

KAIP VYKSTA FOTOSENSIBILIZACIJA BIOLOGINĖSE SISTEMOSE?

Trumpai pateikiami svarbiausi šviesos parametrai, reikalavimai efektyviems fotosensibilizatoriams ir esminiai fotosensibilizacijos reakcijų principai

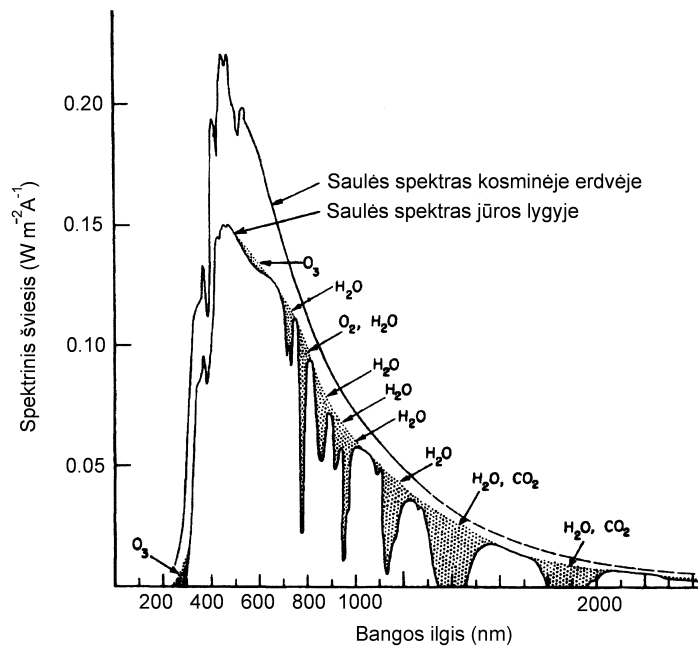
Fotosensibilizatorius, sugėręs šviesos fotoną, atiduoda energijos perteklių aplink esančioms molekulėms, kurios sužadamos ir gali inicijuoti fotochemines reakcijas. Jų padariniai – įvairūs fotofizikiniai, fotocheminiai ir fotobiologiniai vyksmai šviesos nesugėriamame substrate. Taigi, tarpininkaujant fotosensibilizatoriams, ląstelės ar organizmai tampa jautrūs šviesai ir gali žūti.

Kad vyktų fotosensibilizacija, reikalinga šviesa, junginys (fotosensibilizatorius), kurio molekulių struktūra tokia, kad gali sugerti reikiamo bangos ilgio šviesą, ir substratas – biologinė terpė, kurioje vyksta sensibilizacijos sukeltos reakcijos.

Šviesos prigimtis. Mūsų vaizdinis aplinkos suvokimas pagrįstas šviesa. Žemę pasiekianti saulės šviesa apima ne tik regimosios šviesos diapazoną, kurį mato žmogaus akis, bet ir akims nematomus spindulius, kuriuos gali sugerti įvairios biologinės sistemos (2.1 pav.). Saulės energija yra gyvybės žemėje šaltinis. Saulė spinduliuoja kaip įkaitintas kūnas ir jos spinduliuotės spektras apima platų bangų ruožą nuo 100 nm iki 11 000 nm. Žemės paviršių pasiekia tik ilgesni nei 290 nm spinduliai, nes trumpesnius sugeria stratosferoje esančios ozono molekulės. Anglies dioksidas ir vandens garai sugeria įvairių bangos ilgių saulės šviesą plačiame ruože: nuo 700 nm iki 2 000 nm. Saulės šviesa dalyvauja daugelyje biosferos vyksmų. Augalai gauna energijos fotosintezei, žmogaus kūne vyksta įvairios šviesos sukeltos cheminės ir biologinės reakcijos, kurių svarbiausia – rega. Žmogaus organizmą nuo pavojingų trumpųjų saulės spektro spindulių saugo odos įdegis – pigmento melanino sankaupos odos paviršiuje.

