

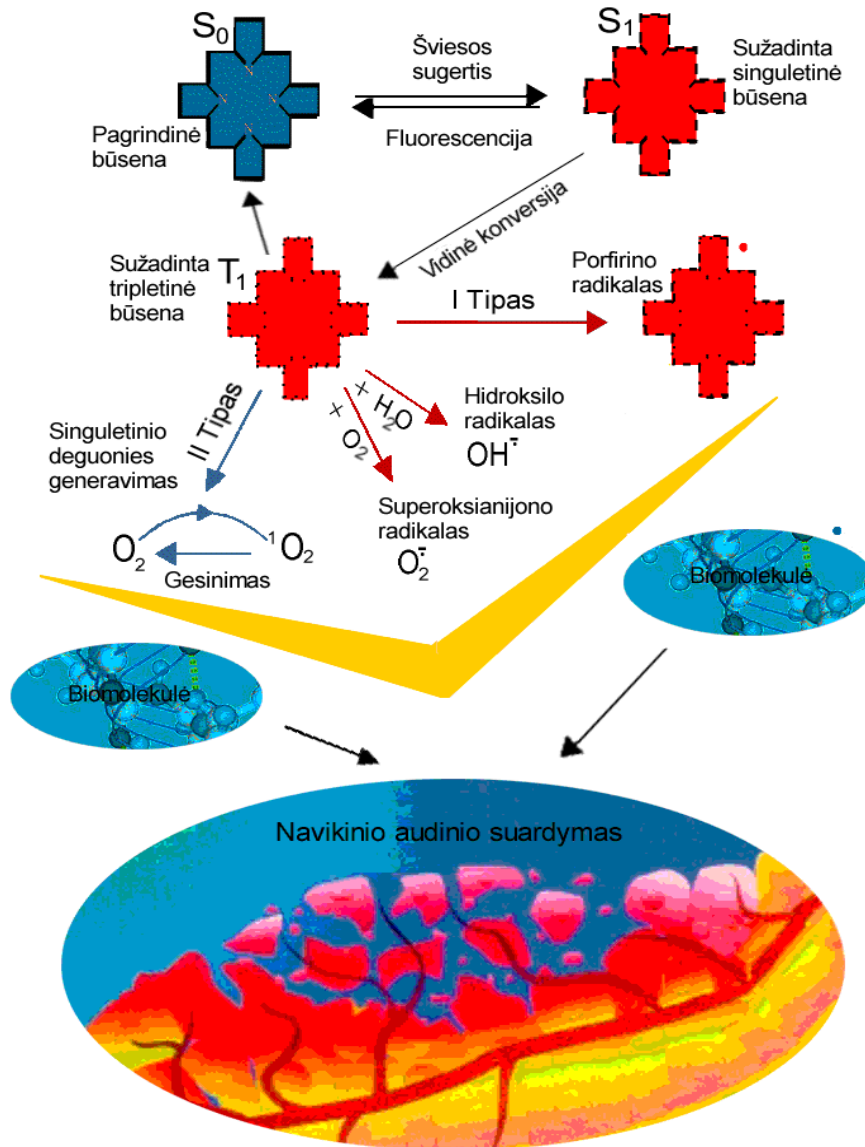
5. FOTOSENSIBILIZUOTI PROCESAI NAVIKŲ TERAPIJOJE

Gyvuose organizmuose vyksta įvairios fotocheminės reakcijos, svarbios ar net esminės jiems išgyventi. Tokios reakcijos prasideda tuomet, kai specifiniai biologiniai pigmentai – fotosensibilizatoriai – sugeria šviesos fotonus.

Kaip jau minėta 3–iame skyriuje, fotosensibilizacinio poveikio tyrinėjimo istorija prasideda nuo O.Rabo, profesoriaus H.Tapainerio studento Miuncheno farmakologijos institute, eksperimentų. Jis pastebėjo, kad paramecijos ląstelės, nuspalvintos akridinu, eozinu ar kitais pigmentais, apšviestos žūva. Tapaineris tą reiškinį pavadino fotodinaminiu poveikiu, tokiu pavadinimu siekdamas atskirti jį nuo fotosensibilizacijos reiškinio fotografijoje. Vėliau buvo nustatyta, kad fotodinaminiam poveikiui sukelti paramecijos ar eritrocitų ląstelėse reikalingas deguonis (Tappainer ir Jodlbauer, 1904). Kitų mokslininkų eksperimentai taip pat parodė, kad pigmentai greitina biologinių substratų oksidaciją deguonimi. Buvo prieita išvados, kad tiek organinių junginių destrukciją, tiek gyvų ląstelių fotopažaidas sąlygoja deguonimi fotosensibilizuota oksidacija.

Pagal šiuolaikinės FNT protokolą pacientui suleidžiamas fotosensibilizatoriaus tirpalas ir po atitinkamo laiko tarpo, kai pakankamai sensibilizatoriaus susikaupia navikiniame audinyje, jis švitinamas reikiamo bangos ilgio šviesa. Sugėręs šviesos fotonus sensibilizatorius sužadinas į aukštesnę energinę būseną, iš kurios prasideda seka virsmų, kurių metu susidaro toksiškos dalelės, dažniausiai aktyvios deguonies formos, sukeliančios biologines pažaidas, dėl kurių ląstelės žūva. Visą FNT procesą apimantis mechanizmas gali būti padalytas į dvi pakopas. Pirmoje pakopoje vyksta toksiškų dalelių generavimas ir jo efektyvumą lemia sensibilizatoriaus fotofizikinės ir fotocheminės savybės. Antroji pakopa – tai toksiškų dalelių poveikis ląstelėms.

Apibendrinta fotosensibilizacijos schema pateikta 5.1 paveiksle. Sugėrusi šviesos fotoną sensibilizatoriaus molekulė iš pagrindinės būsenos sužadina į trumpai gyvuojančią sužadintą singuletinę būseną. Ši būseną gyvuoja tik kelias nanosekundes, tad laikoma, kad per tokį trumpą laiką fotodinaminis poveikis neįmanomas. Sužadintos singuletinės būsenos energija išsisklaido arba išspinduliuojant (fluorescencija), arba nespinduliniu būdu (vidinė konversija). Vidinės konversijos būdu sužadavimo energija virsta šiluma, atiduodama tirpiklio molekulėms. FNT požiūriu svarbiausias sužadintos singuletinės būsenos energijos



5.1 pav. Apibendrinta fotosensibilizacijos schema

praradimo kelias yra nespindulinė interkombinacinė konversija į gana ilgai gyvuojančią tripletinę būseną, atsakingą už citotoksiškų dalelių generavimą: kuo didesnis sensibilizatoriaus sužadinimo į tripletą kvantinis našumas ir kuo ilgesnė tripletinės būsenos gyvavimo trukmė, tuo stipresnis sensibilizatoriaus citotoksinis poveikis (Takemura ir kt., 1989). FNT tinkamų fotosensibilizatorių tripletų kvantiniai našumai (ϕ_T) būna nuo 0,2 iki 0,7 (Moan ir kt., 1998), o tripletinės būsenos gyvavimo trukmės (τ_T) ilgesnės nei 500 nanosekundžių (Ochsner, 1997).

Sužadintos tripletinės būsenos energija gali būti išspinduliuojama grįžtant molekulei į singuletinę būseną – procesas vadinamas fosforescencija. Tačiau FNT svarbiausios yra iš tripletinės būsenos prasidedančios fotocheminės reakcijos pasibaigiančios navikinių ląstelių žūtimi.

Nuomonė, kad gyvoje ląstelėje ir organinių medžiagų tirpaluose pirminis fotosensibilizuotas poveikis yra vienodas, jau pirmojoje XX a. pusėje padėjo susiformuoti kelioms šio reiškinio molekulinį mechanizmų hipotezėms. Ryškiausios iš jų buvo trys: “pirminio fotodehidrinimo”, “mol–oksido” (sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės ir deguonies komplekso) ir “aktyvaus deguonies”. Teorijos, tvirtinančios, kad tik vienas iš tų mechanizmų apibūdina fotosensibilizuotą poveikį, nepasiteisino. 1948 metais G.O.Šenkas (Schenck) su bendradarbiais pasiūlė visas fotochemines reakcijas suskirstyti į du tipus pagal pirminių procesų pobūdį (Schenk, 1948). I tipui priskirtos reakcijos, kurių pradinė stadija – oksiduotų substratų dehidrinimas, II tipui – deguonies fotopernešimo reakcijos, kurių pradinė stadija – mol–oksido, t. y. komplekso tarp sužadinto fotosensibilizatoriaus molekulės ir deguonies, susidarymas.

