

1 skyrius

FOTOSENSIBILIZACIJOS REIŠKINYS

Aptariamas sensibilizacijos reiškinys, jo universalumas, gamtoje vykstantys fotosensibilizacijos vyksmai ir sukurtasis fotosensibilizuotos terapijos metodas, tinkamas kai kurioms ligoms gydyti

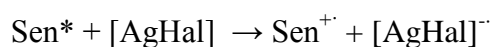
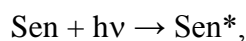
Biologinių sistemų fotosensibilizacijos reiškinio tyrimo ir bandymų jį taikyti medicinoje pradžia laikomi 1900 m., kai Miuncheno farmakologijos instituto studentas Oskaras Raabas, tirdamas ląstelių kultūrų gyvybingumą, pastebėjo, kad paveikus ląsteles kai kuriais organiniais pigmentais ir apšvitinus šviesa, jos žūva. Kadangi nei pigmentai, nei šviesa atskirai ląstelių neveikė, studentas suprato, kad ląstelės žūva dėl sudėtingo vyksmo, kurio metu apšvitinti pigmentai sugeba sugerti šviesos energiją, ją perduoda kitoms molekulėms, taip inicijuodami reakcijas, kurių rezultatas – toksinės medžiagos, dėl kurių poveikio ląstelės žūva. Studento vadovas profesorius H. Tappeineris ėmėsi išsamiai tirti šį reiškinį ir 1907 m. išleistoje knygoje šviesai jautraus pigmento (fotosensibilizatoriaus) ir šviesos sukeltą poveikį pavadino “fotodinaminiu”, norėdamas pabrėžti skirtumą tarp tuo metu jau populiaros fotografinių plokštelių sensibilizacijos.

Taigi fotosensibilizacijos reiškinys jau buvo žinomas ir naudojamas patvariam atvaizdai (nuotraukai) gauti taikant šviesai jautrias medžiagas, vienu ar kitu būdu fiksuojant fotocheminius ar fotofizikinius pokyčius, įvykstančius tose medžiagose veikiant šviesai. Buvo įdėta daug pastangų stengiantis, kad vaizdai fotografijose būtų ryškūs ir patvarūs.

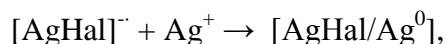
Bendra fotografijos schema tokia: ant šviesai jautria medžiaga dengtos plokštelės paviršiaus objektyvo pagalba eksponuojamas vaizdas, suformuotas iš šviesesnių ar tamsesnių dėmių; šis vaizdas plokštelės dangos medžiagose sukelia cheminius ir fizikinius pokyčius, kurie yra proporcingi tai vietai tekusiam apšviestumui. Vėliau šie pokyčiai užfiksuojami ir padaromi matomais įprastoje šviesoje. Klasikinėje juodai baltoje fotografijoje šviesai jautrus sluoksnis gaminamas iš želatinos, kurioje disperguoti sidabro halogenidų AgHal (Hal – Cl, Br, Cl+Br, Cl+J, Cl+Br+J, Br+J) mikrokristalai. Sidabro halogenidai veikiant šviesai transformuojami į fotoproduktus, kurių koncentracija proporcinga sugertų šviesos kvantų skaičiui, t. y. šviesesnėse ant plokštelės eksponuojamo vaizdo vietose bus daugiau fotoprodukto, ir jeigu galėtume įprastoje šviesoje matyti šio fotoprodukto koncentracijų skirtumus įvairiose plokštelės vietose, ant tokios plokštelės paviršiaus matytume ir eksponuotą vaizdą. Tačiau stabilus ir gerai matomo įprastoje šviesoje vaizdo formavimas nėra paprastas procesas, todėl buvo sukurta sudėtinga metodika, pagal kurią iki šių dienų gaminamos juodai baltos nuotraukos. Pirmųjų fotografinių sluoksnių trūkumas

