei agreguojant, jonizuojantis ir t.t., todėl sugertis teikia daug informacijos apie molekulės struktūrą, agregatinę būseną. Porfirinų agregacijos laipsnis kaip jau minėta priklauso nuo koncentracijos. Geriausia tai pastebėti galime stebint Soret juostos (Sj) poslinkius besikeičiant mišinio monomerų bei agregatų santykiui. Esant labai mažoms koncentracijoms vandeninių Hp tirpalų spektruose pusiausvyrieji agregatai suyra ir tirpale egzistuoja tik monomerai ir kovalentiškai surištos struktūros, SJ slenkasi į ilgabangę spektro pusę ir yra apie 396nm. Esant didelėms koncentracijoms Hp sugerties smailė atspindi agregatinių darinių sugertį ir slenkasi į trumpabangę spektro pusę (365nm), nežymus petys ilgabangėje SJ pusėje yra monomerų sugerties indėlis. Nedidelės koncentracijos tirpaluose pirmiausia susidaro dimerai. Dėl pusiausvirųjų dimerų SJ pasislenka į trumpabangę spektro pusę, o susidarius linijiniams dimerams stebimi smailės pločio pokyčiai bei nežymus poslinkis į ilgabangę spektro pusę. FNT požiūriu, agregatinė porfirinų būseną yra itin svarbi. [13]

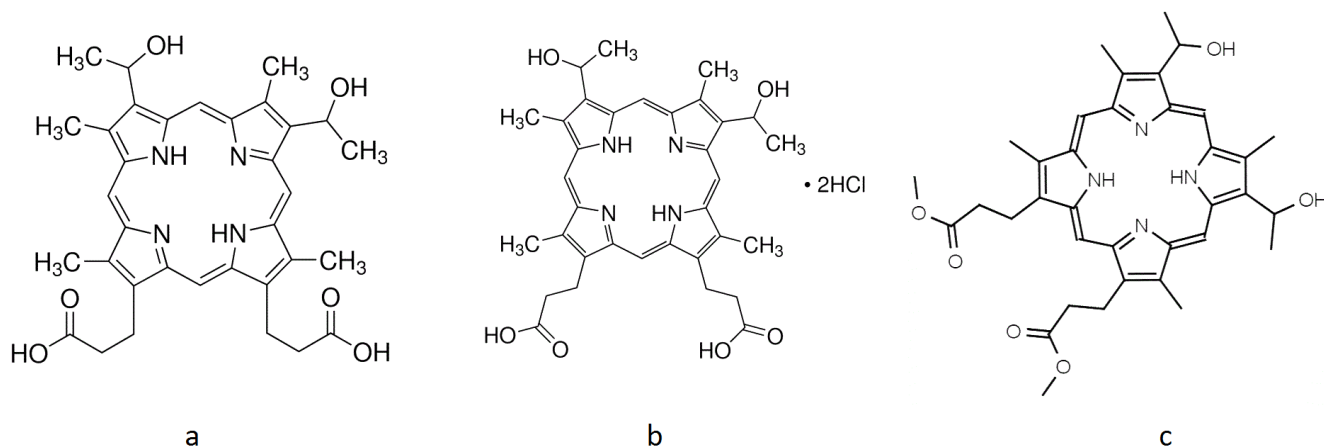
Hematoporfirinų kinetinės spektroskopijos tyrimai yra svarbūs norint suprasti FNT mechanizmą, gauti informacijos apie šviesos ir biologinio objekto aktyvių molekulių visumą, kadangi šis metodas gerokai praplečia tyrimų ribas ir leidžia stebėti sparčius šviesos sukeltus vyksmus.

Hematoporfirinų vandeninių tirpalų tyrimas yra svarbus, kadangi dauguma cheminių bei fizikinių procesų juose vyksta panašiai kaip ir biologinėse sistemose. Vandeninėse terpėse matuojant gesimo kinetikas, vienu metu registruojama keletas dedamųjų, kurių santykiniai svoriai priklauso nuo hematoporfirinų koncentracijos, žadinamo bangos ilgio bei fluorescencijos bangos ilgio. Gesimas vyksta kaip eksponentinė, dvieksponentinė ar triekspontinė funkcija ir atspindi monomerų bei agregatų sužadintos būsenos relaksaciją. [14]

Pirmos kartos fotosensibilizatorių trūkumai:

1. Nehomogeninė cheminė sudėtis apsunkina sensibilizacinių savybių ir selektyvumo kontrolę, biologinėje aplinkoje atsidūrusios skirtingos frakcijos turi kitokį sensibilizacinį efektyvumą;
2. Trumpos tripletinių būsenų gyvavimo trukmės, silpna singulentinio deguonies generacija;
3. Mažas sugerties intensyvumas ties „fototerapiniu langu“;
4. Pakankamam fototerapiniam atsakui naudojamos didelės dozės, dėl ko galimas toksinis poveikis;
5. Kaupimasis navikiniame audinyje nepakankamai selektyvus – pavojus aplinkiniams audiniams;
6. Ilgai išbūna susikaupę odoje, dėl ko pacientams reikia vengti šviesos.

Dėl šių priežasčių pradėta ieškoti kitų sensibilizatorių, kurie turėtų mažiau trūkumų ir labiau tikėtų fotosensibilizuotai navikų terapijai (antros kartos fotosensibilizatoriai). [11]



5 pav. a - Hp, b – Hp dihidrochloridas, c - Hp dimetilo esteris[15]

TYRIMO METODIKA

1. Naudoti įrenginiai

1. Sugerties spektrų matavimui naudojamas šviesolaidinis spektrofotometras *Avantes-3648*.

Eksperimentinė schema susideda iš: šviesolaidinio spektrometro, šviesolaidinio šviesos šaltinio, keturių langelių kiuvečių laikiklio, jungiamųjų šviesolaidžių. Šia sistema galima atlikti sugerties, fluorescencijos ir deguonies koncentracijos matavimus. Spektriniai matavimai atliekami programa *AvaSoft*. Galima pasirinkti iš keturių matavimo režimų: tiesioginio registravimo, sugerties, pralaidumo, apšvitos. Sugerties matavimo vykdymas: surenkama eksperimentinė schema, įjungiamas scope režimas, pamatuojamamas tamsinis spektras, į kiuvetės laikiklį įdedama iš tokios pat medžiagos pagaminta ir to paties tirpiklio pripildyta kiuvetė, pamatuojamas šviesinis (atraminis) spektras, įdedamas bandinys, įjungiamas *Absorption* režimas. [16]

2. Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai matuojami fluorimetru *Perkin Elmer LS55*.

Fluorimetro šviesos šaltinis – ksenono lempa. Monochromatorių spektro sritys: žadinimo monochromatoriaus nuo 200nm iki 800nm ir nulinė eilė, emisijos monochromatoriaus nuo 200 nm iki 900 nm ir nulinė eilė. Žadinimo bangos ilgis negali būti fluorescencijos spektro ribose, o turi būti nutolęs nuo fluorescencijos spektro ribų ne mažiau kaip 15 nm (daugiau nei du žadinimo plyšio pločiai, Gauso pluoštas), kad detektorius nefiksuotų žadinimo šviesos. Taip pat fluorescencijos bangos ilgis negali būti fluorescencijos žadinimo spektro ribose (atstumas 15 nm). [16]

3. Fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimui naudotas *Edinburgh Fluorescence Spectrometer F900*.

Spektrometras naudoja laike koreliuotą pavienių fotonų skaičiavimo metodą. Žadinimui naudotas 405 nm lazeris generuojantis pikosekundinės trukmės impulsus. Metodo principas: didelio pasikartojimo dažnio lazeris siunčia ultratrumpuosius impulsus į bandinį. Dalis lazerio impulso šviesos atskeliama pluošto dalikliu ir nukreipiama į fotodiodą, kuris generuoja elektroninį impulsą. Šis impulsas toliau patenka į diskriminatorių kuris iš diodo impulso sugeneruoja skaitmeninį elektroninį impulsą, vadinamą „Start“ impulsu. Šis impulsas patekęs į laiko-įtampos keitiklį jį paleidžia. Laiko-įtampos keitiklis – prietaisas išduodantis įtampą, proporcingą laiko tarpui tarp dviejų elektroninių signalų („start“ ir „stop“). Fluorescencijos fotoną kurį išspinduliuoja bandinys užregistruoja jautrus fotodaugintuvas, tai „stop“ signalas. Laiko-įtampos keitiklyje atsiranda įtampa proporcinga laiko tarpui tarp žadinimo ir fluorescencijos fotonų pasirodymo, tokiu būdu registruojamas fluorescencijos gesimas. Praktikoje šis

metodas leidžia pasiekti apie 50 ps laikinę skyrą. [17] Naudotos aparatūros nustatymai matavimo metu: fluorescencijos gesimo trukmės diapazonas 0 – 100 ns, matavimo žingsnis – 1 nm, integracijos laikas – 100 ns, pralaidumo plyšiai – 5 nm. Fluorescencijos gyvavimo trukmės apskaičiuojamos Origin programa naudojant eksponentinio gesimo pritaikymo funkciją. Galimas monoeksponentės, dviejų bei trijų eksponentių skaičiavimas priklausomai nuo matavimo. Skaičiavimo metu atmetama prietaiso atsako funkcija (IRF).

2. Tyrimo eiga

2.1. Tiriamų medžiagų paruošimas

Pirmoji medžiaga ~ 97% grynumo hematoporfirino dimetilo esteris 626.75 g/mol („Porphyrin products“ JAV). Gautas $2 \cdot 10^{-4}$ M koncentracijos tirpalas (tirpiklis – fosfatinis buferis 7,2 pH PBS), kiekis ~ 70 μ l. Naudojant specialius, ypač mažo kiekio skysčio dozatorius (10 - 1000 μ l) į kvarcines kiuvetes supilami naujų koncentracijų tirpalai. Pirmą koncentraciją 10^{-6} M pagaminama skiedžiant turimą tirpalą su fosfatinio buferio 7,2 pH santykiu (1 : 199), tai yra 10 μ l Hp tirpalo ir 1990 μ l PBS. Pagaminamos dvi tokios koncentracijos kiuvetės: darbinė ir kontrolinė. Antra koncentracija didesnė - $5 \cdot 10^{-6}$ M, tokią koncentraciją gauname skiedžiant turimą tirpalą su PBS santykiu (1 : 39), 50 μ l turimą tirpalą sumaišius su 1950 μ l PBS. Šios koncentracijos kiuvetė viena – darbinė. Kiuvetės uždaromos specialiu dangteliu skirtu skysčio užsandarinimui, o siekiant apsaugoti medžiagas nuo šviesos poveikio kiuvetės apvyniojamos folija.