Vėliau, 1968 metais, tokią reakcijų klasifikaciją patobulino K. S. Futas (Foote). Jis I tipo reakcijoms priskyrė visas reakcijas, kurių metu susidaro laisvi fotosensibilizatorių radikalai, II tipo reakcijoms – vyksmus, kurių metu sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės sąveikauja su deguonimi (Foote, 1968). Šiuo metu fotosensibilizuotoms reakcijoms apibūdinti naudojama Futo klasifikacija (3.5 pav.).

5.1. Singuletinis deguonis: generavimas ir savybės

I ir II tipo reakcijose singuletinio deguonies įnašas skirtingas. I tipo reakcijose $^1\text{O}_2$ susidaro nedideli kiekiai ir tik antriniuose procesuose. II tipo reakcijų efektyvumą, priešingai, nulemia $^1\text{O}_2$ aktyvumas, taigi singuletinis deguonis yra tarsi fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmo indikatorius. Realus $^1\text{O}_2$ įnašas į fotodestrukcinis procesus įvertinimas – vienas svarbiausių uždavinių tyrinėjant fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmus, todėl verta išsamiau aptarti singuletinio deguonies savybes.

Molekulinio deguonies elektroninė struktūra. Molekulinis deguonis turi unikalią elektroninę struktūrą, suteikiančią jam ypatingas fizikines ir chemines savybes, kurios ir nulemia nepaprastą deguonies svarbą chemijoje ir biologijoje. Pirmasis, remdamasis

molekulinių orbitalių teorija, deguonies molekulės elektroninę struktūrą 1928 m. užrašė Malikenas:

$$KK(2\sigma_g)^2(2\sigma_u)^2(3\sigma_g)^2(1\pi_u)^4(1\pi_g)^2.$$

Tvirtą ryšį tarp dviejų deguonies molekulių palaiko $3\sigma_g$ ir $1\pi_u$ rišančios orbitalės, tačiau jų poveikį silpnina $1\pi_g$ ardančios orbitalės. Deguoniui trūksta dviejų p elektronų $1\pi_u^+$ ir $1\pi_u^-$ orbitalėms užpildyti, todėl viršutinio sluoksnio du p elektronai $1\pi_g$ orbitalėse turi maksimalius sukinius. Taigi deguonies molekulės turi du nesuporuotus elektronus ir pagrindinė jų būseną yra tripletinė. p Elektronai orbitalėse gali išsidėstyti trimis būdais, kuriuos atitinka nulinis orbitinis momentas ir trys galimos sukinių projekcijos, lygios +1, 0 ir -1. Tokia tripletinė būseną žymima $^3\Sigma_g^+$.

Deguonies molekulė turi dar du singuletinius lygmenis – $^1\Sigma_g^+$ ir $^1\Delta_g$. Būsenai $^1\Sigma_g^+$ atitinka du suporuoti π_g orbitalės elektronai ir nulinis orbitinis momentas. $^1\Delta_g$ būseną yra mažesnės energijos, o orbitinis momentas yra lygus ± 2 . Ši būseną yra dviejų izoenergiinių elektronų pasiskirstymo būsenų suma. Kiekvieną jų atitinka po vieną π_g orbitalės p elektroną su priešingais sukiniiais.

Singuletinių būsenų egzistavimas buvo įrodytas matuojant molekulinio deguonies sugerties ir liuminescencijos spektrus.

Sugerties spektrų juostos. Deguonies sugerties spektrų tyrimo pradžia galima laikyti V.H. Volastono (Wollaston) (1801 m.) ir L. Fraunhoferio (Fraunhofer) (1814 m.) darbus. Jie Saulės spinduliavimo spektre pastebėjo keletą tamsių linijų, kurios vėliau buvo pavadintos Fraunhoferio linijomis. Viena jų buvo ties 760 nm. 1858 m. G.R. Kirchofas (Kirchhoff) nustatė, kad Fraunhoferio linijos – tai Žemės atmosferos dujų sugerta saulės šviesa, o juosta ties 760 nm priklauso deguonies sugerčiai.

1928 m. Malikenas nustatė, kad sugerties juosta ties 760 nm yra sąlygota molekulinio deguonies singuletinės $^1\Sigma_g^+$ būsenos užpilda (Mulliken, 1928). Jis teoriškai numatė dar vieną deguonies sugerties juostą ties ≈ 1500 nm, atitinkančią šuolį iš pagrindinės į singletinę $^1\Delta_g$ būseną. Vėliau ši juosta buvo eksperimentiškai užregistruota, tik ji pasirodė esanti ties kiek trumpesnėmis bangomis – 1270 nm. 5.1 lentelėje pateiktos deguonies sugerties ir

liuminescencijos juostų maksimumų vertės, atitinkančios įvairius elektroninius–virpesinius šuolius. Sugerties ir liuminescencijos juostos 380–710 nm srityje priklauso deguonies dimerams (O₂)₂.

5.1 lentelė. Molekulinio deguonies sugerties ir liuminescencijos juostų maksimumai ir juos atitinkantys elektroniniai–virpesiniai šuoliai

Sugerties juostos maksimumas, nm	Elektroninis–virpesinis šuolis	Liuminescencijos juostos maksimumas, nm	Elektroninis–virpesinis šuolis
381	$[^1\Sigma(0)]_2 \leftarrow [^3\Sigma(0)]_2$	381	$[^1\Sigma(0)]_2 \rightarrow [^3\Sigma(0)]_2$
478	$[^1\Sigma(0)^1\Delta(0)] \leftarrow [^3\Sigma(0)]_2$	477	$[^1\Sigma(0)^1\Delta(0)] \rightarrow [^3\Sigma(0)]_2$
533	$[^1\Delta(0)^1\Delta(2)] \leftarrow [^3\Sigma(0)]_2$	578	$[^1\Delta(0)^1\Delta(1)] \rightarrow [^3\Sigma(0)]_2$
580	$[^1\Delta(0)^1\Delta(1)] \leftarrow [^3\Sigma(0)]_2$	634	$[^1\Delta(0)]_2 \rightarrow [^3\Sigma(0)]_2$
631	$[^1\Delta(0)]_2 \leftarrow [^3\Sigma(0)]_2$	703	$[^1\Delta(0)]_2 \rightarrow [^3\Sigma(0)^3\Sigma(1)]$
762	$^1\Sigma(0) \leftarrow ^3\Sigma(0)$	780	$[^1\Delta(0)]_2 \rightarrow [^3\Sigma(0)^3\Sigma(2)]$
1070	$^1\Delta(1) \leftarrow ^3\Sigma(0)$	762	$^1\Sigma(0) \rightarrow ^3\Sigma(0)$
1270	$^1\Delta(0) \leftarrow ^3\Sigma(0)$	860	$^1\Sigma(0) \rightarrow ^3\Sigma(1)$
		1268	$^1\Delta(0) \rightarrow ^3\Sigma(0)$
		1580	$^1\Delta(0) \rightarrow ^3\Sigma(1)$

Liuminescencija dezaktyvuojant $^1\Sigma_g^+$ būseną. Monomerinio deguonies liuminescenciją dezaktyvuojant $^1\Sigma_g^+$ būseną 1947 m. pirmasis stebėjo J.Kaplanas (Kaplan, 1947). Jis užregistravo liuminescencijos maksimumus ties 759,4 ir 865 nm. Švytėjimas buvo stebimas elektros išlydžio azoto ir deguonies dujų mišinyje metu.

1961 m. I.F.Noksonas (Noxon) užregistravo dar vieną juostą, atsirandančią išlydžio metu ties 1908 nm (Noxon, 1961).

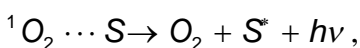
P.–T. Čou (Chou) ir H. Frai (Frei) 1985 m. užregistravo tas pačias deguonies liuminescencijos juostas prisotintuose oru tirpaluose (Chou ir Frei, 1985). Pagrindinis liuminescencijos juostos maksimumas buvo ties 1926 nm. Liuminescencija buvo stebima oro prisotintame anglies tetrachloride, naudojant fotosensibilizatorius (benzofenoną ar 3,4–

benzpirenā), kurių tripletinis lygmuo yra aukštesnis už deguonies singuletinius lygmenis. 5.2 pav. pateikta deguonies molekulės energijos lygmenų diagrama ir atitinkami šuoliai tarp jų.