buvo tas, kad AgHal sugeria tik UV ir trumpabangę mėlynąją regimosios šviesos ruožo sritį ($\lambda < 520$ nm). Ieškant būdų, kaip pagerinti fotografijų kokybę ir gauti vaizdus visame mūsų akims įprastame regimosios šviesos spektro ruože, buvo sugalvota panaudoti optinius sensibilizatorius – organinės kilmės dažiklius, sugeriančius šviesą visoje regimosios šviesos srityje ir perduodančius šią energiją fotocheminiam virsmui tinkamoms medžiagoms. Taigi įmaišius į šviesai jautrų sluoksnį tinkamų sensibilizatorių, jis tampa jautrus regimosios šviesos ir net infraraudonosios srities spinduliuotei. Plačiausiai optinei sensibilizacijai fotografijoje naudojami gerai plataus spektrinio diapazono šviesą sugeriantys polimetininiai dažikliai. Tai dažniausiai benzotiazolo, naftotiazolo, benzooksazolo, chinolino ir kt. dariniai, kurių sudėtyje yra trumpesnių ar ilgesnių metino grupių grandinių. Tokie dažikliai adsorbuojasi ant AgHal kristalų. Dėl jų sąveikos susidaro plačios, visą regimosios šviesos ruožą apimančios sugerties juostos, ir sugertų šviesos kvantų energija perduodama sidabro halogenidų kristalams, kuriuose ji naudojama fotoproduktams formuoti. Kuo ilgesnė polimetininių dažiklių metino grupių grandinė, tuo didesnis sugerties juostos batochrominis poslinkis.

Ant AgHal adsorbuotos optinio sensibilizatoriaus (Sen) molekulės sugeria šviesos fotonus ($h\nu$) ir tapusios sužadintomis perduoda elektroną AgHal:



ir šviesai jautriame sluoksnyje susiformuoja paslėpto (nematomo) vaizdo centrai:



kurie vėliau pagal atitinkamas metodikas ryškinami specialiais tirpalais – ryškalais.

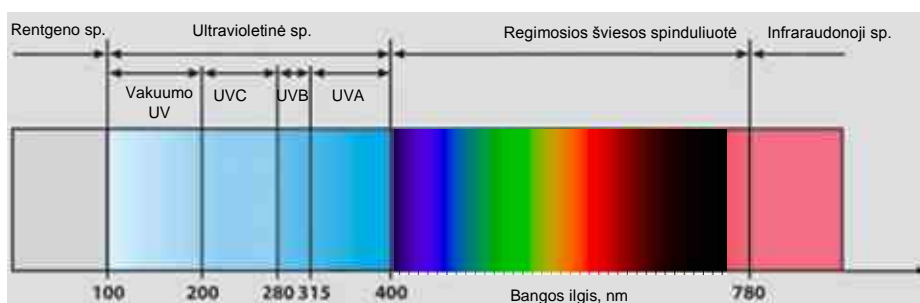
Optinė fotosensibilizacija fotografijoje – tai žmogaus sugalvota priemonė, tobulinanti fotografijos technologijas, kuri parodė, kaip, taikant fotocheminius ir fotosensibilizacinius vyksmus, galima plėtoti technologijas, tinkamas buityje naudojamų produktų gamybai. Virsmai, kurių metu vyksta šviesos energiją sugėrusios medžiagos savybių pokyčiai, apibrėžiami kaip fotochemija, o virsmai, kuriuos inicijuoja medžiagos, sugeriančios šviesos energiją ir ją perduodančios fotocheminį virsmą užtikrinančioms molekulėms, vadinami fotosensibilizacija.

Gamtoje egzistuoja daugybė fotosensibilizacijos reiškinių grįstų vyksmų, tarp kurių pats svarbiausias yra fotosintezė – procesas, kurio metu augalai ir kai kurių rūšių bakterijos gamina didelės energinės vertės junginius, tam panaudodami saulės spinduliuotės regimosios šviesos spektro dalies energiją. Vykstant fotosintezei auga augalai, didėja jų masė, taigi šviesos energija virsta materialiai apčiuopiamais kūnais.

