

PIRMINIAI FOTOSENSIBILIZUOTI VYKSMAI

Nagrinėjamos I ir II tipo fotosensibilizuotos reakcijos, trumpai aptariamos II tipo reakcijų metu susidarancio aktyvaus oksidatoriaus – singuletinio deguonies – savybės ir biologinių molekulių fotosensibilizacija

Jau žinome, kad fotosensibilizuotais vyksmais laikomi tokie, kurių iniciatoriumi yra šviesa sužadinto fotosensibilizatoriaus molekulės, perteklinę energiją atiduodančios aplinkos molekulėms ir taip sukeliančios fotochemines reakcijas šviesos nesugeriančiame substrate. Idealiu atveju fotosensibilizatorius turėtų atlikti tarsi katalizatoriaus vaidmenį – po sąveikos su substratu grįžti į pirminę būseną ir nereaguoti su inicijuotų fotocheminių reakcijų produktais.

Fotosensibilizatorius šviesos fotonų sužadinamas į aukštesnę energinę būseną, iš kurios prasideda seka virsmų, kurių metu susidaro toksiškos dalelės, dažniausiai aktyvios deguonies formos, sukeliančios biologinių makromolekulių pažeidimas, dėl kurių žūva ląstelės. Visą biologinių sistemų fotosensibilizacijos procesą apimantis mechanizmas gali būti padalytas į du etapus. Pirmojo metu vyksta toksiškų dalelių generavimas ir jo efektyvumą lemia sensibilizatoriaus fotofizikinės ir fotocheminės savybės. Antrasis etapas – fotosensibilizacijos reakcijų metu susidariusių toksiškų dalelių poveikis ląstelėms (apie tai rašoma 7 skyriuje).

Dar kartą prisiminsime, kad šviesos fotoną sugėrusi sensibilizatoriaus molekulė iš pagrindinės būsenos sužadinama į trumpai gyvuojančią singuletinę būseną iš kurios interkombinacinės konversijos būdu relaksuoja į gana ilgai gyvuojančią tripletinę būseną, iš kurios inicijuojamos fotocheminės reakcijos.

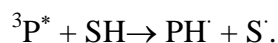
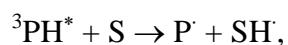
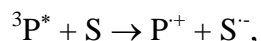
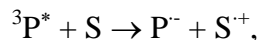
Nuomonė, kad gyvoje ląstelėje ir organinių medžiagų tirpaluose pirminis fotosensibilizuotas poveikis yra vienodas, jau pirmojoje XX a. pusėje padėjo susiformuoti kelioms šio reiškinio molekulinį mechanizmų hipotezėms. Vėliau skelbtos teorijos, kad tik vienas iš tų mechanizmų apibūdina fotosensibilizuotą poveikį, nepasiteisino. 1948 metais

buvo pasiūlyta visas fotochemines reakcijas suskirstyti į du tipus pagal pirminių procesų pobūdį. I tipui buvo priskirtos reakcijos, kurių pradinė stadija – oksiduotų substratų dehidrinimas, o II tipui – deguonies fotopernešimo reakcijos, kurių pradinė stadija – kompleksas tarp sužadinto fotosensibilizatoriaus molekulės ir deguonies, susidarymas.

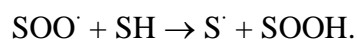
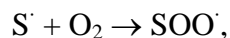
Vėliau, 1968 metais, tokią reakcijų klasifikaciją patobulino K. S. Foote. Jis I tipo reakcijoms priskyrė visas reakcijas, kurių metu susidaro laisvi fotosensibilizatorių radikalai, II tipo reakcijoms – vyksmus, kurių metu sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės sąveikauja su deguonimi (Foote, 1968).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

Taigi fotosensibilizatorių inicijuotos fotocheminės reakcijos pagal pirminių procesų pobūdį skirstomos į du tipus. I tipo reakcijose sensibilizatorius tiesiogiai sąveikauja su aplinkinėmis molekulėmis (substratu), atplėšdamos arba atiduodamos elektroną (arba vandenilio atomą); II tipo reakcijose sužadintos sensibilizatoriaus molekulės generuoja singuletinį deguonį, kuris sukelia citotoksinius procesus. Aptarsime jas išsamiau.