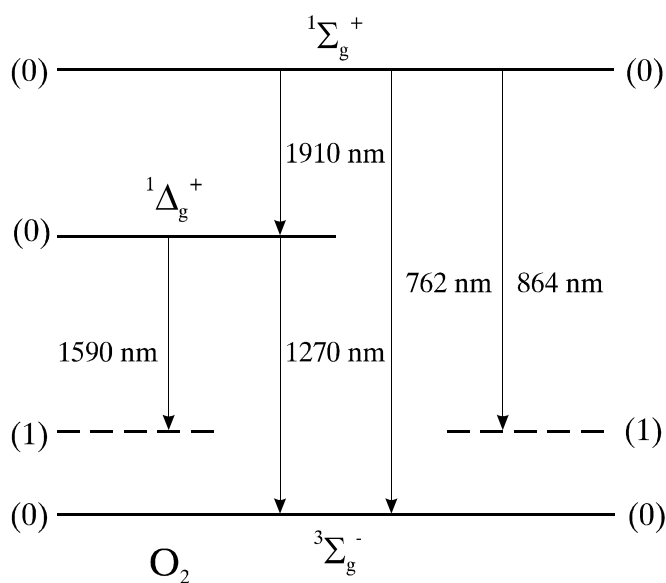
Liuminescencija dezaktyvuojant $^1\Delta_g$ būseną. Tokia liuminescencija pirmą kartą buvo pastebėta 1958 m. Liuminescencijos maksimumas buvo ties 1580 nm. 1961 m. Noksonas (Noxon, 1961) užregistravo liuminescencijos juostą ties 1270 nm.

A.A.Krasnovskis 1976 m. tyrinėjo fotosensibilizuotą singuletinio deguonies generavimą oro prisotintuose tirpaluose. Tai buvo vandenilio neturintys tirpikliai – freonas, CCl_4 , CS_2 . Vėliau singuletinio deguonies generavimas buvo užregistruotas kituose organiniuose tirpikliuose, polimeruose, vandenyje ir biologinėse sistemose.

Pagrindinis $^1\Delta_g$ būsenos deguonies liuminescencijos maksimumas yra ties 1273 ± 3 nm, juostos pusplotis – 16–17 nm. Kitas maksimumas užregistruotas ties 1590 nm, jo intensyvumas apie 50 kartų silpnesnis. Liuminescencija 1350–1450 nm srityje yra dar silpnesnė ir šių juostų padėtys priklauso nuo tirpiklio. Singuletinio deguonies liuminescenciją galima pavaizduoti tokia reakcija:



kur S^* – sužadinta tirpiklio molekulė.



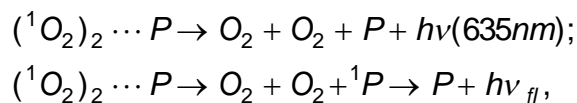
5.3 pav. Molekulinio deguonies elektroninių–virpesinių lygmenų diagrama. Skaičiai skliausteliuose reiškia virpesinio polygmenio numerį

Dimerų (1O_2)₂ liuminescencija. Tyrinėjant chemiliuminescenciją pastebėta deguonies dimerų (dimolių) (O_2)₂ liuminescencija. 1927 m. L. Maletas (Mullet) užregistravo intensyvią liuminescenciją infraraudonojoje spektro srityje reakcijos tarp H_2O_2 ir $NaClO$ metu. 1942 m. buvo nustatyta, kad pagrindinis chemiliuminescencijos maksimumas yra ties 632 nm ir priklauso deguonies dimerų liuminescencijai (Groh ir Kirrmann, 1942). Vėliau daugelis mokslininkų patvirtino tokią chemiliuminescencijos prigimtį. Deguonies dimerų liuminescencija buvo stebima tik dujinėje fazėje (reakcijos metu išsiskiriančiuose deguonies burbuliukuose). 1974 m. deguonies dimerų liuminescencija buvo užregistruota skystame deguonyje (Huestis ir kt., 1974).

A.A.Krasnovskis savo eksperimentuose užregistravo fotosensibilizuotą deguonies dimerų liuminescenciją oro prisotintuose fotosensibilizatorių tirpaluose. Tokius eksperimentus buvo atlikę ir kiti mokslininkai, tačiau jie manė, kad tai fotosensibilizatorių chemiliuminescencija. Krasnovskis nustatė, jog tai deguonies dimerų liuminescencija, kurios intensyvumas, skirtingai nuo kitų fotosensibilizuotų deguonies liuminescencijos vyksmų, proporcingas žadinančios šviesos intensyvumo kvadratui (Krasnovsky ir Neverov, 1990).

Deguonies dimerų liuminescencijos spektras labai priklauso nuo išorinių sąlygų ir tirpiklių. Fotosensibilizatorių, kurių fluorescencijos maksimumai yra iki 630 nm, tirpaluose deguonies dimerų liuminescencija buvo matoma ties 635, 703 ir 780 nm. Jeigu fotosensibilizatorių fluorescencijos juostos yra 640–690 nm srityje, tai pagrindinė deguonies dimerų liuminescencijos juosta yra ties 703 nm. Fotosensibilizatorių, kurių fluorescencija yra pastumta į infraraudonąją spektro pusę ($\lambda \geq 703$ nm), tirpaluose deguonies dimerų spektras sutampa su fotosensibilizatorių fluorescencijos spektru, t. y. energija nuo deguonies dimerų pernešama į fotosensibilizatoriaus singuletinį lygmenį.

Silpniausiai deguonies dimerai liuminescuoja tetrafenilporfino tirpaluose, intensyviausiai – ftalocianinų ir naftalocianinų tirpaluose. Apibendrinus deguonies dimerų liuminescencijos eksperimentinius duomenis galima užrašyti tokią šių vyksmų schemą:



čia P ir 1P – fotosensibilizatoriaus pagrindinės ir sužadintos singuletinės būsenos molekulės, atitinkamai; hvfl – fotosensibilizatoriaus fluorescencijos fotonas.

Spindulinė ir tikroji singuletinio deguonies gyvavimo trukmė. Spindulinė singuletinio deguonies ($^1\Sigma_g^+$) gyvavimo trukmę τ_s lemia spindulinės dezaktyvacijos sparta. Įvairiose aplinkose τ_s vertė svyruoja tarp 0.5–12 s. Dujinėje fazėje ir esant mažiems slėgiams τ_s sutampa su tikrąja gyvavimo trukme τ_t , kurią sąlygoja deguonies būsenos gesinimas aplinkos (tirpiklio) molekulėmis, o skystame deguonyje ir tirpaluose – $\tau_t \ll \tau_s$. Tai aiškinama tuo, kad kondensuotose sistemose singuletinį deguonį efektyviai gesina tirpiklio molekulės ($\tau_t \leq 130$ ns). Tikrosios gyvavimo trukmės vertės įvairiuose tirpikliuose pateiktos 5.2 lentelėje.

5.2 lentelė. $^1\Sigma_g^+$ būsenos deguonies tikrosios gyvavimo trukmės vertės skirtinguose tirpikliuose

Tirpiklis	τ_t , ns
CCl ₄	130
Chloroformas	0,9
n-pentanas	0,25
n-heptanas	0,25
Metanolis	0,017
Etanolis	0,030
D ₂ O	0,075
H ₂ O	0,0065

5.3 lentelėje pateiktos spindulinio gyvavimo trukmės vertės esant skirtingoms sąlygoms. Spindulinę gyvavimo trukmę sąlygojantys vyksmai dar nėra tiksliai nustatyti ir šiuo metu tyrinėjami.

Deguonies $^1\Delta_g$ būsenos spindulinės ir tikrosios gyvavimo trukmės τ_Δ priklausomybė nuo aplinkos yra analogiška $^1\Sigma_g^+$ būsenai. Tirpaluose tikroji gyvavimo trukmės τ_Δ vertė yra keliasdešimties milisekundžių eilės.

Kai kurie eksperimentiniai rezultatai rodo, kad deguonis nesudaro stabilių dimerų, susidaro tik trumpiau nei 1 ps gyvuojantys smūginiai (O₂)₂ kompleksai. Spindulinė tokių dimerų gyvavimo trukmė yra 0.3–1.5 s.

5.3 lentelė. $^1\Sigma_g^+$ būsenos deguonies spindulinės gyvavimo trukmės τ_s (s) vertės esant skirtingiems slėgiams dujinėje fazėje ir skirtinguose tirpikliuose

λ , nm	Slėgis 0 atm	Slėgis 100 atm	Skystas deguonis	Tirpiklis $C_2Cl_3F_3^*$	Tirpiklis $C_3F_7J^{**}$
1270	3845	8,5	1,7	5,0	5,3
762	12	2	6	6,0	0,53

* freonas 11

** perfluorizopropilo jodidas

Cheminės savybės. Dujinėje fazėje ir tirpaluose egzistuoja kelios singuletinio deguonies rūšys: $^1\Delta_g$ ir $^1\Sigma_g^+$ būsenų ir dimerinės deguonies molekulės ($^1\Delta_g^1\Delta_g$, $^1\Delta_g^1\Sigma_g^+$, $^1\Sigma_g^+1\Sigma_g^+$). Tirpaluose deguonies molekulės taip pat yra solvatuotos, t. y. sudaro smūginius kompleksus su tirpiklio molekulėmis. Taigi tirpiklio molekulės perturbuoja deguonies elektroninę struktūrą ir keičia įvairių elektroninių–virpesinių šuolių tikimybes.