Gamta puikiai „sutvarkė“ fotosintezės procesą, sukurdama regimosios spektro srities šviesą sugeriančius pigmentus, kurie veikia kaip šviesos fotonų energiją surenkančios antenos ir

efektyviai perduoda ją augaluose esantiems reakcijų centrams. Tokia antenų sistema padeda augalui sugerti įvairių bangos ilgių regimąją šviesą ir labai greitai ir našiai perduoti ją į reakcijų centrus, kur vyksta tolimesni procesai – šviesos energija paverčiama cheminių junginių energija. Šios šviesos energiją sugeriančios molekulės (augaluose – chlorofilai ir karotinoidai) yra gamtiniai fotosensibilizatoriai, kurie tiesiogiai šviesos energijos sugerti nesugebančioms medžiagoms perduoda šviesos fotonų energiją, kad jos šią energiją panaudotų vienam ar kitam virsmui. Taigi bendru atveju fotosensibilizacija yra tam tikrų medžiagų gebėjimas efektyviai sugerti šviesą ir jos energiją perduoti kitoms, šviesos sugerti nesugebančioms medžiagoms, kurios tą energiją panaudoja įvairiems tolesniems procesams. Kitaip tariant, fotosensibilizacija – tai šviesos nesugeriančių molekulių pajautrinimas energijos pernašos vyksmų dėka suteikiant joms galimybių atlikti įvairius fotocheminius ir fotofizikinius virsmus. Fotosintezės metu šviesą sugėrę pigmentai, sudarantys šviesą surenkančias antenas, sužadavimo energiją perneša į reakcijos centrus, kuriuose vyksta krūvių atskyrimas; atskirti krūviai panaudojami energijos turinčių junginių ATP ir NADPH sintezei, iš kurių tolesniuose etapuose sintetinami įvairūs angliavandeniai – svarbiausios ląstelių maisto molekulės, teikiančios energijos jų funkcijoms atlikti. Taigi fotosintezė – tobula gamtos sukurta sistema, saulės šviesos energiją paverčianti kitomis energijos formomis, kitaip tariant, saulės energija yra Žemės gyvybės šaltinis. Saulės spinduliuotės spektras apima platų bangų ruožą nuo 100 nm iki 11000 nm. Žemės paviršių pasiekia tik ilgesni nei 290 nm spinduliai, nes trumpesnius gyviems organizmams pražūtingus spindulius sugeria stratosferoje esančios ozono (O₃) molekulės.

Saulės spinduliuotė skirstoma į ultravioletinį, regimosios šviesos ir infraraudonąjį ruožus. Ultravioletinis spektro ruožas, kurio spinduliai daro itin didelį poveikį gyviems organizmams, savo ruožtu pagal bangų ilgius skirstomas į tris sritis: UVA, UVB ir UVC (1.1 pav.).



1.1 pav. Elektromagnetinių bangų spektras

UVA srities spinduliai yra mažiausiai kenksmingi ir dėl to plačiausiai pritaikomi. Šio spektro ruožo šviesa naudojama endogeninių fluoroforų fluorescencijai žadinti, kai kurioms fototerapinėms procedūroms ir soliariumų vonioms. UVB srities šviesa labiausiai kenksminga, nes turi pakankamai energijos biologiniams audiniams ardyti, o atmosfera ją ne visą sugeria. UVB diapazono spinduliuotė gali sukelti odos vėžį. Manoma, kad pastaraisiais metais padidėjęs sergamumas odos vėžiu susijęs su atmosferos ozono sluoksnio plonėjimu. Trumpiausių bangų UVC srities spindulius beveik visiškai sugeria stratosferos deguonis. UVC ruožo fotonai, susidūrę su deguonies atomais, atiduoda jiems savo energiją sudarydami ozono molekules. Šiuos spindulius labai greitai sugeria atmosfera, todėl žemės paviršiuje jų neaptinkama. Jų energijos pakanka bakterijoms naikinti, tad UVC diapazono spinduliuotė naudojama orui ir vandeniui sterilizuoti švitinant specialiomis antibakterinėmis lempomis.