Šiuolaikiniu supratimu šviesai būdinga dviguba prigimtis – banginė ir korpuskulinė. Daugelis šviesos savybių, pasireiškiančių jai veikiant materialius kūnus,

tokių kaip sugertis, atspindys, lūžis, sklaida, interferencija ar difrakcija, aprašomi bangų parametrais – jie rodo banginę spinduliuotės kilmę.



2.1 pav. Saulės spektras kosminėje erdvėje ir jūros lygyje. Taškuoti ploteliai rodo atmosferos komponentų sugertį

Šviesos charakteristikos. Elektromagnetinė banga suprantama kaip du vienas kitam statmeni erdvėje sklindantys kintamieji laukai – elektrinis ir magnetinis – ir apibūdinama įvairiais dydžiais.

Bangos ilgis (λ) – atstumas tarp dviejų artimiausių tos pačios fazės bangos taškų. Skirtingų elektromagnetinio spektro ruožų bangų ilgiai matuojami skirtingais vienetais: radijo bangų ilgiai – mm, cm ir m, infraraudonųjų bangų ilgiai – μm , rentgeno ir gama spindulių, ultravioletinių, regimosios šviesos bangų ilgiai reiškiami įvairiais vienetais, bet dažniausiai – nanometrais (nm, 10^{-9}m , 10^{-7}cm) arba jų dalimis (pavyzdžiui, angstromais, $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$; 10^{-10} m).

Virpesių dažnis (ν) – elektrinio lauko virpesių skaičius per sekundę, matuojamas [s^{-1}] arba [Hz].

Bangos skaičius (ν^)*. Kadangi santykis $\nu = c/\lambda$ išreiškia sąryšį tarp bangos ilgio ir dažnio, kartais vietoj bangos ilgio naudojamas atvirkštinis dydis $1/\lambda$, kuris nusako bangos

ilgių skaičių ilgio vienetu (centimetre) bangos sklidimo kryptimi (reiškiamas cm^{-1}). Pavyzdžiui, 400 nm bangos ilgis atitinka:

$$v = 3 \times 10^{10} \text{ cm s}^{-1} / 400 \text{ nm} = 3 \times 10^{10} \text{ cm s}^{-1} / 4 \times 10^{-5} \text{ cm} = 0,75 \times 10^{15} \text{ s}^{-1},$$

t. y. $0,75 \times 10^{15}$ pilnų svyravimų per sekundę. Arba:

$$v^* = 1/\lambda = 1/400 \text{ nm} = 1/4 \times 10^{-5} \text{ cm} = 25000 \text{ cm}^{-1}, \text{ išreiškiant bangos skaičiumi – 25 000 bangos ilgių viename centimetre.}$$

Pasirenkamas tas dydis, kuris patogesnis konkrečiu atveju. Pavyzdžiui, spektro juostos pusplotį patogiau reikšti bangos skaičiumi, nes šis dydis tiesiškai priklauso nuo šviesos kvanto energijos.

Greitis v – šviesos bangos greitis terpėje. Visų ilgių elektromagnetinės bangos vakuume sklinda vienodu greičiu ($c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$). Kitose terpėse spinduliuotės sklidimo greitis yra kitoks ir priklauso nuo terpės lūžio rodiklio n , kuris yra lygus sklidimo greičiui vakuume ir tam tikroje terpėje santykiui:

$$n = c/v \text{ arba } v = c/n, \quad (2.1)$$

čia c – šviesos greitis vakuume. Lūžio rodiklis nusako terpės pasipriešinimą šviesos sklidimui. Kuo didesnis lūžio rodiklis, tuo lėčiau sklinda šviesa.

Aprašant kai kurias šviesos savybes patogiau šviesą laikyti bangomis, tačiau kitais atvejais geriau tinkama šviesos kaip dalelės – fotono – sąvoka.

Fotono energijos išraiška (2.2) sujungia abi šviesos prigimtis:

$$E = hv = hc/\lambda. \quad (2.2)$$

Kiekvieno fotono energija (E), išreikšta džauliais (J), yra tiesiog proporcinga spinduliuotės dažniui (ν) (t. y. atvirkščiai proporcinga bangos ilgiui λ). Proporcingumo konstantos yra šios: h – Planko konstanta ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$) ir c – šviesos greitis vakuume ($c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$).