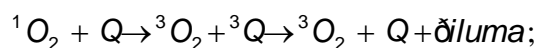
Šiuo metu yra išnagrinėtos tik $^1\Delta_g$ būsenos deguonies savybės. $^1\Sigma_g^+$ būsenos deguonies ir deguonies dimerų $(O_2)_2$ cheminis aktyvumas dar nėra pakankamai išaiškintas, nes šių būsenų gyvavimo trukmė yra labai trumpa.

Elektroninės $^1\Delta_g$ būsenos deguonies struktūros analizė rodo, kad singuletinis deguonis turi du suporuotus išorinio sluoksnio elektronus skirtingose π_g orbitalėse. Tuo singuletinis deguonis panašus į biradikalą. Jis dalyvauja reakcijose sudarydamas ciklinius peroksidus. Singuletinio deguonies reakcijos skiriasi nuo radikalinių, kurių metu nuo substratų yra atplėšiamas elektronas. Daugeliu atveju susidarę peroksidai yra nestabilūs.

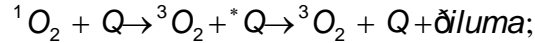
Singuletinio deguonies gesinimo mechanizmai. Singuletinio deguonies dalyvavimas fotodinaminiuose procesuose – tai 1O_2 sąveika su ląstelių komponentais. Tokia sąveika baigiasi deguonies sužadinimo gesinimu.

Dažniausiai pasitaikantys singuletinio deguonies gesinimo biomolekulėmis mechanizmai:

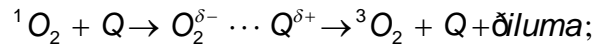
1. kai gesiklio Q molekulės sužadinamos į tripletinę būseną:



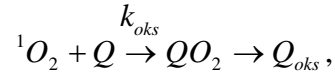
2. kai gesiklio Q molekulės sužadinamos į singuletinę būseną:



3. kai susidaro krūvio pernašos kompleksas tarp ${}^1\text{O}_2$ ir Q:



4. kai vyksta gesiklio Q molekulės oksidacija:



čia: QO_2 – susidaręs pirminis peroksidas, Q_{oks} – stabilus oksidacijos produktas. Pradinė šio vyksmo stadija gali būti 3 vyksmas. 1–3 vyksmai vadinami fizikiniu, o 4 – cheminiu gesinimu. Manoma, kad fotosensibilizuotą gyvų ląstelių žūtį sąlygoja cheminis gesinimas.

Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė įvairiose terpėse. Pirmą kartą deguonies ${}^1\Delta_g$ būsenos gyvavimo trukmė (τ_Δ) tirpaluose eksperimentiškai buvo įvertinta panaudojant inhibuojantį β -karotino poveikį (Foote ir kt., 1970). Vėliau buvo surasta tinkamesnių eksperimentinių metodų, iš kurių patikimiausi ir tiksliausi yra liuminescenciniai.

${}^1\Delta_g$ organiniuose tirpikliuose. Matuojant τ_Δ naudojami fotosensibilizatoriai, kurie efektyviai užpildo tripletinę būseną (${}^3\text{P}$) ir generuoja ${}^1\text{O}_2$ tik energijos pernašos iš ${}^3\text{P}$ į O_2 dėka. Fotosensibilizuotos ${}^1\Delta_g$ būsenos deguonies liuminescencijos, žadinant lazeriniais impulsais, kinetikos kreivė aprašoma tokia formule:

$$L(t) = \frac{k_\Delta k_e [{}^3\text{P}]_0 [\text{O}_2]}{\frac{1}{\tau_t} - \frac{1}{\tau_\Delta}} \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_\Delta}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_t}\right) \right], \quad (5.3)$$

čia k_Δ – fotosensibilizatoriaus tripletinio lygmens gesinimo deguonimi spartos konstanta, k_e – singuletinio deguonies spindulinės dezaktyvacijos spartos konstanta, τ_Δ – ${}^1\Delta_g$ būsenos gyvavimo trukmė, τ_t – fotosensibilizatoriaus tripletinio lygmens gyvavimo trukmė, $[{}^3\text{P}]_0$ – fotosensibilizatoriaus tripletinės būsenos molekulių koncentracija pasibaigus žadinimui, $[\text{O}_2]$ – deguonies koncentracija tirpale. Iš (5.3) formulės matyti, kad singuletinio deguonies liuminescencijos kinetika susideda iš dviejų komponentų – augimo ir gesimo. Kinetinė kreivė didžiausią vertę pasiekia laiko momentu:

$$t_{\max} = \frac{\ln\left(\frac{\tau_{\Delta}}{\tau_t}\right)}{\frac{1}{\tau_t} - \frac{1}{\tau_{\Delta}}}. \quad (5.4)$$

Daugelio fotosensibilizatorių tripletinio lygmens gyvavimo trukmė $\tau_t=10^{-7}-10^{-6}$ s, o singuletinio deguonies gyvavimo trukmė $\tau_{\Delta}=10-300$ μ s. Taigi singuletinio deguonies liuminescencijos kinetika didžiausią vertę pasiekia po $t_{\max}\approx 1$ μ s. Kadangi $\tau_t\ll\tau_{\Delta}$, tai praėjus 1 μ s po žadinimo liuminescencijos gesimo kinetika yra vienekspontė su laiko pastoviąja τ_{Δ} . Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė tirpikliuose, kurių molekulėse nėra vandenilio atomų, yra 25–100 ms. Organiniuose tirpikliuose, kurių molekulėse yra vandenilio atomų, $^1\Delta_g$ būsenos gyvavimo laikas smarkiai sutrumpėja ir yra 10–250 μ s. Vandenilio atomus pakeitus deuteriu gyvavimo laikas pailgėja. 5.4 lentelėje pateiktos τ_{Δ} vertės įvairiuose tirpikliuose.

5.4 lentelė. $^1\Delta_g$ būsenos deguonies gyvavimo trukmė (τ_{Δ}) įvairiuose tirpikliuose

Tirpiklis	τ_{Δ} , μ s
Chloroformas	250
n-Heptanas	28
n-Dodekanas	25
Etilo eteris	35
Acetonas	51
Benzenas	31
Piridinas	16
1-dekanolas	18
Etanolis	15
Metanolis	10,5
Tritonas X-100	15
H ₂ O	3,09–3,28
D ₂ O	59–68

Tirpaluose, turinčiuose daug gesiklių, $^1\Delta_g$ būsenos deguonies gyvavimo trukmė

$$\tau_{\Delta} = \frac{1}{\frac{1}{(\tau_{\Delta})_0} + \sum_q (k_q \cdot C_q)}, \quad (5.5)$$

čia: $(\tau_{\Delta})_0$ – 1O_2 gyvavimo trukmė tirpale be gesiklių, k_q – 1O_2 gesinimo spartos konstanta, C_q – gesiklio koncentracija. Kadangi $(\tau_{\Delta})_0 = 1/k_q C_{tirp}$ (C_{tirp} – tirpiklio molekulių koncentracija), tai (5.5) formulę galima perrašyti taip:

$$\tau_{\Delta} = \frac{1}{\sum_q (k_q \cdot C_q)}, \quad (5.6)$$

čia C_q – tirpale esančių gesiklių, įskaitant ir tirpiklio molekules, koncentracijos. Formulė (5.6) tinka singuletinio deguonies gyvavimo trukmei gyvose ląstelėse ir audiniuose įvertinti.

Singuletinio deguonies generavimo kvantinis našumas. Singuletinį deguonį 1O_2 gali generuoti į singuletą (1P) arba į tripletą (3P) sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės. Pirmas vyksmas yra galimas tik nedaugeliui fotosensibilizatorių, kurių energinis tarpas tarp singuletinės ir tripletinės būsenų yra gana didelis, kitaip tariant, sužadinimo energijos relaksacijos iš singuletinio į tripletinį lygmenį spartos konstanta ir relaksacija į pagrindinę būseną yra mažos. Tai sąlygoja gana ilgą singuletinės būsenos gyvavimo trukmę, drauge užtikrina singuletinio deguonies generavimą per sensibilizatoriaus singuletinį lygmenį. Antrasis vyksmas gerokai efektyvesnis ir galimas daugeliui fotosensibilizatorių.