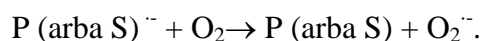
I tipo fotosensibilizuotos reakcijos. Šio tipo reakcijų metu į tripletinę būseną sužadintas fotosensibilizatorius $^3P^*$ tiesiogiai sąveikauja su substrato S molekule. Reakcijų metu vyksta elektrono arba vandenilio atomo atplėšimas ir susidaro radikalai arba jonradikalai:



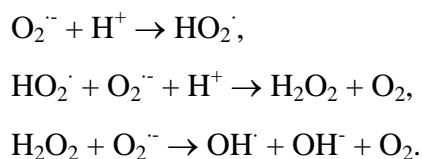
Susidarę radikalai gali dalyvauti įvairiose reakcijose. Kai aplinkoje yra deguonies, oksiduotos sensibilizatoriaus arba substrato formos reaguoja su O_2 , sudarydamos peroksiradikalus ir taip inicijuoja grandininės autooksidacijos reakcijas:



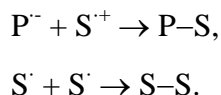
Iš dalies redukuotas sensibilizatorius (arba substratas), reaguodamas su deguonimi, grįžta į pagrindinę būseną ir susidaro superoksianijono radikalas:



Superoksianijono radikalai gali tiesiogiai reaguoti su įvairiais substratais arba inicijuoti kitų aktyvių deguonies formų, tokių kaip vandenilio peroksidas (H_2O_2) arba hidroksilo radikalas (OH^\cdot) susidarymą. Fiziologinėmis sąlygomis H_2O_2 susidaro vykstant $\text{O}_2^{\cdot-}$ dismutacijai, kurios metu $\text{O}_2^{\cdot-}$ prisijungia protoną ir sudaro konjuguotą rūgštį HO_2^\cdot , savo ruožtu reaguojančią su $\text{O}_2^{\cdot-}$. Vandenilio peroksidui reaguojant su $\text{O}_2^{\cdot-}$, generuojamas hidroksilo radikalas:



Jeigu aplinkoje trūksta deguonies, sensibilizatoriaus ir substrato radikalai gali reaguoti tarpusavyje, sudarydami kovalentinius sensibilizatoriaus ir substrato bei substrato ir substrato aduktus:



Taigi vykstant I tipo fotosensibilizuotoms reakcijoms, susidaro įvairių aktyvių tarpinių produktų. Nors pirmuose reakcijų etapuose deguonis nedalyvauja, jo buvimas (arba nebuvimas) artimoje aplinkoje lemia tolesnes reakcijas ir jų produktus, nes susidaranti aktyvios deguonies formos, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ir OH^\cdot , yra agresyvūs biomolekulių oksidatoriai.

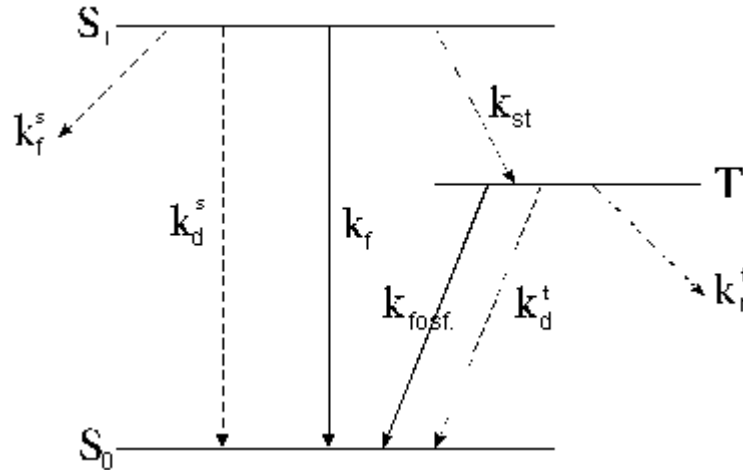
Nagrinėjant I tipo reakcijų mechanizmus būtina aptarti sensibilizatoriaus sužadintas būsenas. Nustatyta, kad I tipo reakcijose dalyvauja fotosensibilizatorius, sužadintas į dvi galimas būsenas: singuletinę (^1P) ir tripletinę (^3P). Trijų lygmenų Jablonskio diagramoje (4.1 pav.) pateikiamos konstantos nurodo singuletinio ^1P ir tripletinio ^3P lygmenų sužadinimo relaksacijos (fluorescencijos (k_f), nespindulinės relaksacijos (k_d^s , k_d^t), fosforescencijos (k_{fosf}) ir interkombinacinės konversijos (k_{st}) būdu) tikimybes. Narys $k_f[\text{RH}]$ apibūdina sužadintos molekulės dalyvavimo fotocheminiuose vyksmuose tikimybę (R nurodo substrato radikalą). Naudojantis schema (4.1 pav.) galima užrašyti fotocheminių vyksmų kvantinių našumų (Φ_r) išraiškas. Jeigu procesas vyksta per ^1P būseną, tai:

$$\Phi_r^s = \frac{k_r^s[RH]}{k_r^s[RH] + k_f + k_d^s + k_{st}} \quad (4.1)$$

Jei procesas vyksta per 3P būseną, tai:

$$\Phi_r^t = \frac{\Phi_{st} k_r^t[RH]}{k_r^t[RH] + k_d^t + k_{ph}} \quad (4.2)$$

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



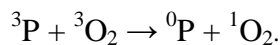
4.1 pav. Fotosensibilizatoriaus elektroninių lygmenų ir šuolių tarp jų diagrama bei sužadintųjų būsenų relaksacijos vyksmų konstantų žymėjimai

Veiksmingų fotosensibilizatorių sužadintosios singuletinės būsenos gyvavimo trukmė [$\tau_s=1/(k_f + k_d^s + k_{st})$] yra maždaug 10^{-9} – 10^{-8} sekundės, o tripletinės būsenos gyvavimo trukmė [$\tau_t=1/(k_d^t + k_{fosf.})$] – apie 10^{-4} – 10^{-2} sekundės. Todėl, būdamas sužadintos singuletinės būsenos, sensibilizatorius sužadavimo energiją gali perduoti tik šalia esančioms molekulėms, o sensibilizatoriui esant sužadintos tripletinės būsenos gali vykti difuzijos ribojamos reakcijos.

II tipo fotosensibilizuotos reakcijos. 1931 m. H. Kautskis eksperimentais parodė, kad fotosensibilizuotose reakcijose dalyvauja sužadintos singuletinės būsenos deguonies molekulė. Jo eksperimentai rėmėsi R. S. Mullikeno teoriniu darbu, kuriame nustatyta, kad sužadinta deguonies molekulė gali būti dviejų singuletinių būsenų, žymimų $^1\Sigma_g^+$ ir $^1\Delta_g$.

1964 m. prasidėjo šiuolaikinis II tipo reakcijų tyrimo etapas. Daugiausia šioje srityje nuveikė K. Foote, jam priklauso ir išvada, kad sensibilizuotų reakcijų metu susidaro singuletinės būsenos $^1\Delta_g$ deguonis (K. Foote ir S. Wexler, 1964; Foote ir kt., 1970).

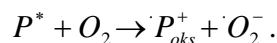
Taigi II tipo fotosensibilizuotų reakcijų metu sužadintas tripletinės būsenos sensibilizatorius energiją perduoda deguonies molekulei, kurios pagrindinė būsena yra tripletinė, pervesdamas deguonį į sužadintą singuletinę būseną:



Kadangi abi reaguojančios molekulės yra tripletinių būsenų, energijos perdavimas tarp jų nėra draudžiamas ir vyksta efektyviai. Susidaręs singuletinis deguonis gali būti dviejų būsenų ${}^1\Sigma_g^+$ ir ${}^1\Delta_g$, tačiau fotosensibilizacijos inicijuotose reakcijose dalyvauja ilgiau gyvuojanti forma ${}^1\Delta_g$.

Sąveikaudamas su substratu, singuletinis deguonis (${}^1\text{O}_2$) sudaro nestabilius ciklinius peroksidus, kurie vėliau terminių ar fermentinių reakcijų metu suyra. ${}^1\text{O}_2$ nuo oksiduojamų substratų gali atplėšti elektroną ir sudaryti superoksidų radikalus $\cdot\text{O}_2^-$, kurie irgi dalyvauja fotocheminėse reakcijose. Šiuo atžvilgiu II tipo reakcijos panašios į I tipo reakcijas.