Regimosios šviesos sritį sudaro bangų ruožas nuo 400 iki 780 nm. Ilgesnės už regimąją šviesą bangos ($\lambda > 780$ nm) priklauso infraraudonajam (IR) spektro ruožui, kuris skirstomas į artimąjį ir tolimąjį. Šios srities šviesos fotonai turi mažiau energijos nei regimosios šviesos kvantai, tad jų sukeltas biologinis poveikis yra terminis.

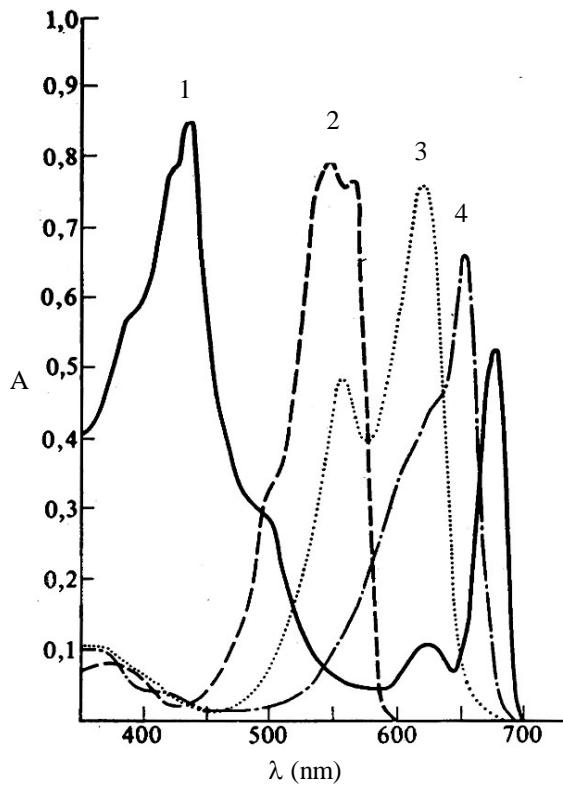
Kiekvieno fotono energija (E), išreikšta džauliais (J), yra tiesiog proporcinga spinduliuotės dažniui (ν) (t. y. atvirkščiai proporcinga bangos ilgiui λ):

$$E = h\nu = hc/\lambda.$$

Proporcingumo konstantos yra šios: h – Planko konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$ J s) ir c – šviesos greitis vakuume (3×10^8 m/s). Kuo trumpesnės bangos, tuo daugiau energijos turi fotonas, tad daugiausia energijos turi UV diapazono fotonai, mažiausiai – IR. Elektromagnetinės spinduliuotės srauto poveikį medžiagai lemia fotono energija.

Svarbiausios augalų ir fotosintetinančių bakterijų molekulės – baltymai, lipidai ir angliavandeniai sugeria tik UV ir IR ruožo šviesą. Kad vyktų fotosintezė, kuriai energiją teikia saulės šviesa, reikalingi fotosensibilizatoriai, šiuo atveju molekulės, kurios sugertų saulės spinduliuotės regimojo diapazono šviesą ir sugertų fotonų energiją perduotų į reakcijos centrus.

Tad kokios medžiagos veikia kaip fotosensibilizatoriai fotosintezėje? Pagrindinės iš jų, kaip jau buvo minėta, augalų pigmentai chlorofilai ir karotinoidai bei dumbliuose aptinkami fikobilinai. Chlorofilai gerai sugeria 400–450 nm ir 650–680 nm ruožo šviesą, tačiau nesugeria žalios (apie 530 nm) šviesos (dėl to augalai atrodo žali) (1.2 pav.). Intensyvi chlorofilų sugerties juosta mėlynojoje spektro srityje atitinka keletą aukštesnių elektroninių singuletinių būsenų, raudonojoje srityje esančios dvi sugerties juostos atitinka dvi energiškai žemiausias singuletines elektronines chlorofilo būsenas.