Jeigu 3P būsenos energija yra didesnė už deguonies $^1\Sigma_g^+$ būsenos energiją, tai efektyviai užpildoma būtent ši deguonies būsena, tačiau jos gyvavimo trukmė yra labai trumpa (vyksta gesinimas tirpiklio molekulėmis) ir dėl to užpildoma kur kas ilgiau gyvuojanti $^1\Delta_g$ būsena. Jeigu 3P būsenos energija yra mažesnė, tai generuojamas tik $^1\Delta_g$ būsenos deguonis. Tokiu būdu 3P būsenos fotosensibilizatoriaus molekulės generuoja $^1\Delta_g$ būsenos deguonį nepriklausomai nuo 3P energijos. Tokio vyksmo kvantinis našumas

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_t \frac{k_{\Delta}[O_2]\tau_t}{1 + k_0[O_2]\tau_t}, \quad (5.7)$$

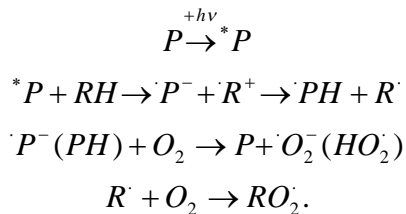
čia: Φ_t – kvantinis 3P būsenos generavimo našumas, k_{Δ} – energijos pernešimo tarp 3P ir 1O_2 spartos konstanta, k_0 – 3P būsenos gesinimo deguonimi spartos konstanta, τ_t – 3P būsenos gyvavimo trukmė nesant deguonies.

Praktiškai absoliučios Φ_{Δ} vertės nustatomos matuojant 1O_2 akceptorių fotosensibilizuotos oksidacijos kvantinį našumą, kai sąveika tarp jų yra tik cheminė. Paprasčiausias Φ_{Δ} nustatymo būdas yra matuoti santykinės singuletinio deguonies generavimo kvantinio našumo vertes registruojant fotosensibilizuotą deguonies liuminescenciją. Absoliutinės Φ_{Δ} vertės apskaičiuojamos lyginamuoju būdu, t. y. lyginant su medžiaga, kurios Φ_{Δ} vertė žinoma. Dažniausiai standartais naudojamos medžiagos yra tetrafenilporfinas arba tetrasulfonatofenilporfinas, kurių Φ_{Δ} siekia 70%.

5.2. I tipo fotosensibilizuotos reakcijos

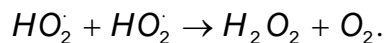
Šio tipo reakcijų metu sužadintas fotosensibilizatorius nuo substrato molekulės atplėšia elektroną arba vandenilio atomą. Deguonis oksiduoja fotoredukuotą sensibilizatorių ir grąžina jį į pradinę oksiduotą formą.

Pirminius reakcijų mechanizmus galima pavaizduoti tokia schema:

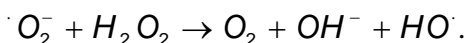


čia: P ir *P – pagrindinė ir sužadinta fotosensibilizatoriaus molekulės būsenos; \dot{P}^- ir $\dot{P}H$ – laisvieji fotosensibilizatoriaus radikalai, susidarantys redukuojantis P; RH – oksiduojamo substrato molekulė; \dot{R}^+ , $R\cdot$ ir $RO_2\cdot$ – laisvieji radikalai, susidarantys oksiduojantis substratui.

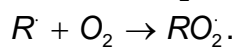
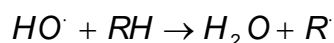
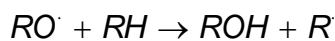
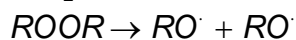
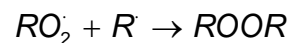
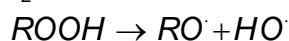
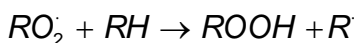
I tipo reakcijose formuojasi superoksianijono radikalas (\dot{O}_2^-), rūgštinėse terpėse sudarantis peroksidradikalą $HO_2\cdot$. Tokie radikalai efektyviai oksiduoja biosubstratus ir dismutacijos reakcijoje sudaro vandenilio peroksidą:



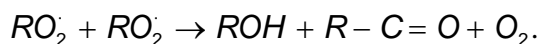
Reakcijos metu gali būti generuojamos sužadintos singuletinės būsenos deguonies molekulės (Khan, 1981). Reaguojant superoksianijono ir peroksi– radikalams su vandenilio peroksidu ((Haberio –Vaiso (Haber–Weiss) ciklas)) susidaro dar stipresnis oksidatorius – hidroksilo radikalas. Reakciją katalizuoja geležies (III) jonai (Haber, Weiss, 1934):



Fotodehidrinti pirminio substrato radikalai $R\cdot$ gali oksiduoti kitus substratus. Jie lengvai prisijungia deguonį, sudarydami gerokai aktyvesnius peroksidinius radikalus $RO_2\cdot$, sąlygojančius tamsinę angliavandenilių, alkoholių, eterių, organinių rūgščių ir lipidų (RH) oksidaciją (Howard ir Ingold, 1968; Russell, 1957; Vladimirov ir kt., 1980):

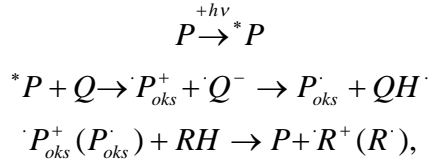


Šių reakcijų metu susidaro organinių junginių peroksidai (ROOH, ROOR). Peroksidai Haberio–Vaiso ciklo metu suskyla į $RO\cdot$ ir $HO\cdot$ radikalus, oksidacijos grandinė išsišakoja ir oksidaciniai procesai sustiprėja. Iš peroksidinių radikalų susidaro nestabilus daugianaris ciklinis peroksidas, kuris suskyla į molekulinę deguonį ir dvi organines molekules, iš kurių viena turi keto–, o kita hidroksilinę grupę:



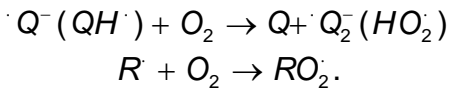
Šios reakcijos metu susidaro sužadintos karboksilinių junginių ir deguonies molekulės (Howard ir Ingold, 1968; Russell, 1957). Karboksiliniai junginiai gali sugerti šviesos energiją, taip inicijuodami naujus fotodinaminius reiškinius. Gyvoje ląstelėse vyksmai yra dar sudėtingesni, nes fermentai peroksidazė ir katalazė skatina peroksidų skilimą arba jų reakciją su biosubstratais (Vladimirov ir kt., 1980).

Galimas ir kitas I tipo reakcijų mechanizmas, kai sužadintas fotosensibilizatoriaus molekulės oksiduoja elektronų akceptorius, pavydžiui, chinonas. Tokios reakcijos schema:



čia: \dot{P}_{oks}^+ ir \dot{P}_{oks} – laisvieji radikalai, susidarantys atplėšus elektroną ar protoną nuo fotosensibilizatoriaus molekulės.

Šiuo atveju pirminiai biosubstratų (RH) oksidatoriai yra fotosensibilizatoriaus radikalai. Deguonis pirminiame fotocheminiame vyksme nedalyvauja, tačiau jis gali smarkiai sustiprinti ardantį poveikį tokiomis reakcijomis:



nes susidarę radikalai įsijungia į oksidacinius procesus.

Nagrinėjant I tipo reakcijų mechanizmus būtina aptarti sensibilizatoriaus sužadintas būsenas. 1943–44 m. Tereninas (Terenin, 1943) bei Luisas (Lewis) ir Kaša (Kasha) (Lewis ir Kasha, 1944) nustatė, kad I tipo reakcijose dalyvauja dviejų galimų sužadintų būsenų (singuletinės 1P ir tripletinės 3P) fotosensibilizatorius. Trijų lygmenų Jablonskio diagramoje (5.2 pav.) pateiktos konstantos nurodo singuletinio 1P ir tripletinio 3P lygmenų sužadinimo deaktyvacijos fluorescencijos (k_f), nespindulinės deaktyvacijos (k_d^s , k_d^t), fosforescencijos (k_{fosf}) ir interkombinacinės konversijos keliu (k_{st}) tikimybes. Sandauga $k_r[RH]$ apibūdina sužadintos molekulės deaktyvacijos fotocheminiuose vyksmuose tikimybę. Naudojantis schema (5.2 pav.) galima užrašyti fotocheminių vyksmų kvantinių našumų (Φ_r) išraiškas.