Naudojantis tuo pačiu 400 nm bangos ilgio pavyzdžiu ir taikant molio sąvoką galima apskaičiuoti vieno molio fotonų energijos kiekį, kuris lygus vieno fotono energijai $E = (hc/\lambda)$, padauginant iš Avogadro skaičiaus,

$$[(6,63 \times 10^{-34} \text{ J s} \times 3 \times 10^{10} \text{ cm s}^{-1}) / 4 \times 10^{-5} \text{ cm}] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 299\,000 \text{ J mol}^{-1} = 299 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Tam tikro bangos ilgio vieno molio fotonų energija vadinama einšteinu. Taigi 400 nm ilgio šviesos einšteinas yra 299 kJ. Energija taip pat gali būti reiškiamą kilokalorijomis (kcal) ar elektronvoltais (eV).

Šviesos srautas (W) yra energijos kiekis, kertantis ploto S paviršių per laiko vienetą:

$$\Phi = dE/dt. \quad (2.3)$$

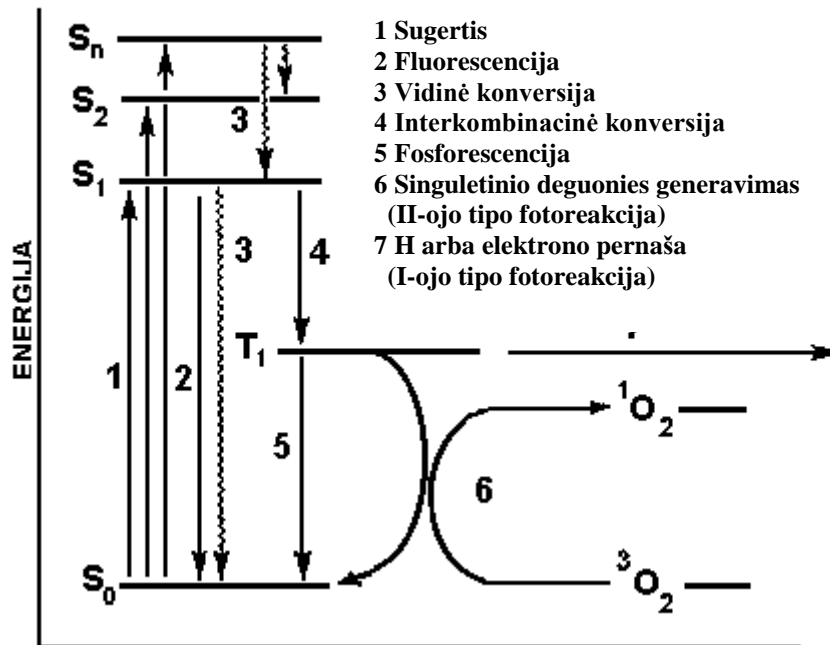
Šviesos intensyvumas (W/m^2) išreiškiamas kaip šviesos srauto tankis, t. y. šviesos srautas, kertantis šviesos sklaidimo kryptiai statmeno ploto vienetą:

$$I = \Phi/S. \quad (2.4)$$

Šviesos dozė (J/m^2) yra lygi šviesos intensyvumo ir švitinimo trukmės sandaugai:

$$D = I t. \quad (2.5)$$

Fotosensibilizatoriams keliami reikalavimai. Visi fotosensibilizacijos vyksmai prasideda fotosensibilizatoriui sugėrus šviesos kvantą. Šviesos fotonai sąveikauja su atomų ir molekulių elektronais, esančiais išoriniuose, toliausiai nuo branduolio nutolusiuose lygmenyse. Fotono sugerties metu elektronas iš žemesnės



2.2 pav. Jablonskio diagrama, parodanti elektroninius šuolius sužadintoje fotosensibilizatorius molekulėje

energijos lygmens peršoka į vieną iš galimų neužpildytų aukštesnės energijos lygmenų. Ši būseną yra nestabili ir elektronas stengiasi grįžti į pagrindinę energinę būseną, atiduodamas energijos perteklių aplinkai arba išspinduliuodamas fluorescencijos kvantą. Kiekvienai molekulei ar atomui būdinga tam tikra energinių lygmenų sistema, kurią apibendrintai galima pavaizduoti Jablonskio diagrama (2.2 pav.).