Galima reakcija, kurios metu reaguojant sužadinto fotosensibilizatoriaus molekulei su deguonimi atplėšiamas elektronas ir susidaro $\cdot\text{O}_2^-$:



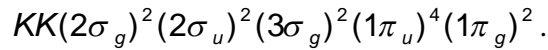
1935 m. tokį vyksmą postulavo J. Weissas (Weiss, 1935). Šiuolaikiniai eksperimentai patvirtina tokį $\cdot\text{O}_2^-$ susidarymo mechanizmą, tačiau šio vyksmo našumas, palyginti su singuletinio deguonies susidarymu, nedidelis.

II tipo reakcijoms kiekybiškai įvertinti tinka (4.1) ir (4.2) formulės, tik jose vietoj $k_f[\text{RH}]$ reiktų naudoti sandaugą $k_o[\text{O}_2]$ (k_o – sužadintos fotosensibilizatoriaus būsenos gesinimo deguonimi greičio konstanta).

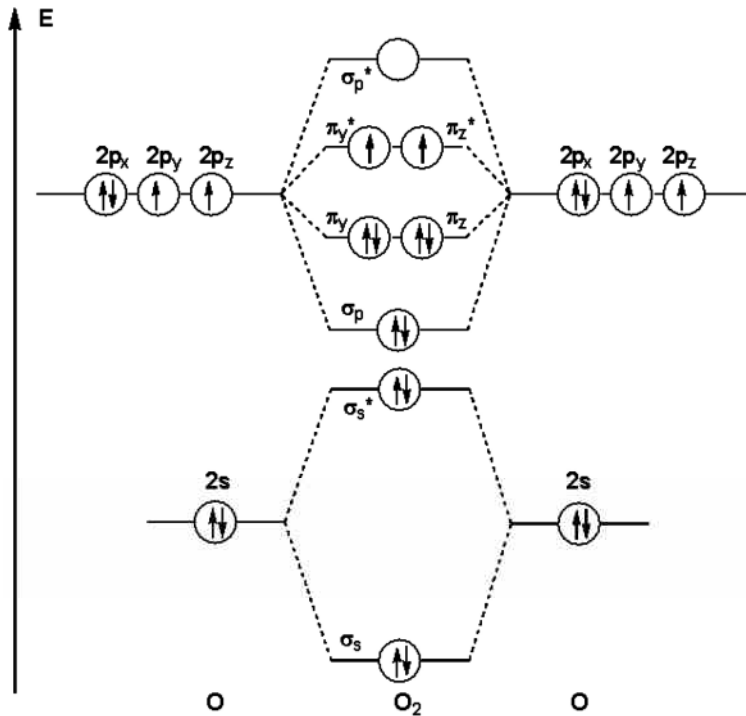
Singuletinio deguonies savybės. Singuletinio deguonies įnašas į I ir II tipo fotosensibilizuotas reakcijas skirtingas. I tipo reakcijose ${}^1\text{O}_2$ susidaro nedideli kiekiai ir tik antriniuose procesuose. II tipo reakcijų efektyvumą, priešingai, nulemia ${}^1\text{O}_2$ aktyvumas, taigi singuletinis deguonis yra tarsi fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmo indikatorius. Realus ${}^1\text{O}_2$ įnašo į fotosensibilizacijos procesus įvertinimas – vienas svarbiausių uždavinių tyrinėjant

fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmus, todėl verta išsamiau aptarti singuletinio deguonies savybes.

Molekulinis deguonis. Molekulinis deguonis turi unikalią elektroninę struktūrą, suteikiančią jam ypatingas fizikines ir chemines savybes, kurios ir nulemia nepaprastą deguonies svarbą chemijoje ir biologijoje. Pirmasis paramagnetines deguonies O₂ savybes pastebėjo M. Faradėjus apie 1840 metus, o maždaug po šimtmečio, 1928 m., R. Mullikenas, remdamasis molekulių orbitalių teorija, užrašė deguonies molekulos elektroninę struktūrą:



Iš dviejų deguonies atomų O(1s² 2s² 2p⁴) sudarytoje molekulyje O₂, 16 elektronų molekulinėse orbitalėse pasiskirsto taip, kaip parodyta 4.2 pav.



4.2 pav. Deguonies molekulos molekulių orbitalių užpildymo schema

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 $^1\Delta_g$. $^1\Sigma_g^+$ būsenai 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 buvimas įrodytas matuojant molekulinio deguonies sugerties ir liuminescencijos spektrus.

Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė. Kadangi šuolis $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)$ kvantinės mechanikos požiūriu yra griežtai draudžiamas, būsenos $^1\Delta_g$ gyvavimo trukmė yra gana ilga (metastabilus lygmuo). Dujose ši būseną gyvuoja net 45 min. Tirpaluose singuletinio deguonies gyvavimo trukmė daug mažesnė, nes šuolio draudimas susilpnėja molekulėms dažnai susiduriant. Gyvavimo trukmė taip pat priklauso nuo tirpiklio prigimties. Pavyzdžiui, 1O_2 gyvavimo trukmė vandenyje yra apie 4 μs , o sunkiajame vandenyje – apie 67 μs . Dėl tokios gana ilgos gyvavimo trukmės biologinėse sistemose vykstančiose reakcijose labai svarbus singuletinio deguonies vaidmuo. Reikia pabrėžti, kad singuletinis deguonis yra

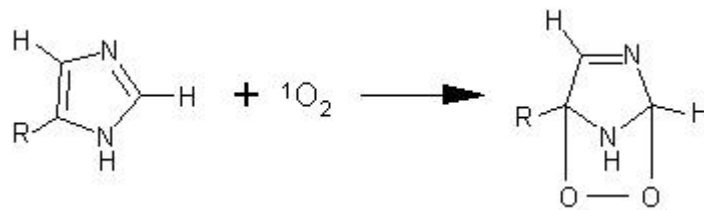
nepaprastai aktyvus oksidatorius, veikiantis visas jo aplinkoje esančias molekules, nes dėl singuletinio multiplietumo jam nėra jokių sukinių draudimo taisyklių dalyvauti reakcijose su kitomis molekulėmis.

Toliau aptariami fotosensibilizacijos pavyzdžiai biologinėse sistemose.

Fotosensibilizuotos biomolekulių pažeidos. Kaip jau žinome iš trečiojo skyriaus, gyvosios sistemos – ląstelės ar neląstelinės struktūros – yra sudarytos iš keturių tipų biomolekulių: baltymų, nukleorūgščių, lipidų ir angliavandenių. Baltymai, nukleorūgštys ir kai kurie angliavandeniai yra polimerinės molekulės, sudarytos iš vienujų arba, beje, dažniausiai, skirtingų monomerų, o lipidai sudaro didžiulius vandenyje netirpių molekulių agregatus – membranas.

Fotosensibilizuotai oksidacijai yra jautrūs baltymai, lipidai ir kai kurios nukleorūgščių sudėtinės dalys. Angliavandenius oksiduoti, veikiant regimajai šviesa, yra sunku.

Gausiausios biomolekulės ląstelėje yra baltymai. Jų molekulė – tai ilga grandinė, kuri susidaro, sujungus nuo keliadešimt iki kelių tūkstančių aminorūgščių. Gyvosiose sistemose aptinkama apie 300 skirtingų aminorūgščių, bet žmogaus organizmo baltymai sudaryti iš dvidešimties. Fotosensibilizuotam poveikiui jautrios yra keturios: histidinas His, cisteinas Cys, metioninas Met ir triptofanas Trp. His ir Met fotosensibilizuotos oksidacijos reakcijos būna II tipo, Trp ir Cys – ir II, ir I tipo. Viena iš svarbiausių oksiduojamų aminorūgščių – histidinas lengvai reaguoja su $^1\text{O}_2$. Pirmiausia išskiriami produktai būna su smarkiai suirusiu heterociklu. Išskiriama endoperoksidų (4.3 pav.).