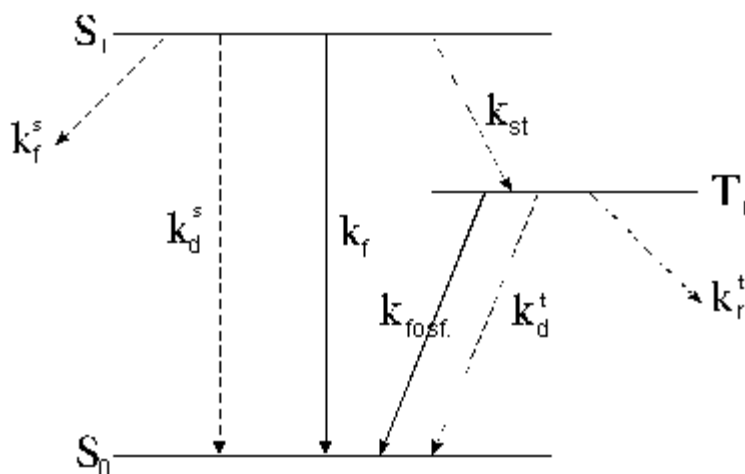
Jeigu procesas vyksta per 1P būseną, tai:

$$\Phi_r^s = \frac{k_r^s[RH]}{k_r^s[RH] + k_f + k_d^s + k_{st}}. \quad (5.9)$$

Jei procesas vyksta per 3P būseną, tai:

$$\Phi_r^t = \frac{\Phi_{st} k_r^t[RH]}{k_r^t[RH] + k_d^t + k_{ph}}, \quad (5.10)$$

čia Φ_{st} – kvantinis tripletinės būsenos susidarymo našumas.



5.2 pav. Fotosensibilizatoriaus elektroninių lygmenų ir šuolių tarp jų Jablonskio diagrama bei sužadintųjų būsenų dezaktyvacijos vyksmų konstantų žymėjimai

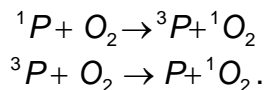
Efektyvių fotosensibilizatorių singuletinės būsenos gyvavimo laikas [$\tau_s=1/(k_f+k_d^s+k_{st})$] yra maždaug 10^{-9} – 10^{-8} sekundės, o tripletinės būsenos gyvavimo laikas [$\tau_t=1/(k_d^t+k_{fosf.})$] – apie 10^{-4} – 10^{-2} sekundės.

5.3. II tipo fotosensibilizuotos reakcijos

Pirmasis šio tipo reakcijas 1867 m. apibūdino M. Fricšė (Friczsche), o vėliau jas išsamiai nagrinėjo C. Diufresas (Duffraisie) (Duffraisie ir Ecary, 1946) ir G. Šenkas (Schenk, 1948). II tipo reakcijoms buvo priskiriama pirminė sąveika tarp sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės ir deguonies – vadinamojo “mol–oksido” (nestabilaus komplekso tarp P ir O_2) susidarymas. Biosubstrato oksidacija vyksta jam reaguojant su mol–oksidu, šios reakcijos metu regeneruojama fotosensibilizatoriaus molekulė, o deguonis oksiduoja biosubstratą.

1931 m. H. Kautskis (Kautsky) eksperimentais parodė, kad fotodinaminėse reakcijose dalyvauja ne mol–oksidas, o sužadintos singuletinės būsenos deguonies molekulė (Kautsky, 1931; Kautsky, 1939). Jo eksperimentai rėmėsi R.S. Malikeno (Mulliken) teoriniu darbu, kuriame nustatyta, kad sužadinta deguonies molekulė gali būti dviejų singuletinių būsenų (Mulliken, 1928), žymimų $^1\Sigma_g^+$ ir $^1\Delta_g$.

1943 m. Tereninąs parodė, kad galimi du singuletinio deguonies generavimo būdai (Terenin, 1943):

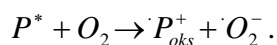


Pagal pirmąjį mechanizmą singuletinį deguonį generuoti gali tik tie fotosensibilizatoriai, kurių energijos tarpas tarp singuletinio ir tripletinio lygmenų yra didesnis už kurio nors deguonies singuletinio lygmens energiją. Antrasis mechanizmas būdingas daugeliui fotosensibilizatorių, kurių tripletinis lygmuo yra aukščiau už kurį nors deguonies singuletinį lygmenį.

Šiuolaikinis II tipo reakcijų tyrimo etapas prasidėjo 1964 metais. Daugiausia šioje srityje nuveikė K. Futas, jam priklauso ir išvada, kad mol–oksidas iš tikrųjų yra singuletinė deguonies būseną ${}^1\Delta_g$ (Foote ir Wexler, 1964; Foote ir kt., 1970).

Sąveikaudamas su substratu singuletinis deguonis (1O_2) sudaro nestabilius ciklinius peroksidus, kurie vėliau terminių ar fermentinių reakcijų metu suyra. 1O_2 nuo oksiduojamų substratų gali atplėšti elektroną ir sudaryti superoksidinius radikalus $\cdot O_2^-$. Taip susidarantys laisvieji radikalai irgi dalyvauja fotocheminėse reakcijose. Šiuo atžvilgiu II tipo reakcijos panašios į I tipo reakcijas.

Galima ir reakcija, kurios metu reaguojant sužadinto fotosensibilizatoriaus molekulei su deguonimi atplėšiamas elektronas ir susidaro $\cdot O_2^-$:



Tokį vyksmą 1935 m. postulavo J. Vaisas (Weiss) (Weiss, 1935). Šiuolaikiniai eksperimentai patvirtina tokį $\cdot O_2^-$ susidarymo mechanizmą, tačiau šio vyksmo našumas, palyginti su singuletinio deguonies susidarymu, nedidelis.

II tipo reakcijoms kiekybiškai įvertinti tinka (5.1) ir (5.2) formulės, tik jose vietoj $k_f[RH]$ reikia naudoti sandaugą $k_o[O_2]$ (k_o – sužadintos fotosensibilizatoriaus būsenos gesinimo deguonimi greičio konstanta).

5.4. Singuletinio deguonies vaidmuo FNT

Daugelio autorių tyrimų duomenys rodo, kad labiausiai tikėtina, jog navikinių audinių destruktija vyksta generuojant singuletinį deguonį ir tik 5% fotosensibilizacinių reakcijų FNT metu vyksta generuojant kitas aktyvias deguonies formas (Weishaupf ir kt., 1976). Taigi FNT metu sensibilizacinio vyksmo tarpininkas turėtų būti į $^1\Delta_g$ būseną sužadintas deguonis. Tokios būsenos deguonis yra labai aktyvus ir gali oksiduoti įvairias gyvybiškai svarbias biomolekules – amino rūgštis ir baltymus, nukleotidus ir nukleorūgštis, lipidus, karotinoidus, tokoferolius, chlorofilus, porfirinus ir kitus junginius. Singuletinis deguonis aktyviai reaguoja su biomolekulių nesočiosiomis jungtimis tarp anglies atomų ir pirminiai tokių oksidacijos reakcijų produktai dažniausiai būna hidroperoksidai (Singh, 1982). Dėl singuletinio deguonies reakcijų su membranų lipidais ardomos ląstelių membranos, reakcijos su baltymais sutrikdo gyvybiškai svarbių baltymų funkcijas, o nukleorūgščių oksidacija baigiasi negrįžtamais DNR pakitimais. Tad biologinėje sistemoje susidariusio 1O_2 inicijuotos fotocheminės reakcijos pradeda destruktivių vyksmų seką, sukeliančią pažaidas, kurios baigiasi ląstelių žūtimi.

Vertinant 1O_2 vaidmenį FNT svarbiausi yra pirminiai vyksmai po to, kai sensibilizatorius sugeria šviesos fotoną. Kad singuletinis deguonis veiktų kaip citototoksinė medžiaga, turi įvykti du fundamentalūs aktai:

- (a) sužadinta fotosensibilizatoriaus molekulė turi perduoti energiją deguonies molekulei;
- (b) sužadinta singuletinio deguonies molekulė turi reaguoti su substrato taikiniu ir sukelti jame oksidacijos reakcijas.

Kai tinkamo bangos ilgio fotonai pasiekia ląstelėje lokalizuotą fotosensibilizatorių ir sužadina jį į aukštesnį energinį lygmenį, tolesnė energijos pernaša (a) ir oksidavimo procesas (b) priklauso nuo reaguojančios poros difuzinių susidūrimų. Sužadinimo energijos pernaša tarp sužadinto sensibilizatoriaus ir O_2 vyksta per elektronų mainus, kuris galimas tik esant mažiems atstumams. Kad sužadinta deguonies molekulė galėtų inicijuoti oksidacinį procesą substrate, taip pat reikalingos tinkamos sąlygos – reaguojančios dalelės turi susidurti nespėjusios prarasti sužadinimo energijos kitais būdais. Taigi fotosensibilizuotos substrato oksidacijos efektyvumas priklausys nuo O_2 ir substrato koncentracijos ir nuo fotosensibilizatoriaus tripletinės būsenos bei singuletinio deguonies gyvavimo trukmės.