Jablonskio diagramoje pažymėti galimi elektronų šuoliai ir sužadintos molekulės energijos praradimo keliai. Sužadintos molekulės elektronas iš didesnės energijos lygmenų per labai trumpą laiką (mažiau nei 10^{-13} s) peršoka į energiška žemiausią sužadintą elektroninį lygmenį, atiduodamas energiją aplinkai. Iš šio žemiausio sužadintojo elektroninio energinio lygmens, kuris vadinamas pirmuoju singuletinu lygmeniu (S_1), galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija $S_1 \rightarrow S_0$ (energija šiuo atveju atiduodama aplinkai šilumos pavidalu), interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ (elektronas peršoka į tripletinę energinę būseną) ir fluorescencija (molekulės grįžimas į pagrindinę S_0 būseną išspinduliuojant fluorescencijos fotoną). Kadangi sužadintoji singuletinė būseną gyvuoja labai trumpai (pigmentų, dažiklių ir daugumos molekulių singuletinės sužadintos būsenos S_1 gyvavimo trukmė yra iki keliolikos nanosekundžių), tikimybė, kad šioje būsenoje bus inicijuoti sensibilizacijai svarbūs pirminiai fotocheminiai vyksmai, nedidelė. Tik tuo atveju, kai biologiniame objekte sensibilizatoriai yra tvarkingai ir arti vienas kito supakuoti baltyminėse matricose, yra užtikrinama efektyvi energijos pernaša tarp molekulių. Taip fotosintezėje veikia šviesą surenkančios antenų molekulės ir fikobilisomos. Fotosensibilizacija paprastai vyksta iš gana ilgai gyvuojančios tripletinės sužadintosios būsenos ir galima efektyvi energijos pernaša kitai molekulei, kuri gali inicijuoti fotocheminius virsmus, fotosensibilizuotos terapijos atveju lemiančius ląstelių žūtį ar audinių suardymą.

Taigi ne visos šviesą sugeriančios molekulės yra tinkami sensibilizatoriai. Kad galėtų inicijuoti fotosensibilizuotus vyksmus, sensibilizatorius turi turėti pakankamai didelį interkombinacinės konversijos į sužadintą tripletinę būseną kvantinį našumą ir ilgą tripletinės būsenos gyvavimo trukmę. Tripletinė sensibilizatoriaus būseną gyvuoja daug ilgiau (nuo šimtų milisekundžių iki kelių sekundžių; kaip tik tripletinės būsenos

gesinimas, t. y. energijos pernaša į kaimynines, pakankamai priartėjusias molekules, ir apsprendžia šios būsenos gyvavimo trukmę), tad ir pirminių fotocheminių vyksmų šioje būsenoje tikimybė ir našumas daug didesni.

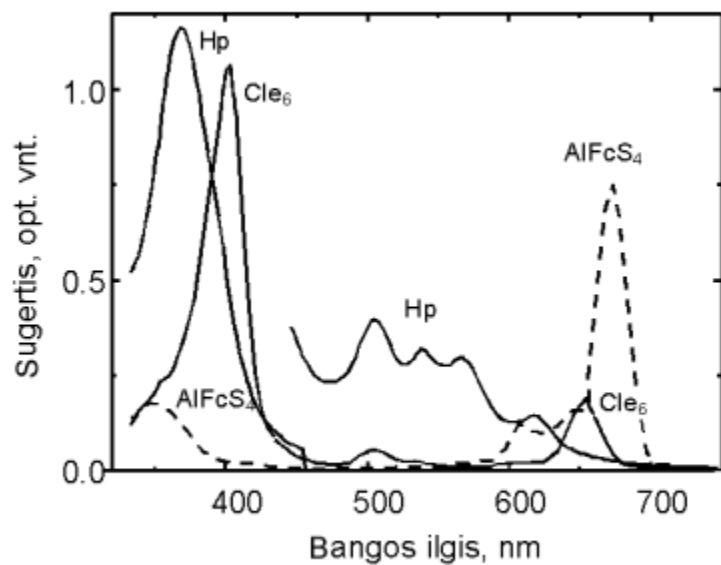
Fotosensibilizacijos vyksmo efektyvumas pirmiausia priklauso nuo sensibilizatoriaus sugebėjimo sugerti šviesos fotonus. Šviesos fotonų sugertį aprašo Bugero–Lamberto ir Bero dėsnis. Praėjusios pro bandinį šviesos intensyvumo sumažėjimas apibūdinamas šviesos sugertimi:

$$A = \varepsilon c l,$$

čia: c – sugeriančios medžiagos koncentracija, l – sugeriančio sluoksnio storis, ε – medžiagos molinis ekstinkcijos koeficientas, parodantis molekulių gebėjimą sugerti šviesą ir priklausantis nuo medžiagos prigimties ir krintančios šviesos bangos ilgio.

Taigi labai svarbu, kad sensibilizatoriai efektyviai sugertų fotonus, t. y. turėtų didelį molinį ekstinkcijos koeficientą toje spektrinėje srityje, kuri svarbi vienam ar kitam sensibilizuotų procesų tikslui.

Pavyzdžiui, fotosensibilizuotos navikų terapijos (5 skyrius) efektyvumas tiesiogiai priklauso nuo to, kiek sensibilizatorius sugeria fotochemines reakcijas galinčių inicijuoti šviesos fotonų, kurių kiekis savo ruožtu priklauso nuo fotosensibilizatoriaus ekstinkcijos koeficiento ties švitinimo bangos ilgiu. Fotosensibilizatorių efektyvumas gali būti skirtingas tik dėl to, kad jų ekstinkcijos koeficientai, sąlygojantys švitinimo šviesos fotonų sugertį, yra skirtingi (2.3 pav.).



2.3 pav. Fotosensibilizuotoje navikų terapijoje naudojamų sensibilizatorių hematoporfirino (Hp), chlorino e₆ (Cl e₆) ir aliuminio ftalocianino tetrasulfonato (AlF c S₄) sugerties spektrai

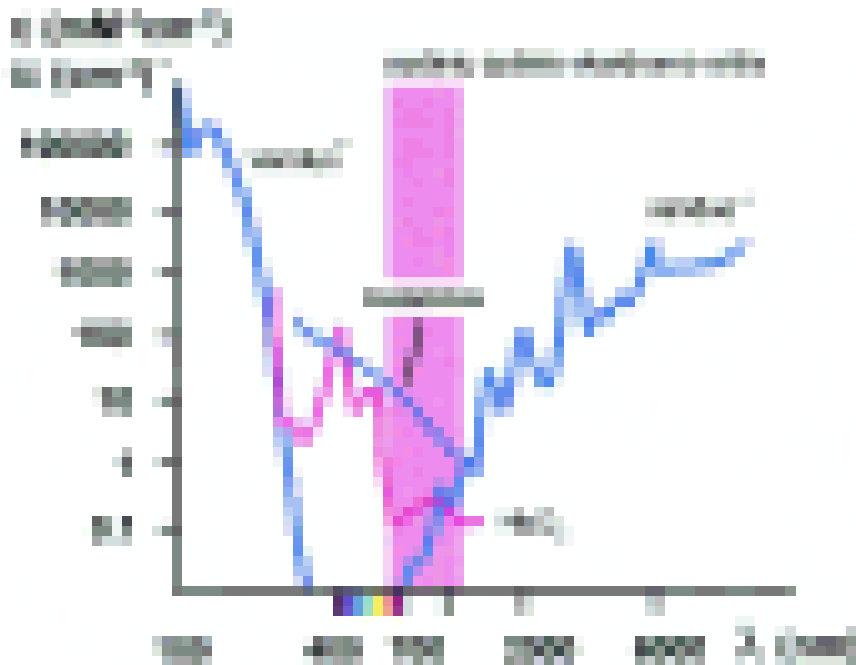
Esant vienodoms kitoms sąlygoms, Hp sensibilizacinis efektyvumas bus mažesnis nei chlorino e₆, o jų abiejų – mažesnis negu aliuminio ftalocianino. Pastarojo ekstinkcijos koeficientas ties švitinimo bangos ilgiu (630 nm), lemiantis šviesos fotono sugerties tikimybę, yra didžiausias.