Antroji medžiaga ~ 92% grynumo hematoporfirino dihidrochloridas 671.62 g/mol („Alfa aesar“ Vokietija) gautas miltelių pavidalu, reikiamas kiekis ištirpinamas NaOH šarme, tuomet, tuo pačiu principu kaip su pirmąja medžiaga, fosfatiname buferyje 7,2 pH praskiedžiamos reikiamos koncentracijos: 10^{-6} M bei $5 \cdot 10^{-6}$ M. Pagaminamos kelios darbinės ir kontrolinės kiuvetės. Taip pat gauta medžiaga tirpinama 95% etanolyje siekiant nustatyti jos grynumą.

Trečioji medžiaga ~ 95 % grynumo protoporfirinas IX 562.658 g/mol („Porphyrin products“ JAV) Gautas 10^{-4} M koncentracijos tirpalas (tirpiklis - DMSO). Medžiaga tirpinama 95% etanolyje pagaminant $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos tirpalą. Tirpalas skirtas protoporfirino spektrinėms savybėms nustatyti bei Hp DHC etanolyje gauto fotoprodukto palyginimui.

2.2. Tyrimų eiga:

Sugerčių matavimai: atliekami sugerties matavimai reikalingi medžiagų agregatinės būsenos bei bangos ilgių panaudojamų fluorescencijos tyrimams nustatymui. Šviesolaidiniu spektrofotometru Avantes-3648 išmatuoti $5 \cdot 10^{-6}$ M ir 10^{-6} M koncentracijų Hp DME bei Hp DHC vandeninių tirpalų sugerties spektrai.

Fluorescencijos ir žadinimo spektrų matavimai: gavus ir išnagrinėjus Hp medžiagų sugerčių spektrus pradėti matuoti fluorescencijos ir žadinimo spektrai Perkin Elmer LS55 fluorimetru. Žadinama skirtingais bangų ilgiais siekiant kuo plačiau charakterizuoti turimas medžiagas bei identifikuoti naujas.

Kontrolinių bandinių stebėjimas: optinės spektroskopijos metodais stebimi fotosensibilizatorių tirpalų pokyčiai laikui bėgant.

Fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimai: papildomam medžiagų charakteristikų nustatymui matuojame medžiagų gesimo kinetikas Edinburgh F900 fluorescencijos spektrometru.

Švitinimas: medžiagos švitinamos mėlyno 405 nm lazerio šviesa 20 min ($40 \text{ J} / \text{cm}^2$ dozė) siekiant stebėti fototransformacijų metu vykstančius pokyčius, atsirandančius fotoproduktus.

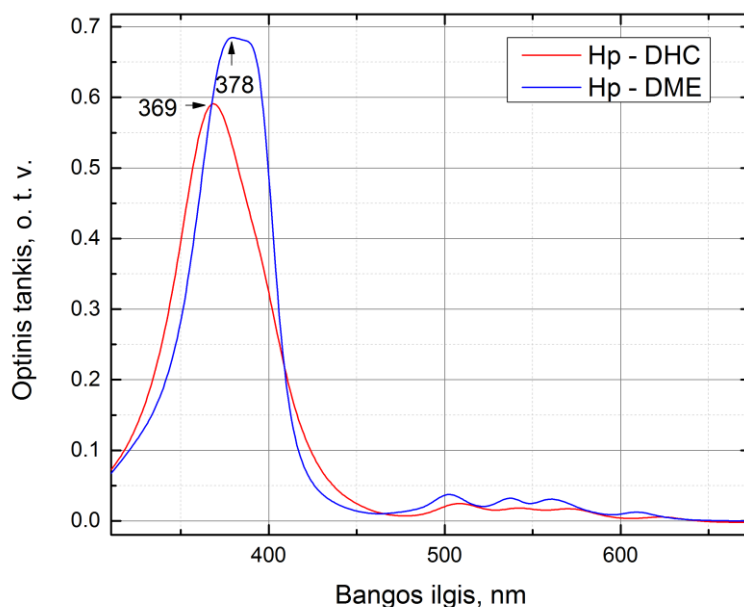
Fluorescencijos ir žadinimo spektrų matavimai po švitinimo: fototransformacijų metu atsiradusių fotoproduktų stebėjimas, identifikavimas, charakterizavimas medžiagose, pasinaudojant fluorescencijos ir žadinimo spektrais.

Sugerčių matavimai po švitinimo: sugerties spektrų pokyčių stebėjimas po medžiagų švitinimo, agregacijos pokyčiai, fotoprodukto įnašas.

Fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimai po švitinimo: fototransformacijų metu atsiradusių medžiagų identifikavimas, charakterizavimas.

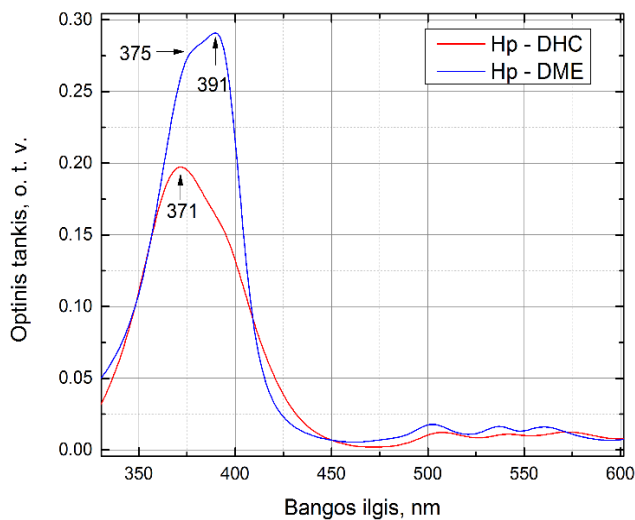
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Atliekant šį tyrimą optinės spektroskopijos metodais plačiai išnagrinėtos Hp DME ~ 97 % ir Hp DHC ~ 92 % medžiagos. Tiriant fotosensibilizatorių savybes pasinaudota sugerčių, fluorescencijos, fluorescencijos žadinimo spektrų bei fluorescencijos gyvavimo trukmės metodais.

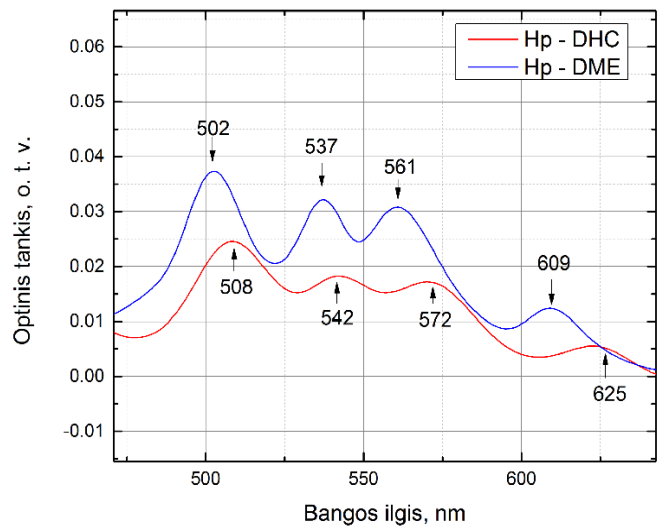


1 graf. $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos Hp DHC ir Hp DME tirpalų sugerties spektrai prieš švitinimą

Pirmajame grafike matome Hp DHC ir Hp DME sugerties spektrus vandeniniuose tirpaluose. Soret juosta (Sj), porfirinams būdinga intensyviausia sugerties juosta esanti trumpabangėje spektro srityje, teikia išsamią informaciją apie medžiagos agregatinę būseną, kadangi agregatų ir monomerų sugertis Sj figūruoja skirtinguose bangos ilgiuose. Esant didelėms koncentracijoms Hp sugerties smailė atspindi agregatinių darinių sugertį ir slenkasi į trumpabangę spektro sritį ties 365 nm. [11] Hp DHC Sj maksimumas yra ties 369 nm, kai tuo tarpu Hp DME - 378 nm, taip pat medžiaga neturi aiškaus monomerų juostos peties kaip kad Hp DME ties 391 nm. Šie Sj skirtumai parodo, kad Hp DHC tirpale susidarę didesni, stabilesni agregatai, taip pat agregatų medžiagoje santykinai daugiau nei monomerų. Hp DME vyrauja pusiausvirieji dimerai kurie pirmieji susidaro didinant koncentraciją, todėl ir juostos poslinkis į trumpabangę spektro sritį (monomerai 395 nm) nėra toks didelis. [11]