Tačiau apie tolesnę vyksmų seką po sensibilizatoriais inicijuoto aktyvaus deguonies generavimo samprotauti sudėtinga, nes, kaip matyti iš pateiktų duomenų, net paprasčiausioje aplinkoje deguonis gali sukelti labai įvairias oksidacijos reakcijas. Singuletinio deguonies dalyvavimas oksidacijos procesuose, homogeniniuose tirpaluose jau patikimai fiksuojamas (Krasnovsky, 1979). Apie singuletinio deguonies dalyvavimą gyvuose objektuose vykstančiame fotosensibilizaciniame FNT procese liudija tik gausūs netiesioginiai eksperimentiniai rezultatai. Viena svarbiausių problemų, apsunkinančių $^1\text{O}_2$ fiksavimą biologinėse sistemose, yra jau minėta labai trumpa jo gyvavimo trukmė. Vandenyje ji yra apie 3 μs (Krasnovsky, 1981), o ląstelių kultūrose, dėl didelio aktyvumo biologiniame substrate – apie 200 ns (Baker ir Kanofsky, 1992). Deguonies prisotintose ląstelių sistemose $^1\text{O}_2$ generavimo greitis buvo $2 \times 10^5 - 4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Gorman ir Rodgers, 1992). Taigi net ir tokiomis sąlygomis singuletinio deguonies gesimas vyksta 5–10 kartų greičiau negu susidarymas.

Trumpą $^1\text{O}_2$ gyvavimo trukmę ląstelėse taip pat lemia mažas difuzijos nuotolis, ne didesnis nei 45 nm (Moan ir Boye, 1981). Tai paaiškina, kodėl *Escherichia coli* ląstelės išorėje hematoporfirino generuotas singuletinis deguonis nesukelia bakterijos DNR pažeidimų (Moan, 1990). Taigi, kadangi žmogaus ląstelės skersmuo būna nuo 10 iki 100 μm , $^1\text{O}_2$ pažeis tik tas ląstelės vietas, kuriose jis bus generuojamas. Todėl vertinant, ar sensibilizatorius bus tinkamas vaistas FNT, labai svarbu žinoti jo mikrolokalizaciją ląstelėje.

Tiesiogiai pastebėti $^1\text{O}_2$ biologinėje sistemoje galima tik registruojant jo liuminescenciją ties maždaug 1270 nm. Kol kas šito dar nepavyko pasiekti. Tačiau jau užregistruota porfirinų generuoto singuletinio deguonies liuminescencija eritrocitų šešėliuose ir kitose membranose (Hall ir Girotti, 1987; Thomas ir kt., 1987; Thomas ir Girotti, 1988). Singuletinio deguonies emisija ties 1270 nm buvo užregistruota raudonųjų kraujo kūnelių membranose ir leukeminėse ląstelėse L1210 sensibilizuotuose 5-(N-heksadekanoil)amineozinu (Kanofsky, 1991; Baker ir Kanofsky, 1991; Baker ir Kanofsky, 1993). Autoriai mano, kad jie užregistravo į buferinę terpę difundavusio $^1\text{O}_2$ liuminescenciją. Taigi dėl labai trumpos $^1\text{O}_2$ gyvavimo trukmės, mažo liuminescencijos kvantinio našumo vargu ar pavyks užregistruoti $^1\text{O}_2$ liuminescenciją *in vivo*.

Singuletinio deguonies dalyvavimą FNT procesuose patvirtina gana gausūs netiesioginiai eksperimentai. Tiriant fotosensibilizuotą įvairių biomolekulių oksidaciją gauti

produktai, būdingi oksidacijai singuletiniu deguonimi (Korytowski ir kt., 1992; Geiger ir kt., 1995; Langlois, 1986). Singuletinio deguonies dalyvavimas FNT procesuose taip pat įrodomas eksperimentuose panaudojant singuletinio deguonies gesiklius (Henderson ir Miller, 1986; Agarwal ir kt., 1992). Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė labai priklauso nuo terpės: jei vandenyje ji yra apie 3 μs, tai sunkiajame vandenyje (D₂O) – pailgėja iki 65 μs (Gorman ir Rodgers, 1992). Tad D₂O terpėje ¹O₂ gyvuoja kur kas ilgiau ir biologinis poveikis, kuris stebimas eksperimento metu norint identifikuoti ¹O₂ dalyvavimą, turėtų būti efektyvesnis.

Nors abiejų, I ir II tipo reakcijų mechanizmai yra nustatyti, tačiau kuris iš jų vyraus sudėtingoje biologinėje aplinkoje, nuspėti labai sunku. Įtakos turi ir sensibilizatoriaus lokalizacija audiniuose bei ląstelių organelėse, ir deguonies koncentracija sensibilizatoriaus lokalizacijos vietose, ir dar daug kitų veiksnių. Laikomasi nuomonės, kad jei aplinkoje yra deguonies, FNT vyksta pagal II tipo reakcijų mechanizmą (Fuchs ir Thiele, 1998). Tiek I, tiek II tipo reakcijos inicijuoja oksidacinius procesus, sukeliančias ląstelių žūtį lemiančias pažaidas, tad efektyvios FNT požiūriu pradinių reakcijų tipas nėra itin svarbus. Niekada nebus idealaus sensibilizatoriaus ir FNT mechanizmo, tinkamo visiems atvejams, tačiau gerai suprantant vykstančių procesų mechanizmus kiekvienam atvejui gali būti parinktas tinkamiausias sensibilizatorius ir gydymo sąlygos.

Literatūra

Agarwal R., S.I.A. Zaidi, M. Athar, D.R. Bickers, H. Mukhtar (1992) Photodynamic effects of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate are mediated by singlet oxygen: in vivo and in vitro studies utilizing hepatic microsomes as a model membrane source. Arch.Biochem.Biophys., 294, 30.

Baker A., J.R. Kanofsky (1991) Direct observation of singlet oxygen phosphorescence at 1270 nm from L1210 leukemia cells exposed to polyporphyrin and light. Arch.Biochem.Biophys., 286, 70.

Baker A., J.R. Kanofsky (1992) Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. Photochem.Photobiol., 55, 523-528.

Baker A., J.R. Kanofsky (1993) Time-resolved studies of singlet-oxygen emission

from L1210 leukemia cells labeled with 5-(N-hexadecanoyl)amino eosin. A comparison with a one-dimensional model of singlet-oxygen diffusion and quenching. *Photochem.Photobiol.*, 57, 720-727.

Chou P.T., H. Frei (1985) Sensitization of $O_2^1\Sigma_g^+ \rightarrow ^1\Delta_g$ emission in solution, and observation of $O_2^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ chemiluminescence upon decomposition of 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide. *Chem.Phys.Lett.*, 122, 87-92.

Dufraisse C., S. Ecury (1946) Photooxidation of the cyclopentane ring: photooxydiphenylisobenzofuran. *Compt.Rend.*, 223, 735-737.

Foote C.S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*, 162, 963-970.

Foote C.S., S. Wexler (1964) Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen. *J.Amer.Chem.Soc.*, 86, 3879-3880.

Foote C.S., R.W. Denny, L. Weaver, Y. Chang, J. Petters (1970) Quenching of singlet oxygen. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 171, 139-148.

Fuchs J., J. Thiele (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic.Biol.Med.*, 24, 835.

Geiger P.G., W. Korytowski, A.W. Girotti (1995) Photodynamically generated 3-beta-hydroxy-5 alpha-cholest-6-ene-5- hydroperoxide: toxic reactivity in membranes and susceptibility to enzymatic detoxification. *Photochem.Photobiol.*, 62, 580-587.

Gorman A.A., M.A.J.Rodgers (1992) Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J.Photochem.Photobiol.B.:Biol.*, 14,159-176.

Groh P., A.Kirrmann (1942) Spectral study of luminescent reaction. *Compt.Rend.*, 215, 275

Haber F., J.Weiss (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc.Roy.Soc.London, Ser.A*, 147, 332.

Hall R.d., A.W.Girotti (1987) Singlet oxygen phosphorescence at 1268 nm produced during the irradiation of eosin Y covalently bound by erythrocyte ghosts. *Photochem.Photobiol.*, 45, 83.

Henderson B.W., A.C. Miller (1986) Effects of scavengers of reactive oxygen and radical species on cell survival following photodynamic treatment in vitro: comparison to ionizing radiation. *Radiat.Res.*, 108, 196.

Howard J.A., K.U. Ingold (1968) The self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *J.Amer.Chem.Soc.*, 90, 1056–1058.

Huestis D.L., G. Black, S.A. Edelstein, R.L. Sharpless (1974) Fluorescence and quenching of $O_2(^1\Delta_g)$ and $[O_2(^1\Delta_g)]_2$ in liquid oxygen. *J.Chem.Phys.*, 60, 4471–4474.

Kanofsky J.R. (1991) Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts. *Photochem.Photobiol.*, 53, 93.

Kaplan J (1947) Active oxygen. *Nature*, 159, 673.

Kautsky H., H.de Bruin (1931) Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung. *Naturwiss.*, 19, 1043.