1.2 pav. Biopigmentų sugerties spektrai: 1 – chlorofilas a ir karotinoidai, 2 – fikoeritinas, 3 – fikocianinas, 4 – alofikocianinas

Karotinoidai – oranžinės, geltonos ir rudos spalvos pigmentai, kurių randama beveik visuose augaluose ir gyvūnų organizmuose. Atsižvelgiant į molekulės ilgį, karotinoidai sugeria 450–550 nm ilgio spindulius, dėl to patys atrodo geltoni, oranžiniai ar raudoni. Sugertą šviesos energiją karotinoidai perduoda chlorofilui.

Kai kuriuose dumbliuose, be chlorofilo ir įvairių karotinoidų, yra pigmentų, vadinamų fikobiliniais. Tai raudonos spalvos fikoeritobilinas, kurio turi raudondumbliai, ir mėlynos spalvos fikocianobilinas, kurio randama melsvadumbliuose.

Fikobilinai patvariomis kovalentinėmis jungtimis būna susijungę su specifiniais baltymais, kurie dumbliuose ir cianobakterijose sukuria šviesą surenkančius darinius – fikobilisomas. Joms būdinga ne tik energinė, užtikrinanti gerą šviesos fotonų sugėrimą visame regimosios šviesos ruože, bet ir erdvinė hierarchija, užtikrinanti kryptingą šviesos energijos pernašą į reakcijos centrą, kuriame vyksta pirminis fotocheminis vyksmas. Tokie sudėtiniai pigmento ir baltymo dariniai vadinami fikobiliproteinais, iš kurių itin paplitę fikoeritinas ir fikocianinas (1.2 pav.). Kai kuriuose melsvadumbliuose ir raudondumbliuose po nedaug aptinkama ir mėlynos spalvos alofikocianino. Fikobiliproteinai yra dumblių ir cianobakterijų sensibilizatoriai, kurie tiesiogiai fotosintezės reakcijose nedalyvauja. Kadangi chlorofilas nesugeria 400–600 nm ruožo

šviesos, tą atlieka dumbliuose esantys fikobilinai, kurie, panašiai kaip karotinoidai, sugertų spindulių energiją perduoda chlorofilams. Fikoeritinas geriausiai sugeria žaliuosius ir geltonuosius (490–576 nm), fikocianinas ir alofikocianinas – oranžinius (585–650 nm) spindulius. Kaip matyti iš 1.2 paveikslo, fikobilinai sugeria šviesą tame regimosios šviesos ruože, kuriame pagrindinių fotosintezės pigmentų, chlorofilo ir karotinoidų, sugertis yra maža. Taigi fikobilinai neužgožia pagrindinių šviesą surenkančių pigmentų ir sugeria papildomus šviesos kvantus regimosios šviesos ruože, taip pajautrindami – sensibilizuodami fotosintezės vyksmą dumbliuose ir cianobakterijose. Todėl fikobiliproteinų turintys dumbliai išgyvena tokiomis sąlygomis, kur kiti augalai neauga. Kiekviena dumblių rūšis gyvena tam tikrame gylyje, kurį lemia fikobilisomoje esančių pigmentų rinkinys, pavyzdžiui, giliausiai vandenyje, ten, kur patenka mažiausiai šviesos, auga juodieji dumbliai, sugeriantys visus iki jų prasiskverbiančius šviesos fotonus. Raudondumbliai ir melsvadumbliai tarpsta tokiuose gyliuose, kur užtikrinamos optimalios sąlygos surinkti regimojo spektrinio ruožo šviesos kvantus šviesą surenkančiomis antenomis – fikobilisomomis. Taigi gamtos puikiai suderinta fotosintezės sensibilizacijos kompleksų sudėtis leidžia jiems sugerti to ruožo šviesą, kurios negali sugerti konkuruojantys organizmai, ir sugertą šviesos energiją su mažiausiais nuostoliais perteikti reakcijos centrams, kuriuose vyksta krūvių atskyrimas ir tolesni fotosintezės vyksmai.