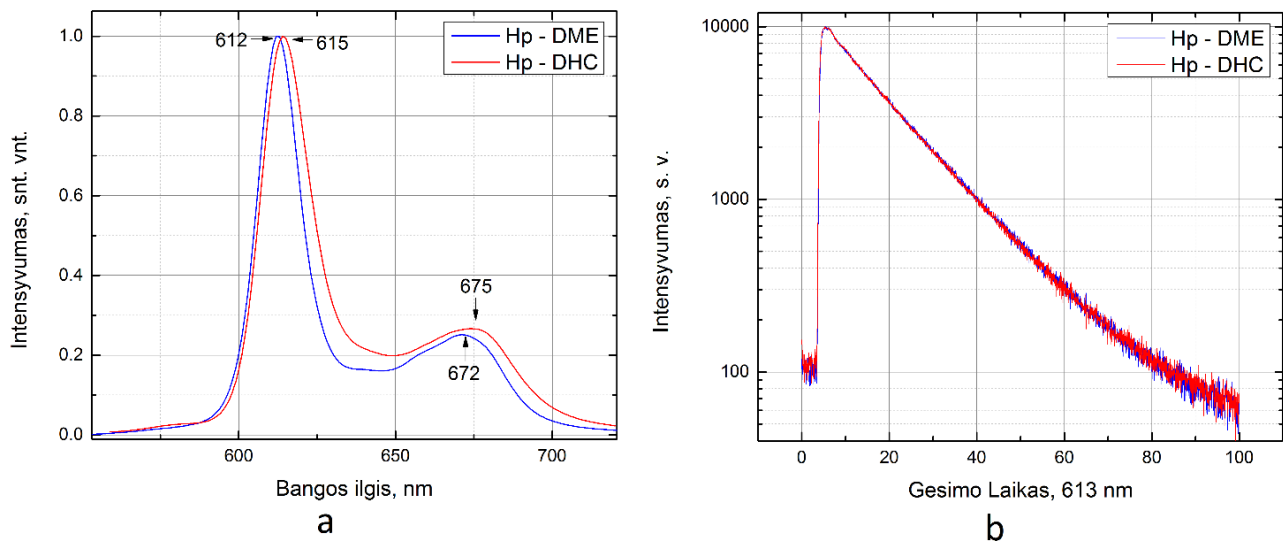
a



b

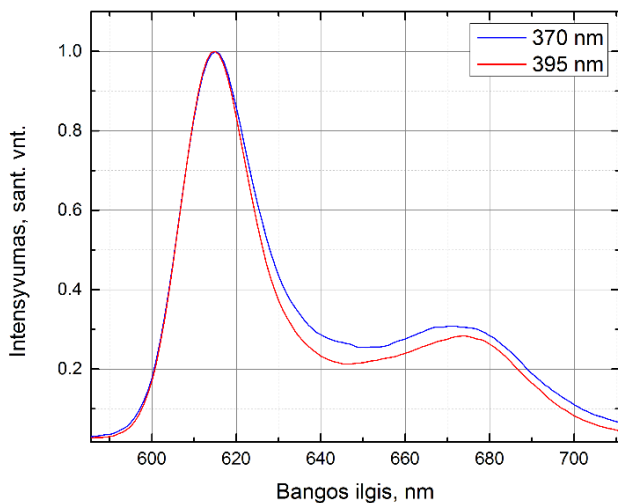
2 graf. Hp DHC ir Hp DME tirpalų sugerties spektrai prieš švitinimą
a - $10^{-6} M$ koncentracija, b - $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracija (Q juostos)

Grafike a S_j skirtumai tarp dviejų medžiagų dar akivaizdesni. Esant labai mažoms koncentracijoms (10^{-6}) Hp vandeniniuose tirpaluose pusiausvirieji agregatai suyra ir tirpale egzistuoja tik monomerai ir kovalentiškai surištos struktūros, S_j slenkasi į ilgabangę spektro sritį – 395 nm [11]. Hp DME S_j maksimumas yra labai artimas teorinei vertei, tai parodo jog medžiaga šioje koncentracijoje yra monomerizuota, joje dominuoja monomerai, tačiau matomas petys ties 375 nm rodantis ir nesuirusių agregatų įtaką. Hp DHC net ir tokioje mažoje koncentracijoje (nors ir monomerų juostos petys labiau įžiūrimas lyginant su $5 \cdot 10^{-6} M$) vis dar dominuoja agregatų juosta, tai parodo didelį šios medžiagos agregacijos laipsnį. Grafike b matome $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracijos Hp izomerų sugerties Q juostas vandeniniuose tirpaluose. Hp DHC juostos lyginant su Hp DME yra pasislinkę į ilgabangę spektro pusę. Tos pačios medžiagos Q juostų praplatėjimas bei poslinkis į ilgabangę spektro pusę rodo didesnę agregaciją, kadangi medžiagos yra panašios koncentracijos, tokį poslinkį paaiškina didesnis Hp DHC agregacijos laipsnis. [18]

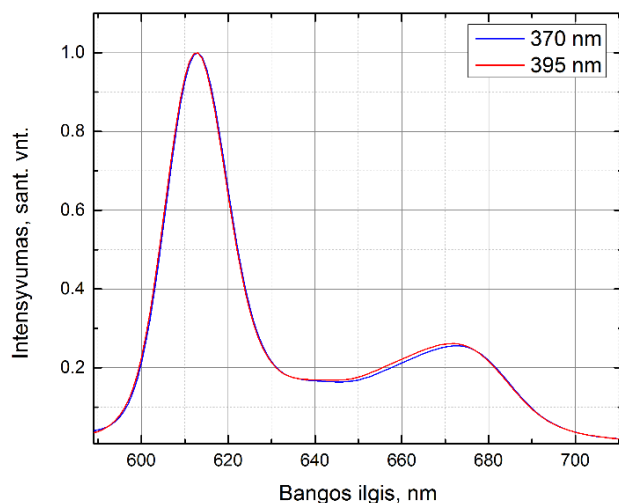


3 graf. a - 10^{-6} M koncentracijos Hp DME ir Hp DHC fluorescencijos spektrai žadinant 370 nm
b - 10^{-6} M Hp DME ir Hp DHC fluorescencijos gesimo laikas matuojant 613 nm, žadinant 405 nm.

Grafike *a* matome Hp DME ir Hp DHC fluorescencijos spektrus žadinant 370 nm bangos ilgio šviesa, pasirinktas būtent šis bangos ilgis, kadangi tokią šviesą geriausiai sugeria medžiagos agregatai. Hp DHC pasislinkęs į raudonąją spektro pusę Hp DME atžvilgiu per 3 nm, taipogi antras Hp DHC maksimumas (675 nm) yra prasiplėtęs į ilgabangę spektro sritį. Kadangi medžiagos tos pačios koncentracijos bei žadintos tomis pačiomis sąlygomis, šie spektrai patvirtina didesnę Hp DHC medžiagos agregacijos laipsnį. [18] Grafike *b* abiejų medžiagų fluorescencijų gesimai atidėti logaritminėje skalėje, matome tiesę kadangi gesimas šiame bangos ilgyje yra monoeksponentinis (vienos medžiagos įnašas). Tiesės persikloja, o apskaičiavus gesimo trukmes medžiagų laikai paklaidų ribose sutampa, tai leidžia teigti, kad turime tas pačias medžiagas (fluorescencijos gyvavimo trukmių informacija surašyta pirmoje lentelėje 32 psl.). Gesimo kinetikų skirtumai pasireiškia matuojant gesimus ties antru maksimumu, toje vietoje Hp DHC turime dvieksponentį gesimą kadangi ten gana didelį įnašą turi medžiagos agregatai kurių gesimo laikas yra trumpesnis nei monomerų. Matuojant gesimus ties 675 nm bei 690 nm gauname skirtingas agregatų amplitudes (690 nm > 670 nm). Iš to seka, kad agregatai daugiausiai fluorescuoja ilgabangėje spektro srityje. Matuojant Hp DME fluorescencijos gesimą ties 672 nm agregatų įnašas mažesnis nei Hp DHC tirpale, taigi gesimo kinetikos taip pat patvirtina didesnę agregacijos laipsnį Hp DHC medžiagoje. Hp DHC agregatų fluorescencijos gesimo trukmė trumpesnė nei Hp DME kadangi jie suformuoja didesnius junginius dėl ko turime didesnę energijos pernašą. [18]