Kautsky H. (1939) Quenching of luminescence by oxygen. *Trans.Farad.Soc.*, 35, 216–219.

Khan A.U. (1981) Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) in the reaction of potassium superoxide with water. *J.Amer.Chem.Soc.*, 103, 6576–6517.

Korytowski W., G.J. Bachowski, A.W. Girotti (1992) Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5α - and 6β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochem.Photobiol.*, 56, 1-8.

Krasnovsky A.A., jr., K.V. Neverov (1990) Photoinduced dimol luminescence of singlet molecular oxygen in solutions of photosensitizers. *Chem.Phys.Lett.*, 167, 591–596.

Krasnovsky A.A., jr., (1981) Quantum yield of photosensitized luminescence and radiative lifetime of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen in solutions. *Chem.Phys.Lett.*, 81, 443.

Krasnovsky A.A., jr, (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. *Photochem.Photobiol.*, 29, 29–36.

Langlois R., H. Ali, N. Brasseur, J.R. Wagner, J.E.van Lier (1986) Biological activities of phthalocyanines--IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem.Photobiol.*, 44, 117.

Lewis G.N., M. Kasha (1944) Phosphorescence and triplet state. *J.Amer.Chem.Soc.*, 66, 2100–2116.

Moan J. (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues.

J.Photochem.Photobiol.B.:Biol., 6, 343-344.

Moan J., E.Boye (1981) Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin. Photobiochem.Photobiophys., 2, 301-307.

Moan J., Q.Peng, R.Sorensen, V.Iani, J.M.Nesland (1998) The biophysical foundations of photodynamic therapy. Endoscopy, 30, 387.

Mulliken R.S.(1928) Interpretation of the atmospheric oxygen bonds. Nature, 122, 505.

Noxon I.F.(1961) Observation of the ($b^1\Sigma_g^+ - a^1\Delta_g$) transition in O_2^1 Can.J.Phys., 39, 1110-1119.

Ochsner M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J.Photochem.Photobiol.B.:Biol., 39, 1-18.

Russell G.A. (1957) Deuterium-isotope effects in the autooxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. J.Amer.Chem.Soc., 79, 3871-3877.

Singh A.(1982) Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. Can.J.Physiol.Pharmacol., 60, 1330.

Schenk G.O. (1948) Photosensitized reactions with molecular oxygen. Naturwiss., 35, 28-29.

Takemura T., N.Ohta, S.Nakajima, I.Sakata (1989) Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. Photochem.Photobiol., 50, 339.

Tappainer H., A.Jodlbauer (1904) Ueber wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. Dtsch.Arch.Klin.Med., 80, 427-487.

Terenin A.N. (1943) Photochemical process in aromatic compounds. Acta physicochim. (USSR) 18, 210-241.

Thomas J.P., R.D.Hall, A.W.Girotti (1987) Singlet oxygen intermediacy in the photodynamic action of membrane- bound hematoporphyrin derivative. Cancer Lett., 35, 295.

Thomas J.P., A.W.Girotti (1988) Photogeneration of singlet oxygen by membrane-bound hematoporphyrin derivative. Photochem.Photobiol., 47, 79.

Vladimirov Yu.A., V.I.Olenev, T.V.Suslova, Z.V.Cheremisina (1980) Lipid

peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv.Lipid Res.*, 17, 173–249.

Weishaupf K.R., C.J. Gomer, T.J. Dougherty (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, 36, 2326–2329.

Weiss J. (1935) Electron transition processes in the mechanism of oxidation and reduction reactions in solutions. *Naturwiss.*, 23, 64-69.

SUMMARY

5. PHOTOSENSITIZED PROCESSES IN TUMOUR THERAPY

Several types of photochemical processes occur in living organisms that are important or essential for their survival. In all these reactions, the initial step is the absorption of photons by specialized pigments – photosensitizers.

Although photosensitized effects on organisms were observed much earlier, it is generally agreed that this area of photobiology started with research performed by Oscar Raab, a medical student working in the pharmacological laboratory of Professor Hermann von Tappeiner in Munich. O.Raab found that very low concentration of dyes such as acridines and eosin, which had no effect in the dark, led to rapid killing of the paramecium in the light. This discovery stimulated a large amount of research on the phenomenon. It was gradually recognized that oxygen was essential for the effect. Von Tappeiner introduced the term “photodynamic action” to distinguish it from the photosensitization of photographic plates by dyes (Tappainer and Jodlbauer, 1904).

The fundamental photobiological process involved in PTT requires oxygen, a photosensitizer and visible light. A scheme of photosensitization process is presented in Fig. 5.1. The process is initiated when the photosensitizer absorbs a photon and undergoes simultaneous or sequential decays that result in intramolecular energy transfer reactions.

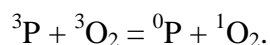
Upon absorption of a photon of light, a photosensitizer will be excited to a high energy singlet state. Singlet photosensitizer can decay back to its ground state, resulting in fluorescence emission. Alternatively, it can form triplet sensitizer, a slightly lower energy

state, and longer lived excited species, by electron spin conversion in the process of intersystem crossing. PTT action is dependent on intersystem crossing being the predominant process. The most efficient photosensitizers for PTT have a high triplet quantum yield and long triplet lifetime. The longer lifetime of the triplet state enables the interaction of the excited photosensitizer with the surrounding molecules, and it is generally accepted the generation of the cytotoxic species produced during PTT occurs whilst in this state.

The excited triplet state can react in two ways, defined as type I and type II mechanisms (Foote, 1968) (Fig.3.5. Scheme of PTT action).

Photosensitization by type I mechanism. A molecule in its triplet state can both abstract electrons (or H atoms) from and donate electrons (or H atoms) to other molecules. The efficiencies of these reactions depend on the chemical structures of the sensitizer and the substrate, as well as on the reaction conditions. The abstraction or transfer of electron between the excited state of the sensitizer and a substrate that is either biological, a solvent or another sensitizer, results in free radicals and radical ions production. In many cases, the resultant substrate radicals react with oxygen to give oxidized products of various types; often these are peroxides, which can react further to initiate free radical chain-type autooxidation processes. In many systems, a ground state sensitizer can be regenerated by the reaction of the semireduced form with ground state oxygen, $^3\text{O}_2$, to give the superoxide radical anion, $^{\cdot}\text{O}_2^-$, which in turn can react with some kind of biomolecules. These reactions produce oxidative damage that is eventually expressed as biological lesions.

Photosensitization by type II mechanism. In the type II photosensitized reaction, triplet sensitizer interacts by energy transfer with ground state oxygen to give ground state sensitizer and electronically excited state of oxygen, $^1\text{O}_2$, as follows:



Since both the sensitizer and ground state oxygen are triplets, their interaction does not require a change in spin direction and is very efficient. Oxygen can exist in two singlet excited states; the longer lived form, with an excess energy of 23 kcal/mol (corresponding to a photon energy of approximately 1 eV = 1270 nm radiation) is the principal species involved in photosensitized reactions. It has a lifetime of approximately 4 μs in ordinary

water and thus rapidly decays to the ground state if it does not react chemically with another molecule. Its lifetime is much longer in lipids and other nonpolar media (Rodgers, 1985). Singlet oxygen, the primary product of type II photosensitization mechanism, is a very reactive species; it is much more electrophilic than its ground state and can interact with a large number of biological substrates, inducing oxidative damage and ultimately cell death.

PTT is dependent on the presence of molecular oxygen (van Lier, 1990). This suggests that singlet oxygen generated by the photosensitization of molecular triplet oxygen is the principal toxic species formed during PTT, although the extent to which the species is responsible for the photosensitized effect is under debate. Nonetheless, the generation of singlet oxygen is extremely crucial to the success of PTT, and one of the first tests performed on new PTT drugs is to probe their ability for singlet oxygen generation.

While it is generally accepted that type II mechanisms predominate during PTT, type I reactions become more important at low oxygen concentrations and in more polar environments (Ochsner, 1997). However, the initial reaction is of lesser importance as both type I and type II reactions lead to similar oxidative damage and comparable free radical chain-reactions in the presence of oxygen. The overall effect of either a type I or type II reaction pathway is the production of oxidative damage within the target cell that will lead to tumour destruction.

References

- C.S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*, 162, 963–970.
- Van Lier, J.E. (1990) In: *Photodynamic therapy of neoplastic disease*, CRC Press, Boca Raton, v.1, 279-291.
- Ochsner M. (1997) *J.Photochem.Photobiol., B: Biol.*, 39, 1-18.
- Rodgers M.A.J. (1985) In: *Primary photoprocesses in biology and medicine*, Plenum Press, New York, 181-195.
- Tappainer H., A. Jodlbauer (1904) *Dtsch.Arch.Klin.Med.*, 80, 427-487.