Aptartieji fotosensibilizacijos atvejai inicijuoja vėliau sekančius fotocheminius vyksmus. Tačiau galimi ir kiti fotosensibilizacijos sukelti procesai. Pavyzdžiui, rega yra pagrįsta fotoizomerizacijos vyksmu. Sugėręs šviesos fotoną, chromoforas 11-*cis*-retinalis virsta 11-*trans*-retinoliu. Dėl pakitusios chromoforo konformacijos pasikeičia ir fotoreceptorius rodopsino konformacija. Taip šviesos sužadintas rodopsinas inicijuoja visą seką vyksmų, kuriems veikiant atsiradę signalai, apdoroti tinklainės ląstelėse, neuronų perduodami į smegenis, kur sukuriama regos pojūtis.

Apibendrinant galima teigti, kad fotosensibilizacija yra atitinkamo fizikinio ar fizikocheminio virsmo pajautrinimas naudojant šviesos energiją. Fotosensibilizacijai įvykti būtinas junginys – fotosensibilizatorius, kuris sugeba sugerti šviesos kvantus ir sugertos šviesos energiją efektyviai perduoti kitą vyksmą atliekančiai molekulei. Energijos pernaša gali vykti T. Försterio arba, jei yra tinkamos sąlygos, – D.L. Dexterio aprašytu būdu. Galimi ir kiti energijos pernašos būdai.

Kaip jau buvo minėta, UVC ir UVB spektrinio ruožo spinduliuotę gerai sugeria biologinį objektą sudarančios molekulės, todėl ji yra pavojingiausia gyviems organizmams, nes gali juose sukelti nepageidaujamus fotocheminius ar fotofizikinius virsmus. UVA ir regimosios šviesos spinduliuotės biologinės molekulės beveik nesugeria, todėl šių sričių šviesa nesukelia organizmų

pažaidų. Tačiau jei biologinėje sistemoje yra fotosensibilizatorių, jie gali inicijuoti reakcijas, dėl kurių organizmo ląstelės gali būti pažeistos arba sunaikintos. Veikia jau aptartas fotosensibilizacijos principas: fotosensibilizatorius, sugėręs šviesos energiją, jos perteklių gali atiduoti aplinkinėms molekulėms ir taip jas sužadinti, o sužadintos molekulės gali inicijuoti įvairias fotochemines reakcijas, žalingas ar net pražūtingas organizmui.

Nors fotosensibilizacijos reiškinys ir jo poveikis organizmams žinomas nuo labai senų laikų, mokslinio fotosensibilizacijos tyrimo pradžia ir taikymas gydymo tikslams laikoma XX amžiaus pradžia, kai Vokietijoje buvo pastebėta, kad ląstelės, paveiktos organinių pigmentų ir po to apšvitintos šviesa, žūva. Šis atradimas paskatino tolesnius reiškinio tyrimus. Pasirodė, kad veikiant šviesai ir dalyvaujant įvairiems fotosensibilizatoriams galima sutrikdyti kai kurių fermentų veiklą, nužudyti ląsteles ar smulkius organizmus. Fotosensibilizacija sukelia šviesos nesugeriančiame substrate įvairius fotofizikinius, fotocheminius ir fotobiologinius vyksmus, kurie baigiasi gyvybiškai svarbių biomolekulių suirimu ir ląstelių žūtimi. Šiuo metu žinomi keli tūkstančiai gamtinių ir sintetinių junginių, galinčių būti fotosensibilizatoriais. Fotosensibilizacijos sukelti vyksmai taikomi įvairiems tikslams: virusams inaktyvuoti, augalų apsaugai nuo ligų sukėlėjų ir kenkėjų ir svarbiausia – kai kurioms ligoms diagnozuoti ir gydyti.