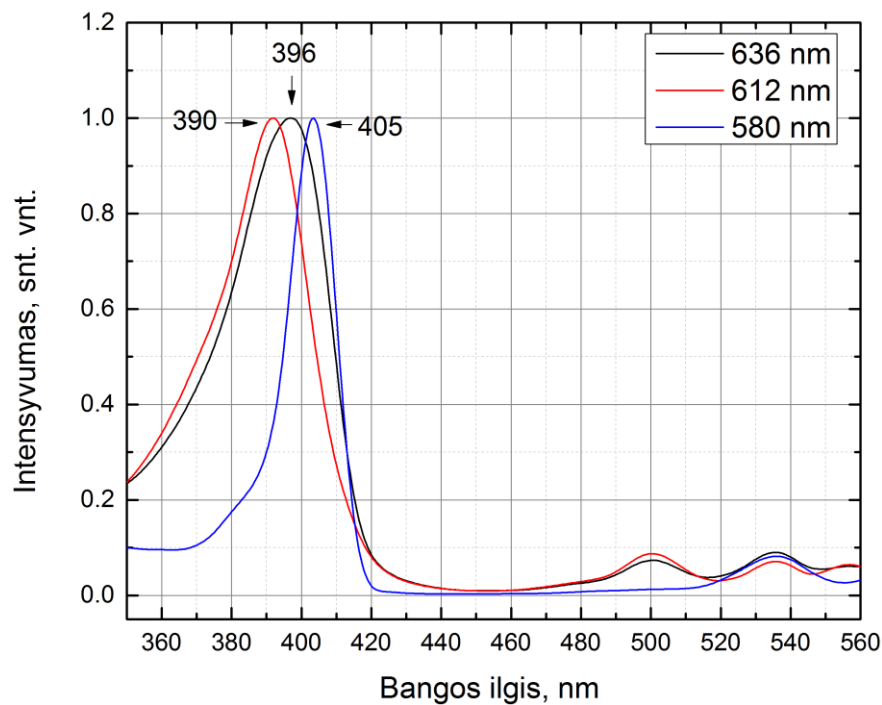
a



b

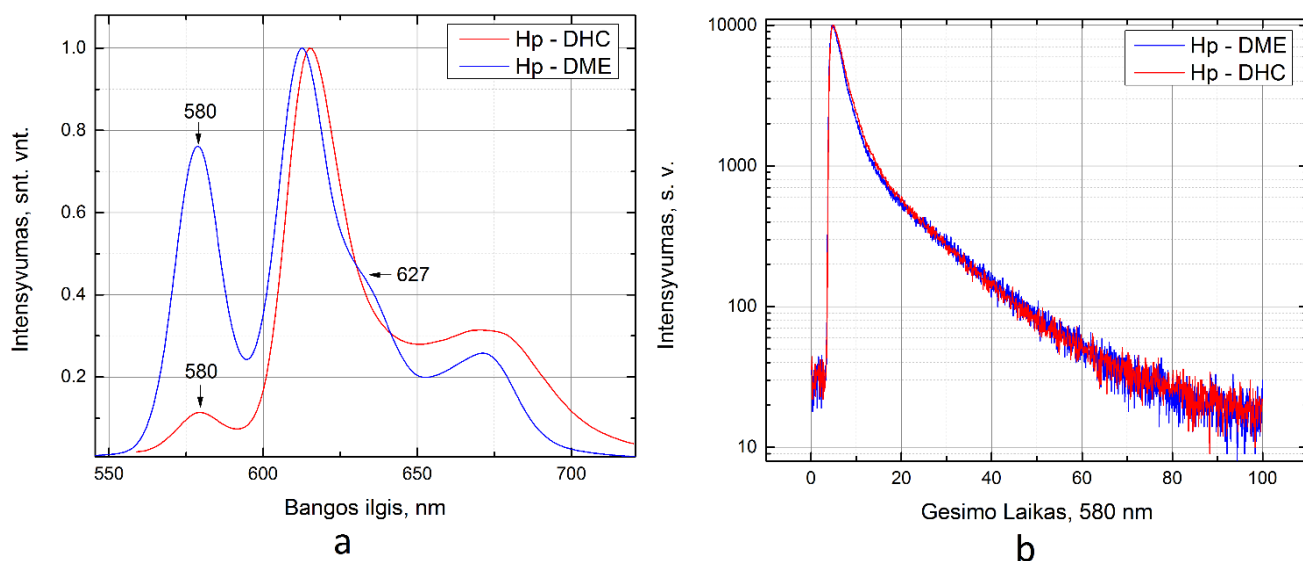
4 graf. 10^{-6} M koncentracijos tirpalų fluorescencijos spektrų priklausomybė nuo žadinimo bangos ilgio
a – Hp DHC, b- Hp DME

Šiuose grafikuose matome fotosensibilizatorių fluorescencijos priklausomybę nuo žadinimo bangos ilgio. Hp DHC atveju (a grafikas) šviečiant agregatų sugerties zonoje (370 nm) matome juostos slinkimąsi į ilgabangę spektro sritį ties pirmu maksimumu ir juostos praplatėjimą ties antru maksimumu. Hp DME fluorescencijos spektruose šviečiant į monomerų (395 nm) ir agregatų (370 nm) sugerties zonas skirtumų beveik nematome. [11] Tai dar vienas įrodymas, kad agregatai Hp DHC tirpale turi didesnę įtaką nei Hp DME. Taip pat, stebint fluorescencijas pastebėtas kitos medžiagos maksimumas ties 580 nm. Matuojami žadinimo spektrai siekiant nustatyti atskirų sričių žadinimo spektrus bei identifikuoti rastą medžiagą.



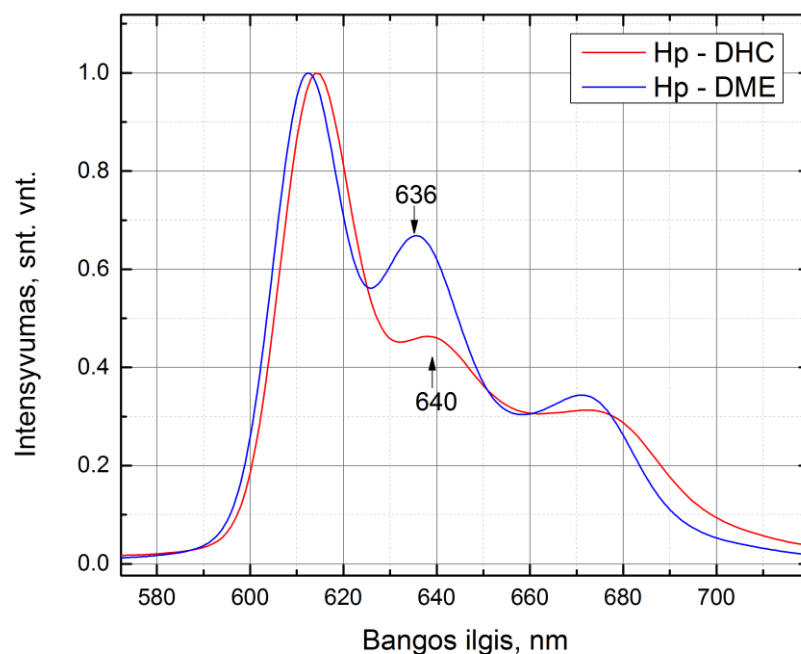
5 graf. 10^{-6} koncentracijos Hp DME žadinimo spektrai fiksuojant skirtingus fluorescencijos bangos ilgius

Šiame grafike matome skirtumus tarp žadinimo spektrų fiksuojant skirtingus fluorescencijos bangos ilgius. Fiksuotas 612 nm fluorescencijos bangos ilgis rodo hematoporfirino žadinimo spektrą, todėl šis maksimumas yra ties 390 nm (Hp monomerų sugertis). Matuojant ties 580 nm (pastebėtos medžiagos maksimumas) matome stiprų žadinimo spektro poslinkį į 405 nm bei ryškius skirtumus Q juostų srityje, tai parodo, kad 580 nm fluorescuoja ne hematoporfirinas, o antrinė medžiaga. Norint išryškinti pastebėtos medžiagos fluorescenciją, turime žadinti 405 nm bangos ilgio šviesa. 636 nm fiksuojamas bangos ilgis atstovauja abi medžiagas, todėl žadinimo juosta platesnė, o maksimumas yra abiejų medžiagų maksimumų superpozicija.



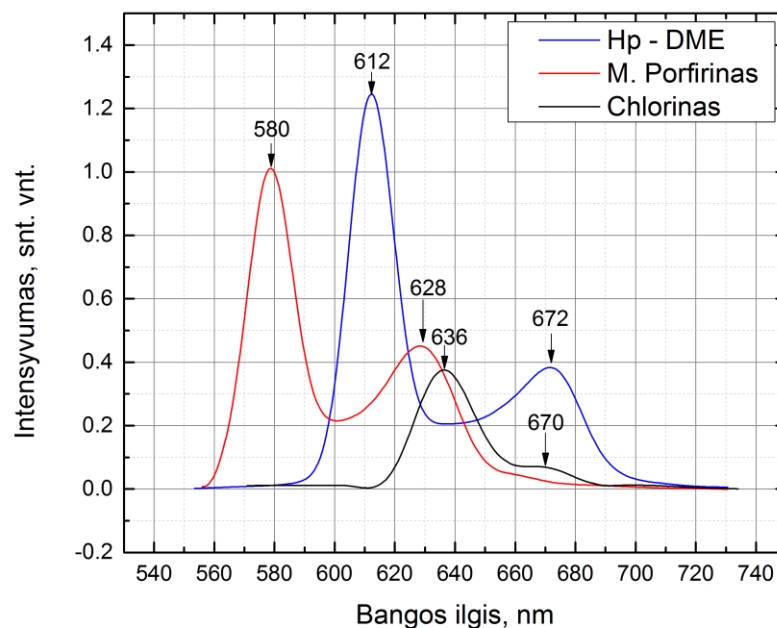
6 graf. a – 10^{-6} M koncentracijos kontrolinių tirpalų fluorescencija po 1 mėnesio žadinant 405 nm
 b – fotosensibilizatorių fluorescencijos gesimo trukmė ties 580 nm, žadinant 405 nm

Grafike *a* matome kaip laikui bėgant pasikeitė kontrolinių tirpalų fluorescencijos spektrai neveikiant jų šviesa. Iškeliama hipotezė, kad laikui bėgant Hp medžiagai sąveikaujant su tirpalo molekulėmis arba kiuvete gaminasi ši medžiaga. Juosta ties 580 nm Hp DME tirpale kur kas intensyvesnė nei Hp DHC, taip pat išryškėja maksimumas ties 627 nm. Grafike *b* matome abiejų medžiagų gesimo kinetikas logaritminėje skalėje matuojant ties 580 nm. Apskaičiavus gesimus nustatyta, kad abiejų medžiagų gesimo laikas vienodas (1 lentelė, 32 psl.) tai parodo, kad tiek Hp DMC tiek Hp DME tirpaluose laikui bėgant formuojasi ta pati medžiaga. Matuojant Hp DME gesimo laiką ties 627 nm gauname dvieksoponentį gesimą, vienas iš laikų sutampa su 580 nm gesimo laiku, iš to seka, kad tai antrasis šios medžiagos maksimumas. Išmatavus 627 nm fluorescencijos gyvavimo trukmę Hp DHC tirpale taip pat matomas pastebėtos medžiagos įnašas, kai tuo tarpu fluorescencijos spektre medžiagos nematome dėl juostų persiklojimo ir mažo intensyvumo.