Bendruoju atveju tinkamas fotosensibilizatorius turi:

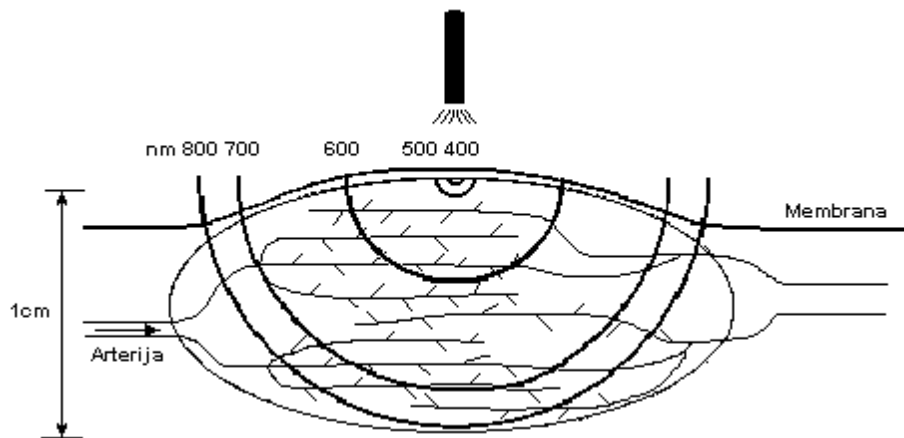
- efektyviai sugerti reikiamo bangos ilgio šviesos fotonus;
- pasižymėti dideliu energijos pernašos į tripletinę būseną (interkombinacinės konversijos) kvantiniu našumu;
- turėti ilgą tripletinės būsenos gyvavimo trukmę.

Vykdamt biologinio audinio fotosensibilizaciją reikia nepamiršti, kad šviesą sugeria ne tik sensibilizatoriaus molekulės, bet ir pats švitinamas audinys, t. y. audinio sudėtyje esančios šviesą sugeriančios medžiagos (vanduo, pigmentai, hemoglobinas, baltymai, lipidai ir t.t.) (2.4 pav.). Daugelis organinių molekulių ir vanduo gerai sugeria UV spektro ruožo šviesą. Nukleorūgštys ir baltymai turi intensyvią sugerties juostą 240–290 nm spektriniame ruože. Vanduo taip pat gerai

sugeria IR diapazono spindulius. Kad sensibilizuoti vyksmai vyktų efektyviai, būtina parinkti tokią spektro sritį, kurios spinduliuotė audinys sugertų mažiausiai, o fotosensibilizatorius toje spektro srityje turėtų intensyvią sugerties juostą. Tuomet padidėja galimybė toje spektro srityje šviesai pasiekti kuo gilesnius audinio sluoksnius ir sužadinti daugiau sensibilizatoriaus molekulių. Kadangi hemoglobino sugertis smarkiai susilpnėja, kai $\lambda > 550$ nm šviesos skvarbumo į audinius gylis padvigubėja didėjant bangos ilgiui nuo 550 iki 630 nm. Ilgesnės šviesos bangos (iki 700 nm) išsiskverbia į audinius dar dvigubai giliau. Dar ilgesnių bangų skvarbumo gylis padidėja jau tik 10% (2.5 pav.).