Organizme šviesos sukeltos reakcijos taikomos keliems gydymo metodams – fototerapijai, fotochemoterapijai ir fotosensibilizuotai terapijai. Fototerapijos metu šviesa tiesiogiai veikia žmogaus organizmo molekules. Gydymo šviesa metodą ypač išstobulino ir suteikė jam mokslinį pagrindą danas N. Finseną, už tai 1903 metais apdovanotas Nobelio premija. Metodas dažniausiai taikomas tuberkuliozinei vilkligei (*lupus vulgaris*) gydyti, švitinti naudojant ultravioletinę saulės spinduliuotės dalį arba dirbtinius šviesos šaltinius. Fototerapija taip pat taikoma rachitui ir naujagimių hiperbilirubinemijai gydyti.

Fotochemoterapijos metu pacientui suleidžiama gerai šviesą sugeriančio vaisto, kuris šviesos energiją panaudoja fotocheminiam virsmui. Taigi veikiant šviesai tokia molekulė tampa fotochemiškai aktyvi ir iš jos susidarę fotoproduktai gali inicijuoti teigiamai ar neigiamai biologinį objektą veikiančius vyksmus. Dažniausiai toks vaistas – tai UVA srities šviesą sugeriantis pigmentas, kuris susikaupia atitinkamose organizmo vietose. Po to gydomas plotas apšvitinamas ir taip inicijuojamas gydomasis poveikis. Šis gydymo būdas turi ilgaamžę istoriją. Jau prieš tris tūkstančius metų jis buvo naudojamas Indijoje, Egipte ir Kinijoje baltmei (*vitiligo*) gydyti. Sensibilizatoriais buvo iš augalų išskiriamos tam tikros medžiagos (dabar žinoma, kad jose buvo fotosensibilizatorių psoralenų). Šiuo metu fotochemoterapija plačiai ir sėkmingai taikoma žvynelinei (psoriazei) gydyti (psoralenai + UVA = PUVA terapija). Fotochemoterapijos metu

šviesa veikia į organizmą įvestas pigmentų molekules, paversdama jas toksiškais arba trikdančiais medžiagų apykaitą produktais.

Fotosensibilizuotos terapijos metu į organizmą suleistas sensibilizatorius sugertą šviesos energiją perduoda organizmo molekulėms, jas aktyvuoja pats išlikdamas nepakitęs. Svarbiausia tokių virsmų metu susidaranti aktyvi dalelė – singuletinis deguonis, kuris inicijuoja ląstelių veiklą trikdančius vyksmus. Plačiausia fotosensibilizuotos terapijos sritis – vėžio ligos gydymas. Gydomo metodas vadinamas fotosensibilizuota navikų terapija (FNT). Užsienio literatūroje labiau paplitęs terminas „fotodinaminė terapija“.

Šie gydymo metodai ir jų praktinis klinikinis taikymas bus aptarti tolesniuose skyriuose. Iš to, kas buvo pasakyta, aišku, kad svarbiausi sensibilizuotų vyksmų dalyviai yra šviesos fotonai ir juos sugeriančios medžiagos – fotosensibilizatoriai. Trumpai prisiminę svarbiausius šviesos parametrus ir aptarę fotosensibilizatoriams būtinąs savybes, panagrinėsime pirminius fotosensibilizacijos vyksmus, t. y., kokias reakcijas gali inicijuoti sužadintos fotosensibilizatorių molekulės, sąveikaudamos su aplinkos molekulėmis. Vienas skyrius skirtas trumpai pažinčiai su biologinių objektų struktūra, nes vėliau bus išsamiai kalbama apie fotosensibilizuotas biomolekulių pažaidas. Keliuose kituose skyriuose pateikiama, kaip fotosensibilizacijos vyksmai taikomi onkologinėms ir kitoms ligoms gydyti, kartu aptariamos sukurtų metodų tobulinimo perspektyvos ir naujų gydymo būdų kūrimas.