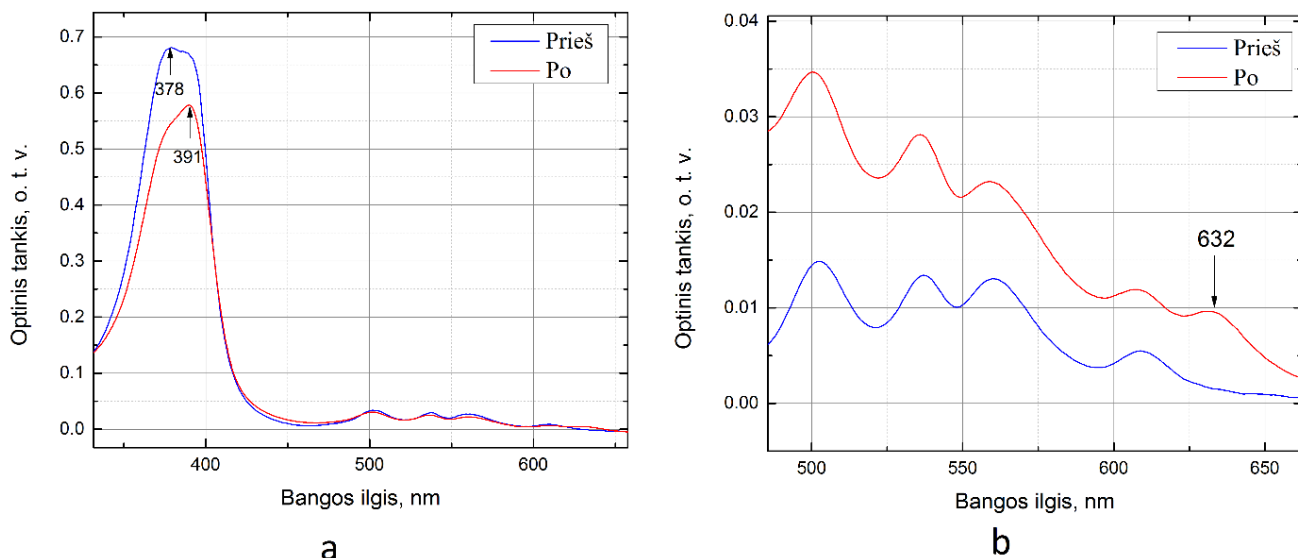
7 graf. 10^{-6} M koncentracijos Hp DHC ir Hp DME tirpalų fluorescencijos spektrai po švitinimo žadinant 395 nm

Siekiant stebėti fototransformacijas medžiagos buvo švitinamos 405 nm lazerio šviesa po 20 min (40 J/cm^2 dozė). Medžiaga ties 580 nm sunyko, tai rodo, kad medžiaga yra nestabili ir veikiant šviesai suyra (šviesta lazeriu ties 580 nm fluorescencijos juosta turinčios medžiagos sugerties maksimumu). Taip pat matome atsiradusius naujus maksimumus ties 636 nm ir 640 nm, tai fotoproduktai. Hp DME fotoprodukto pasigamino kur kas daugiau nei Hp DHC. Kadangi Hp DHC turi didesnę agregacijos laipsnį šioje medžiagoje susidaro didesni agregatai kurie sunkiau skyla veikiant šviesa (10 graf.). Hp DME medžiaga turi kur kas daugiau pusiausvirųjų dimerų iš kurių gaminasi fotoproduktas, dėl šios priežasties fotoprodukto atsiranda kur kas daugiau. [11] Matuojant gesimo kinetikas ties fotoprodukto fluorescencija (636 nm ir 640 nm) gauname dvieksoponentį gesimą kadangi ten turime Hp ir fotoprodukto įnašą. Programine įranga *Origin* apdorojant informaciją, įsistačius žinomus Hp gesimo laikus, gauname fotoprodukto gesimo laikus (1 lentelė, 32 psl.). Laikai labai panašūs todėl galima teigti, kad abejuose medžiagose formuojasi tos pačios rūšies fotoproduktas. Naudojantis medžiagų amplitudėmis gesimo kinetikose, galime nustatyti tikslų jų įnašą į fluorescenciją tame bangos ilgyje. Fotoprodukto įnašas matuojant kinetikas aptinkamas ir ties antru maksimumu (672 nm – 680 nm) tai parodo, kad nors ir medžiagos nesimato fluorescencijos spektre, ją galime atpažinti pasinaudojant kinetine spektroskopija.



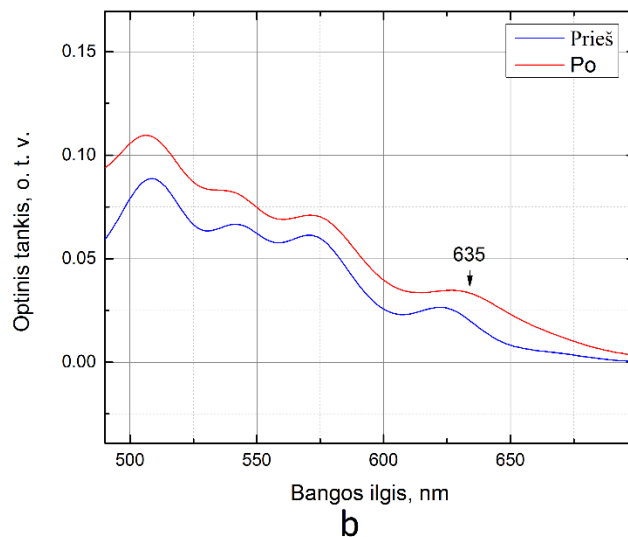
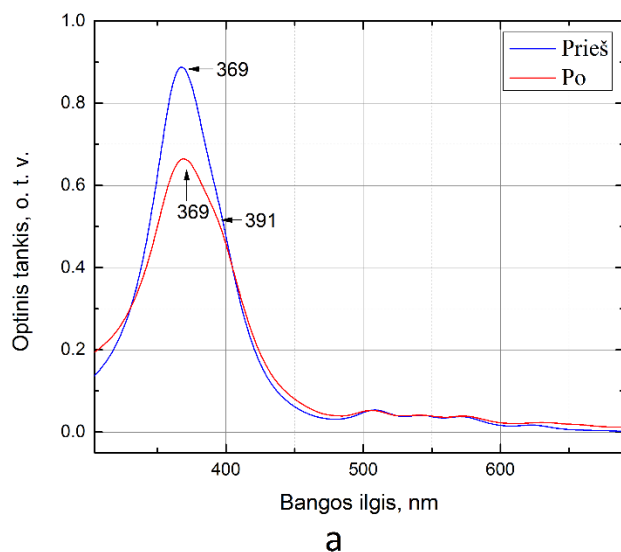
8 graf. Sumodeliuoti Hp DME tirpale esančių medžiagų atskiri fluorescencijos spektrai

Grafike matome modeliavimo būdu atskirtus grynus medžiagų spektrus. Gautų medžiagų spektrai lyginami su kitų fluorescuojančių medžiagų spektrais esančiais PhotochemCAD programos kataloge. Pagal fluorescencijos ir žadinimo spektrus nustatyta, kad 580 nm ir 628 nm fluorescencijos maksimumus turinti medžiaga yra panašiausia į dvi medžiagas kataloge: Magnesium octeathylporphyrin ir Zinc octeathylporphyrin. Šių medžiagų cheminė sudėtis itin panaši į hematoporfirino, o tai tik patvirtina, kad sąveikos su tirpikliu arba kiuvete metu atsirado šios klasės (metalo porfirino) medžiaga. Pagal fluorescencijos ir žadinimo spektrus taip pat nustatyta, kad 636 nm ir 670 nm fluorescencijos maksimumus turinti medžiaga yra panašiausia į chloriną. Hipotezė tikėtina, nes chlorinas nuo hematoporfirino skiriasi tik viena hidrinta jungtimi pirolo žiede, o vykstant fotooksidacinio tipo reakcijai (II tipo reakcija) gali formuotis chlorino tipo fotoproduktas. [11] Šią hipotezę taip pat patvirtina sugerčių spektrų pokyčiai (9 graf.). Taip pat šių medžiagų gesimo laikai sutampa su teorinėmis vertėmis (1 lentelė, 32 psl.) (metalo porfirinai vandeniniuose tirpaluose 2 – 3 ns, chlorinai - 3 – 6 ns) [11]. Žinant, kad 580 nm medžiaga yra metalo porfirinas, kurio cheminė struktūra nuo Hp skiriasi tik metalo jonu tetrapirolo centre, galime teigti, kad Hp DME jis gaminasi daug greičiau (6 graf.), nes tame tirpale yra daugiau monomerų į kuriuos metalo jonui yra daug lengviau patekti nei į agregatus, kurie dominuoja Hp DHC medžiagoje. [18]



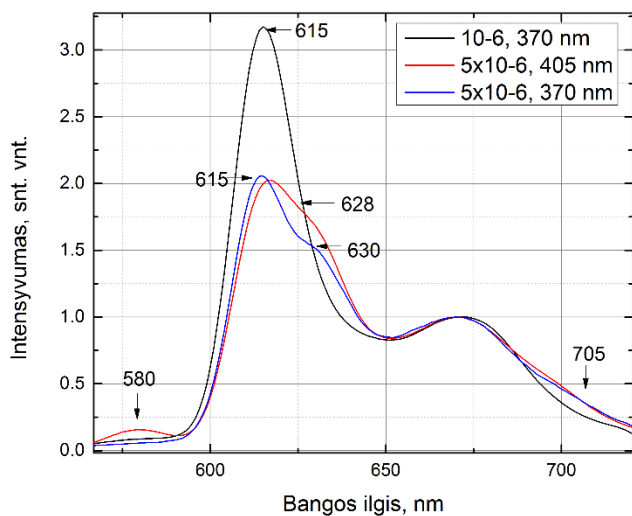
9 graf. a - $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracijos Hp DME tirpalo sugerties spektras prieš ir po švitinimo
b – Hp DME tirpalo Q juostų pokyčiai po švitinimo

Toliau stebėti fotosensibilizatorių sugerčių spektrų pokyčiai po švitinimo. Grafike *a* matome kaip Hp DME *Sj* po švitinimo pasislenka iš 378 nm į 391 nm, pusiausvirieji dimerai iš kurių gaminasi fotoproduktas veikiami šviesos yra suardomi, todėl agregatų ir monomerų santykyje padaugėja monomerų, tačiau vis dar matomas agregatų juostos petys trumpabangėje spektro pusėje. Sunormavus spektrą gauname, kad juosta po švitinimo yra praplatėjus į ilgabangę spektro pusę (fotoprodukto chlorino sugerties įtaka). [11] Grafike *b* stebime Hp DME Q juostų pokyčius. Po švitinimo matome atsiradusią naują penktą Q juostą ties 632 nm, ši juosta atsiradusi ilgabangėje spektro srityje yra fotoprodukto įnašas, kadangi chlorinas pasižymi sugertimi tolimesniuose spektro ruožuose lyginant su porfirinais. [13] Juosta gana ryški, tai parodo, kad fotoprodukto pasigamino santykinai daug. Taip pat stebimas blukimo efektas, medžiagai sąveikaujant su šviesa jos mažėja, medžiaga suyra arba pakeičia savo struktūrą todėl sugerties intensyvumas po švitinimo yra mažesnis.