2.4 pav. Vandens, hemoglobino (HbO_2) ir melanino sugerties, sklaidos ir atspindžio spektrai



2.5 pav. Įvairių bangos ilgių šviesos prasiskverbimo į audinį gylis

Taigi biologinis audinys mažiausiai sugeria 650–1000 nm diapazono šviesą. Ši spektro sritis vadinama audinių optinio skaidrumo sritimi arba “fototerapiniu langu”, nes tokių bangos ilgių šviesa į audinius prasiskverbia giliausiai (audinys yra skaidriausias šviesai). Taigi fotosensibilizuojant biologines sistemas labai svarbu, kad naudojami sensibilizatoriai turėtų stiprią šviesos sugertį audinių optinio skaidrumo srityje ($\lambda > 600$ nm).

Fotosensibilizacijos reakcijos. Kol fotosensibilizatoriaus molekulės nėra sugėrusios šviesos kvantų, jos yra neaktyvios, t. y. nesužadintos, ir jokių vyksmų sukelti negali. Kai sensibilizatoriaus molekulės apšvitinamos tokio bangos ilgio šviesa, kurią jos sugeria, įvyksta fotosužadėjimas, t. y. molekulės peršoka į sužadintą didesnės energijos būseną (2.2 pav.). Sugėrusi šviesos fotoną sensibilizatoriaus molekulė iš pagrindinės būsenos sužadinama į trumpai gyvuojančią sužadintą singuletinę būseną. Būdamas sužadintos singuletinės būsenos fotosensibilizatorius jokių vyksmų nesukelia, nes šios būsenos gyvavimo trukmė labai trumpa (1–100 ns). Per tokį laiką sužadinta fotosensibilizatoriaus molekulė negali perduoti sugertos šviesos energijos aplinkos molekulėms. Sužadintos singuletinės būsenos energija prarandama išspinduliuojant šviesos kvantą (fluorescencija) arba nespinduliniu būdu (vidinė konversija) – atiduodant energiją aplinkos molekulėms,

kitaip tariant, pakeliant aplinkos temperatūrą. Tačiau iš sužadintos singuletinės būsenos sensibilizatoriaus molekulės interkombinacinės konversijos keliu gali peršokti į tripletinę būseną, kurios gyvavimo trukmė yra ilgesnė (net iki kelių milisekundžių). Fotosensibilizacijos požiūriu šis sužadintos singuletinės būsenos energijos praradimo kelias yra svarbiausias, nes būdamas gana ilgai gyvuojančios tripletinės būsenos sensibilizatorius jau gali inicijuoti įvairius fotocheminius procesus, atsakingus už citotoksiškų dalelių generavimą. Taigi dar kartą akcentuojant svarbiausias fotosensibilizatorių savybes – kuo didesnis sensibilizatoriaus interkombinacinės konversijos kvantinis našumas ir kuo ilgesnė tripletinės būsenos gyvavimo trukmė, tuo stipresnis sensibilizatoriaus citotoksinis poveikis. Gerų fotosensibilizatorių energijos pernašos į tripletinę būseną kvantiniai našumai (ϕ_T) būna nuo 0,2 iki 0,7, o tripletinės būsenos gyvavimo trukmė (τ_T) ilgesnė nei 500 nanosekundžių.

Kai sužadintas į tripletinę būseną sensibilizatorius sąveikauja su biologine aplinka, galimi du pagrindiniai reakcijų tipai – pirmasis (I) ir antrasis (II). Pirmojo tipo reakcijų metu, sensibilizatoriui tiesiogiai sąveikaujant su biomolekule, vyksta elektrono arba vandenilio atomo pernaša ir susidaro laisvieji radikalai. Šių reakcijų efektyvumas priklauso nuo sensibilizatoriaus ir substrato cheminės struktūros bei nuo reakcijos sąlygų. Antrojo tipo reakcijų metu sužadintosios tripletinės būsenos sensibilizatorius sąveikauja su audinių molekulinio deguonimi, perduodamas jam sužadinimo energiją.

Išsamiai apie fotosensibilizuotų reakcijų tipus ir mechanizmus bei jų poveikį biomolekulėms bus kalbama 4 skyriuje, o 3 skyriuje pateikiama informacijos apie biologinių sistemų sudėtį ir struktūrą.