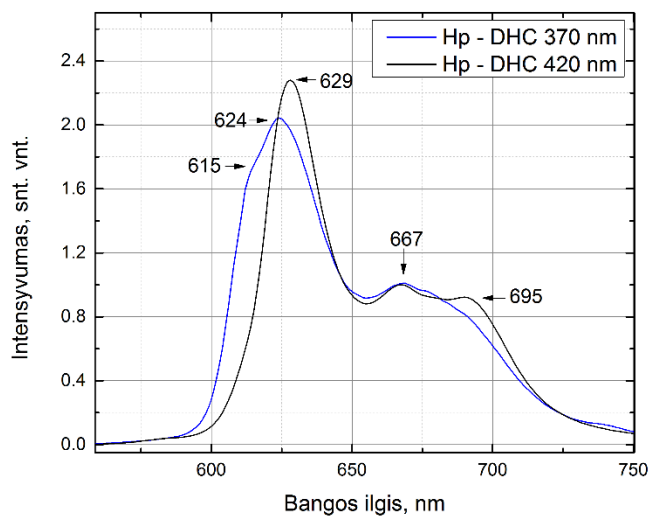


10 graf. a - $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos Hp DHC tirpalo sugerties spektras prieš ir po švitinimo
b - Hp DHC tirpalo Q juostų pokyčiai po švitinimo

Kiek kitokie pokyčiai matomi Hp DHC medžiagoje po švitinimo. S_j maksimumas išlieka toje pačioje vietoje, kadangi šioje medžiagoje dominuoja didesni agregatai kurie yra sunkiau ardomi veikiant šviesai, tačiau visgi matomas ryškesnis monomerų petys ties 391 nm. Taip pat matome S_j juostos praplatėjimą ilgabangėje spektro pusėje (chlorino įnašas) bei trumpabangėje spektro pusėje (agregatų „skeveldros“ - suirę pirolo žiedai atsiradę dėl medžiagos sąveikos su šviesa). [19] Taip pat stebimas blukimas, po švitinimo sugerties intensyvumas mažesnis nei prieš. Grafike b penktos Q juostos nematome, kadangi Hp DHC sugertis pasislinkusi į ilgabangę spektro sritį, todėl 4 Hp Q juosta persikloja su fotoproducto juosta ir matome tik praplatėjimą ties 635 nm. Lyginant su Hp DME stebimas mažesnis juostos intensyvumas dėl mažesnio susidariusio fotoproducto kiekio.



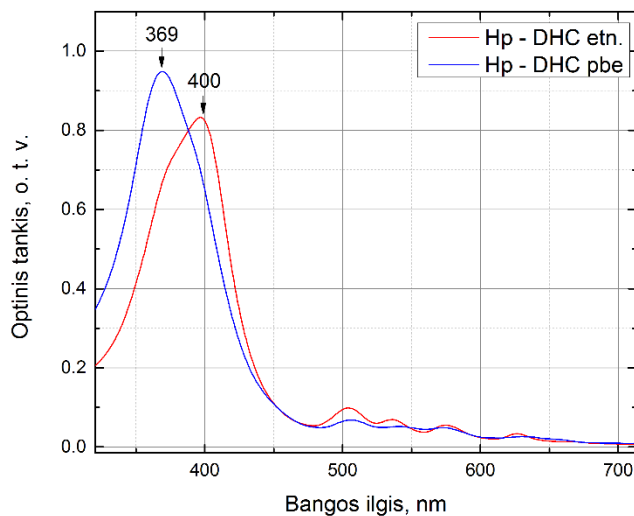
a



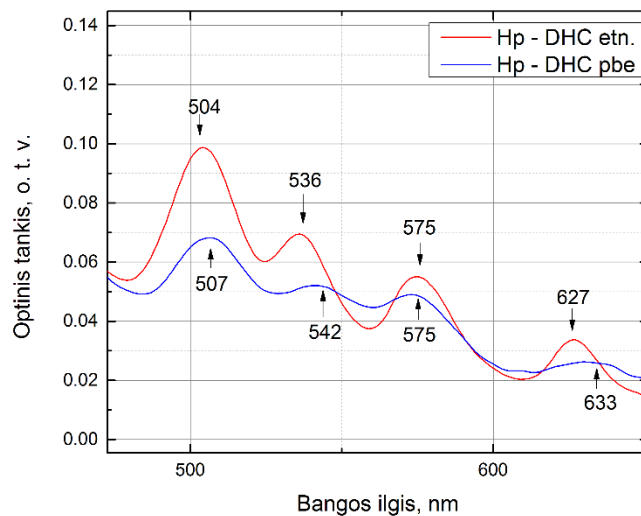
b

11 graf. a - $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ir 10^{-6} M koncentracijos Hp DHC tirpalų fluorescencijos spektrai
b - $8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ koncentracijos Hp DHC tirpalo fluorescencijos spektrai

Pastebėta, kad vienoje iš Hp DHC $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ koncentracijų stebime papildomą fluorescencijos maksimumą ties 628 - 630 nm bei praplėstą antro maksimumo šlaitą ilgabangėje spektro srityje ties 705 nm. Grafike a matome 10^{-6} M koncentracijos tirpalo fluorescenciją kurioje išvelgiame tik hematoporfiriną, $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ koncentracijos tirpale turime priemaišą. Žadinant 370 nm maksimumas ties 630 nm, o 405 nm žadinimo atveju prie priemaišos maksimumo prisideda metalo porfirino antro maksimumo įnašas, todėl fluorescencija intensyvesnė bei pasislinkusi į 628 nm. Įrodant, kad priemaiša tirpale atsirado ne per tirpalo pagaminimo klaidą, fosfatiniame buferyje praskiesti dar keli Hp DHC tirpalai. Grafike b matome pagamintą $8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ koncentracijos Hp DHC tirpalą kuriame priemaiša yra dominuojanti. Šviečiant 370 nm matome hematoporfirino maksimumą ties 615 nm, bei antrą maksimumą ties 624 nm (manoma, kad tai Hp ir priemaišos maksimumų vidurkis). Žadinant 420 nm, juosta slenkasi iki 629 nm, antras maksimumas - 695 nm, kadangi Hp sugertis 420 nm yra nedidelė medžiaga yra nukonkuruojama priemaišos kurios sugertis yra ilgabangėje spektro srityje. Taip pat stebime maksimumą ties 667 nm, tai galimai yra priemaišos fotoproduktas. Norint išsiaiškinti kokią turime priemaišą Hp DHC tirpinamas etanolyje ir švitinamas.



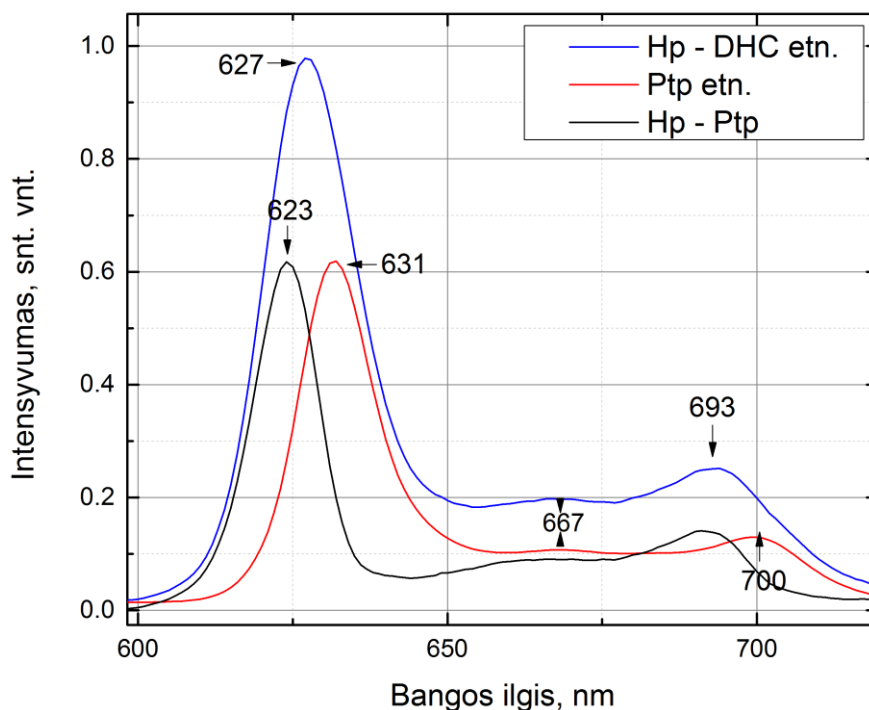
a



b

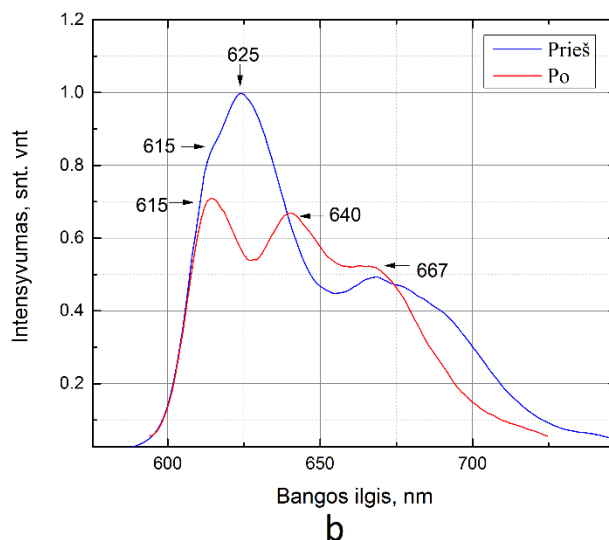
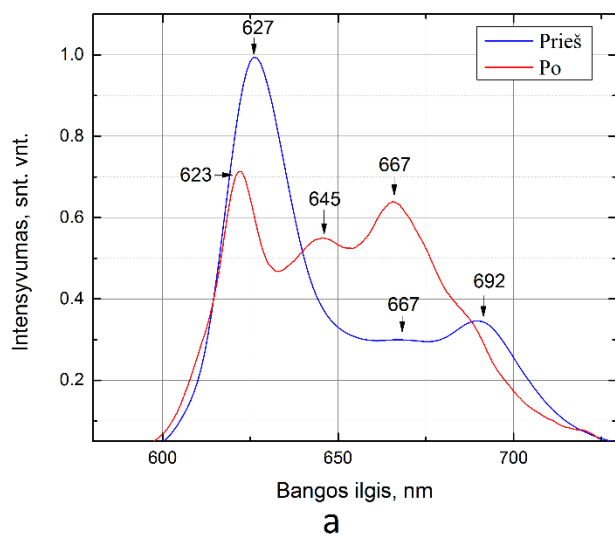
12 graf. $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracijos Hp (DHC) fosfatiniame buferyje bei etanolyje

Šiuose grafikuose matome Hp DHC sugerties pokyčius keičiant terpę iš vandeninio tirpalo į etanolio tirpalą. Grafike *a* etanolio (95%) tirpale stebime stiprius pokyčius S_j. Kadangi etanolis yra spiritinė terpė, jis monomerizuoja medžiagą (skaldo agregatus), kaip matome Hp DHC etanolyje S_j juostos maksimumas slenkasi iš 369 nm (agregatų juosta) į 400 nm (monomerų juosta). Pati juosta praranda dalį šlaito trumpabangėje srityje bei praplatėja ilgabangėje spektro srityje (tai gali būti ir priemaišos įtaka). Grafike *b* matome Q juostos pokyčius. Kadangi medžiagos agregatai skyla ir tirpale santykinai padaugėja monomerų, stebime Q juostų poslinkius į trumpabangę spektro sritį, bei juostų susiaurėjimą (monomerų sugerties juostos siauresnės nei agregatų). [11]



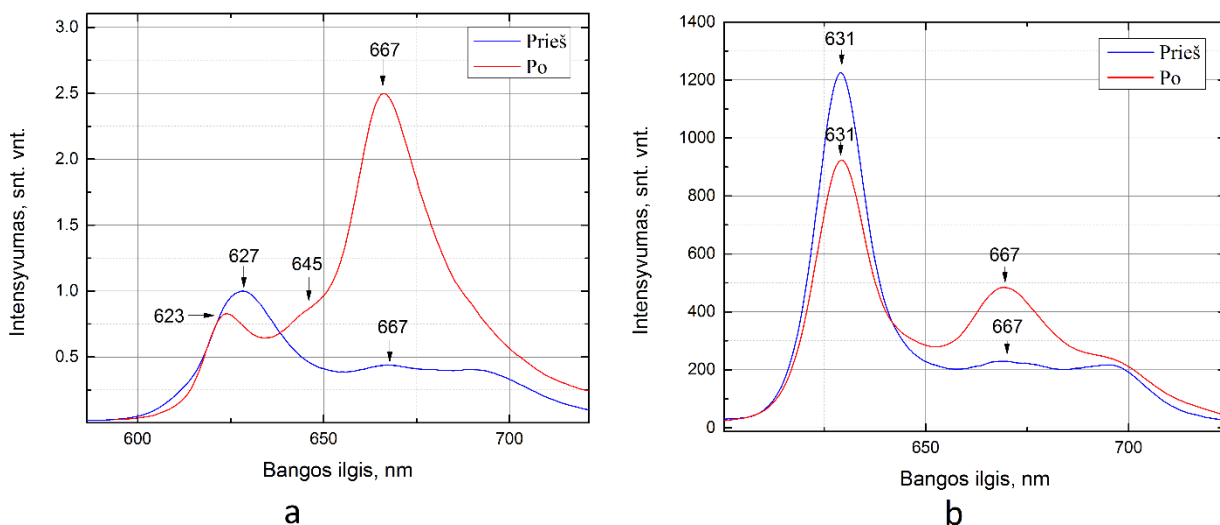
13 graf. $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos Hp DHC bei protoporfirino etanolyje fluorescencijos spektrai
žadinant 395 nm

Grafike matome Hp DHC fluorescenciją etanolio tirpale (mėlyna spalva). Pirmas maksimumas ties 627 nm parodo, kad medžiagoje yra ne vien hematoporfirino, remiantis literatūra pirmas Hp fluorescencijos maksimumas etanolio tirpale varijuoja tarp 620 – 623 nm. [20] Taip pat pirmoji juosta yra platesnė nei įprasta, panašu, kad joje įsiterpia dvi medžiagos. Pagal 667 nm fotoproducto maksimumą etanolyje manoma, kad priemaiša yra protoporfirinas. [21] Pasimatavus gryno protoporfirino fluorescencijos spektrą etanolyje įsistatome jį šalia Hp DHC spektro. Kaip matome fotoproductų maksimumai sutampa, o atėmus Ptp spektrą iš Hp DHC gauname galimą hematoporfirino spektrą etanolyje (juoda spalva). Protoporfirino priemaiša paaiškintų pastebėtą maksimumą ties 630 nm buferyje, taip pat antrojo maksimumo praplatėjimą, kadangi protoporfirino fluorescencija slenkasi į ilgabangę spektro sritį Hp atžvilgiu. Protoporfirinas netirpsta vandeniniuose tirpaluose todėl keliama hipotezė, kad Hp DHC gamybos metu atsiradus Ptp priemaišai prie jos gali prikibti nedidelis kiekis rūgšties ar kitos medžiagos galinčios ištirpinti Ptp vandeniniuose tirpaluose tam tikrų koncentracijų ribose. Etanolyje bet kokioje tirpalo koncentracijoje matome priemaišos įnašą, nes etanolyje Ptp tirpsta. [22]



14 graf. $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracijos Hp DHC a- etanolyje bei b – buferyje prieš ir po švitinimo žadinant 370 nm

Norint patvirtinti protoporfirino priemaišos hipotezę švitinami $5 \cdot 10^{-6} M$ koncentracijos etanolio bei buferio tirpalai 405 nm lazerio šviesa 20 min ($40 J/cm^2$ dozė). Grafike a matome, kad Hp DHC etanolio tirpalo fluorescencijos spektre po švitinimo nublunka dalis pirmos juostos ilgabangėje spektro srityje, maksimumą ties 627 nm pakeičia siauresnės juostos 623 nm maksimumas. Būtent šiame bangos ilgyje gautas numanomo Hp pirmas maksimumas etanolio tirpale, Ptp spektrą atėmus iš Hp DHC (13 graf.), o išmatavus gesimo laiką ties 623 nm gauname laiką būdingą Hp molekulei (1 lentelė, 32psl.). [20] Tai patvirtina, kad pirmoji Hp DHC etanolio tirpalo fluorescencijos juosta susideda iš dviejų medžiagų įnašo, hematoporfirino ir protoporfirino. Spektre taip pat stebime atsiradusį Hp fotoproduktą ties 645 nm (5 nm poslinkis spiritiniame tirpale), priemaišos fotoproduktą ties 667 nm bei šlaito susiaurėjimą ilgabangėje spektro srityje. Grafike b stebime pokyčius po švitinimo buferiniame tirpale, Hp 615 nm maksimumas po švitinimo išlieka toje pačioje vietoje tik mažesnio intensyvumo dėl blukimo kurio metu pasigamina 640 nm fotoproduktas, 625 nm esantis maksimumas bei šlaitas ties antru maksimumu ilgabangėje spektro srityje pranyksta, protoporfirinas sąveikos su šviesa metu suyra. [21]



15 graf. a - $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos Hp DHC etanolinio tirpalo fluorescencijos spektras prieš ir po švitinimo; b – $5 \cdot 10^{-6}$ M koncentracijos gryno protoporfirino spektras prieš ir po švitinimo žadinant 420 nm

Grafike a matome Hp DHC etanolinio tirpalo fluorescencijos spektro pokyčius po švitinimo žadinant 420 nm. Žadinant šiuo bangos ilgiu fotoprodukto (667 nm) fluorescencijos juosta yra kur kas intensyvesnė, tai rodo, kad antrojo fotoprodukto sugertis yra stipriai pasislinkus į ilgabangę spektro sritį, kas yra būdinga protoporfirino fotoproduktui – chlorinui [21]. Iš šių grafikų galime spręsti, kad protoporfirinas yra labai nestabili medžiaga kuri sąveikos su šviesa metu pavirsta į fotoproduktą ties 667 nm, dėl šios priežasties po švitinimo mes galime matyti išryškėjusį stabilesnės Hp medžiagos fluorescencijos spektrą, bei itin padidėjusį maksimumą ties 667 nm dėl greitos protoporfirino fototransformacijos. Grafike b matome, kad gryno Ptp etanoliniame tirpale fotoproduktas formuojasi toje pačioje vietoje kaip ir mūsų turimo Hp DHC tirpalo antrasis fotoproduktas. Įrodymui pasitelkti fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimai. Apskaičiuota, kad tiek Hp DHC tiek Ptp tirpaluose 667 nm gesimas trunka beveik vienodą laiką (1 lentelė, 32 psl.). Visa tai įrodo, kad turimoje Hp DHC medžiagoje turime protoporfirino priemaišą, kuri formuoja chlorino fotoproduktą. Protoporfirino fotoprodukto gesimo laikas yra ilgesnis nei Hp fotoprodukto ($\sim 1,2$ ns skirtumas), kadangi Hp fotoproduktas chlorinas suformuoja dimerą su pačiu Hp, dėl to vykstant energijos pernašai gesimo laikas sutrumpėja. [20] [21]

1 lentelė Hp DHC, Hp DME ir Ptp tirpalų fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimai.

(- matuota po medžiagos švitinimo)*

Medžiaga (konc.)	Bangos ilgis (nm)	τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)	τ_3 (ns)	A ₃ (%)
	580	2.54	100	–	–	–	–
	615	14.65	100	–	–	–	–
Hp DHC (0.001 mM)	627	14.42	92	2.44	8	–	–
	675	14.33	84	4.2	16	–	–
	690	14.25	72	4.1	28	–	–
	580	2.47	100	–	–	–	–
Hp DME (0.001 mM)	612	14.88	100	–	–	–	–
	672	14.52	89	5.4	11	–	–
Hp DHC (0.001 mM)*	640	14.42	60	3.2	40	–	–
	675	13.85	81	3.1	7	4.1	11
Hp DME (0.001 mM)*	636	14.51	35	3	65	–	–
	672	14.21	78	2.9	12	5.2	10
Hp DHC (0.005 mM)*	667	14.32	71	4.6	25	3.2	4
	623	14.72	100	–	–	–	–
Hp DHC (0.005 mM)* etn.	645	14.53	44	3.3	56	–	–
	667	14.24	20	4.5	73	3.1	7
Ptp (0.005 mM)* etn.	667	14.07	47	4.4	53	–	–

IŠVADOS

1. Hp DHC agregacijos laipsnis vandeniniuose tirpaluose didesnis nei Hp DME, tirpale susidaro stabilesni, didesni agregatai, pasigamina mažiau fotoproducto ir metalo porfirino, taip pat būdingas mažesnis jautrumas šviesai.
2. Laikui bėgant, hematoporfirino tirpaluose kaupiasi metalo porfirinai suyrantys švitinant medžiagą.
3. Švitinant medžiagas, fototransformacijos metu susiformavusio hematoporfirino fotoproducto chlorino gesimo laikas $\sim 3,2$ ns yra trumpesnis nei chlorino monomero ~ 5 ns, kadangi medžiaga sudaro dimerą su Hp.
4. Optinės spektroskopijos metodais ištyrus ~ 92 % grynumo Hp DHC etanolinį tirpalą nustatyta, kad medžiagoje yra Ptp priemaiša. ~ 97 % grynumo Hp DME priemaišų nerandama.

Terpės įtakos tetrapirolių fluorescencijos gyvavimo trukmei tyrimai

SANTRAUKA

Spektrinių ir fotofizikinių fotosensibilizatorių savybių tyrimas reikalingas norint patobulinti FNT ir numatyti naujų fotosensibilizatorių paieškos kryptis. Šio darbo tikslas - optinės spektroskopijos metodais charakterizuoti ir identifikuoti tetrapiroolinius fotosensibilizatorius skirtinguose tirpaluose. Gautos medžiagos hematoporfirino dimetilo esteris (~ 97 % grynumo) ir hematoporfirino dihidrochloridas (~ 92 % grynumo). Iš šių medžiagų pagaminami skirtingų koncentracijų tirpalai skiedžiant jas fosfatiniame buferyje (7,2 pH).

Siekiant nustatyti tirpalų sugerčių skirtumus priklausančius nuo koncentracijos, atilikti sugerties spektrų matavimai *Avantes-3648* spektrofotometru. Hp DME tirpale stebimas didesnis agregatų ir monomerų santykio pokytis keičiant tirpalo koncentraciją. Nustatyta, kad Hp DHC turi didesnę agregacijos laipsnį, tirpale susidaro didesni, stabilesni agregatai, net mažose koncentracijose (10^{-6}) nestebime monomerizacijos. Hp DME tirpalas mažose koncentracijose monomerizuojasi, didesnėse vyrauja pusiausvirieji dimerai, medžiaga jautresnė šviesai.

Nustatant medžiagos spektrines savybes tirti fluorescencijos bei žadinimo spektrai *Perkin Elmer LS55* fluorimetru. Hp DHC fluorescencija pasislinkusi į ilgabangę spektro sritį nuo Hp DME dėl didesnio agregacijos laipsnio. Abiejų medžiagų spektruose pastebėta, kad laikui bėgant hematoporfirino sąveikos su tirpikliu ar kiuvete metu tirpale atsiranda antrinė medžiaga. Spektrų modeliavimo ir fluorescencijos gyvavimo trukmės metodais nustatyta, kad tai metalo porfirinai.

Norint stebėti medžiagos fototransformacijas, tirpalai švitinami 405 nm lazerio šviesa 20 min ($40 \text{ J} / \text{cm}^2$ dozė). Sumodeliavus gryną fotoprodukto spektrą bei ištyrus jo gesimo kinetikas nustatyta, kad Hp fotoproduktas yra chlorino tipo molekulė. Gauta fotoprodukto gesimo trukmė ~ 3,2 ns yra trumpesnė nei chlorino monomero ~ 5 ns, kadangi chlorinas su Hp suformuoja dimerą, dėl energijos pernašų gesimo laikas sutrumpėja.

Norėdami ištirti medžiagos grynumą turimas medžiagas tirpiname 95 % etanolyje. Optinės spektroskopijos metodais nustatyta, kad ~ 92 % grynumo Hp DHC medžiagoje turime protoporfirino priemaišą, tuo tarpu ~ 97 % Hp DME priemaišos nestebime.

Medium Influence for Tetrapyrrole Fluorescence Lifetime Study

SUMMARY

Research of spectral and photophysical properties of photosensitizers is necessary for improving photosensitized tumour therapy and providing new research trends. The purpose of this study is to characterize and identify tetrapyrrolic photosensitizers in different media using optical spectroscopy methods. Studied materials – hematoporphyrin dimethyl ester (~ 97 %) and hematoporphyrin dihydrochloride (~ 92 %) were used without further purification. Several solutions with different concentration were made by mixing materials with phosphate buffer (7,2 pH).

In order to find differences between Hp solutions, which depend on its concentration, absorption spectroscopy method was used. In Hp DME solution we observed bigger change in aggregates to monomers ratio while changing solution concentration. Hp DHC solutions have higher aggregation rate, bigger and more stable aggregates than Hp DME. Even at low concentrations (10^{-6}) Hp DHC solution doesn't reach monomerization, while monomers are dominating in Hp DME solutions at low concentrations.

To identify composition of Hp solutions fluorescence and fluorescence excitation spectroscopy methods were used. From results of fluorescence lifetime and fluorescence spectroscopy, new material – metal porphyrin was found and identified, which could have been formed from hematoporphyrin interaction with a quartz cuvette or a solvent.

To monitor differences, which are caused because of photosensitizers phototransformations, light irradiation was applied on Hp solutions using a 405 nm pulsed laser for 20 min ($40 \text{ J} / \text{cm}^2$ dose). After light exposure a new substance was observed. Analyzing properties of fluorescence and fluorescence excitation spectra, new photoproduct was recognized as a chlorin-type molecule. Hp solution absorption spectrum after exposure also supports hypothesis about photoproduct origin (a shift of the Soret band maximum towards long-waved spectral side and the appearance of fifth Q band).

To evaluate purity of studied hematoporphyrins, ethanolic solutions (95 %) were made. Using optical spectroscopy methods it was found that ~ 92 % purity Hp DHC solution has admixture of protoporphyrin, while no admixture was found in ~ 97 % purity Hp DME.

LITERATŪRA

- [1] Rotomskis R., Streckytė G. Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje.- Vilnius: VU I-kla, 2007.- 182 p.
- [2] NASA, 2013 03 < <http://imagine.gsfc.nasa.gov>> (2016 01 04)
- [3] Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija) / R. Rotomskis, G. Streckytė, S. Bagdonas, J. Venius.- Vilnius: VU I-kla, 2008.- 249p.
- [4] Fluorescencinis vaizdinimas biomedicinoje: mokomoji knyga / R. Rotomskis., E. Žurakauskas, E. Žurakauskienė ir kt.- Vilnius: VU I-kla, 2008.- 222p.
- [5] Matulis D. Baltyminė fizikinė chemija.- Kaunas: Technologija, 2008.- 149p. <<http://www.ibt.lt/>> (2016 01 06)
- [6] Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014 <<http://www.pnas.org/>> (2016 01 06)
- [7] Characterization of spectral FRET imaging microscopy for monitoring nuclear protein interactions / Y. Chen, P. Mauldin, Richard N. Day, A. Periasamy.- 2010 05 24.- 29p.
- [8] Boens N., Ameloot M. Fluorescence methods and applications / Series editor O.S.Wolfbeis.- 2008.- 493p.
- [9] Vengris M. Kinetinė spektroskopija: paskaitų konspektas.- Vilnius, 2006 – 2008.- 71p.
- [10] Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos/ G. Streckytė, J. Didžiapetrienė, V. Kirvelienė ir kt.- Vilnius: ProgreTus, 2008.- 155p.
- [11] Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai: monografija/ R. Rotomskis, G.Streckytė, L. Griciūtė.- Vilnius: Spauda, 2002.- 273p.
- [12] Disaggregation effects on hematoporphyrin derivative in the presence of surfactants at different concentrations:temperature dependance / Cubbedu R., R. Ramponi, G. Bottioli.- Florence.- 1986.- 701p.
- [13] Excitonic interactions in covalently linked porphyrin dimers / Selensky R., D. Holten, M.W. Winsdor ir kt. Chem.Phys.- 1981. -60p.
- [14] Andreoni A., R. Cubeddu Time-resolved fluorescence measurments on porphyrins and furocoumarins.- 1984.- 424p.

- [15] U.S. national library of medicine, 2014 05 < <http://chem.sis.nlm.nih.gov/>> (2016 01 10)
- [16] VU Biofotonika: Aparatūros aprašymas, 2016 <<http://www.biofotonika.ff.vu.lt/>> (2016 01 10)
- [17] Vengris M. Kinetinė spektroskopija: paskaitų konspektas.- Vilnius, 2006 – 2008.- 71p.
- [18] Porphyrins and Metalloporphyrins: Versatile Circular Dichroic Reporter Groups for Structural Studies / X. Huang, K. Nakanishi, N. Berova.- New York; Columbia university.- 2000.- 255p.
- [19] Fluorescence spectra of hematoporphyrin and hematoporphyrin-diacetate aggregates in buffer solution/ R. Rotomskis, T.J. Aartsma,, A.J. Hoff.- Huygens Laboratory, State University.- Leiden, 1989.- 55p.
- [20] Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorin e6 in ethanol and aqueous solution/ B. Roeder, H. Wabnitz.- Humboldt-University.- Berlin, 1987.- 32p.
- [21] Characterization of the photoproducts of protoporphyrin IX bound to human serum albumin and immunoglobulin G/ L. Brancalion, S. Magennis, I. Samuel, E. Namdas.- Scottish PDT Centre, UK.- 2004.- 351p.
- [22] Ostroff J. The effect of ethanol on heme and porphyrin synthesis/ University of California.- 1981.- 72p.