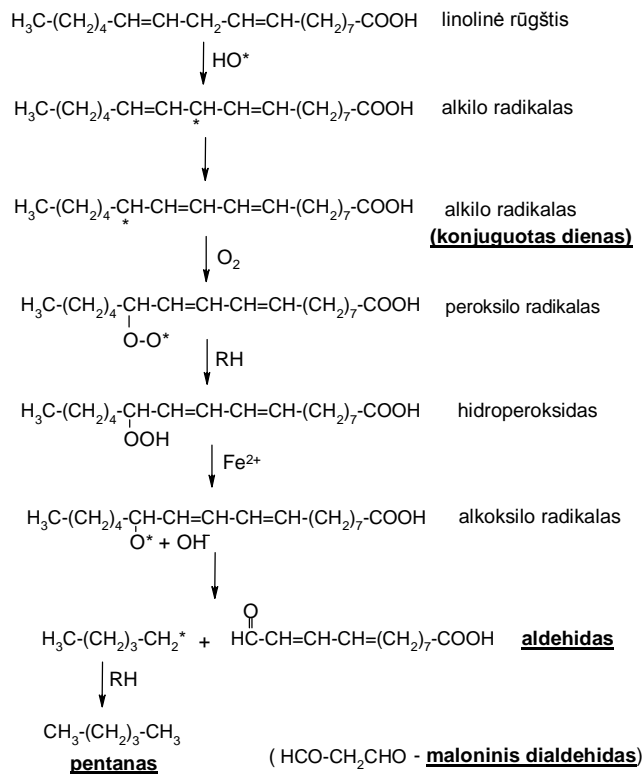


4.3 pav. Histidino oksidacija

Vandeninių baltymų tirpalų tiesioginė ar sensibilizuota fotolizė sukelia beveik visų baltymo tirpalo savybių pokyčius. Kinta sugerties spektras, baltymo elektroforezinės savybės, tirpumas, jautrumas temperatūrai (termostabilumas), titravimo kreivės, padidėja

jautrumas proteoliziniams fermentams, kinta katalizinis fermentų aktyvumas. Susieti tuos pokyčius su specifinėmis fotocheminėmis reakcijomis nelengva dėl struktūrinio baltymų sudėtingumo.

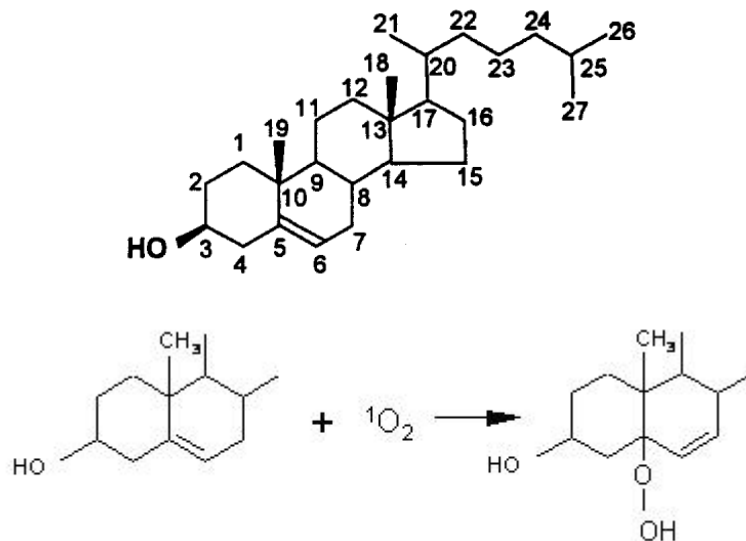
Visos ląstelių membranos turi apie 50% nesočiųjų lipidų – riebalų rūgščių su dviguba jungtimi. Riebalų rūgščių dvigubos jungtys nėra lengvai fotooksiduojamos, todėl fotosensibilizuotos oksidacijos metu susidaro nedideli kiekiai endo- ir hidroperoksidų. Tačiau nedidelį reakcingumą kompensuoja tamsinės lipidų peroksidacijos grandininės reakcijos. Greita dvigubų jungčių esančius H gali atitraukti laisvieji radikalai, pavyzdžiui, HO·. Lieka lipido radikalas, kuris reaguoja su O₂, ir susidaro lipido peroksido radikalas LOO·. Tai stiprus oksidatorius, galintis atitraukti kitą H nuo kito C atomo, susidarant lipido hidroperoksidui. Peroksidai – nestabilūs junginiai, savaime skyla šildant, lengvai fragmentuoja į mažesnės molekulinės masės produktus. Taip HO· inicijuoja autokatalizinę vyksmą. Toji seka vadinama lipidų peroksidacija. Jos rezultatas – nesočiųjų riebalų rūgščių irimas. Atsižvelgiant į sąlygas, lipidų peroksidacijos metu susidaro daugybė įvairios struktūros ir molekulinės masės junginių, persitvarkant ir skylant mono-, di-, tri- ar tetraoksiduotiems riebalų rūgščių dariniams. Tai karboniliniai junginiai (aldehidai, ketonai), alifatiniai angliavandeniliai, furanai (4.4 pav.).



4.4 pav. Linolinės rūgšties peroksidacijos reakcijos

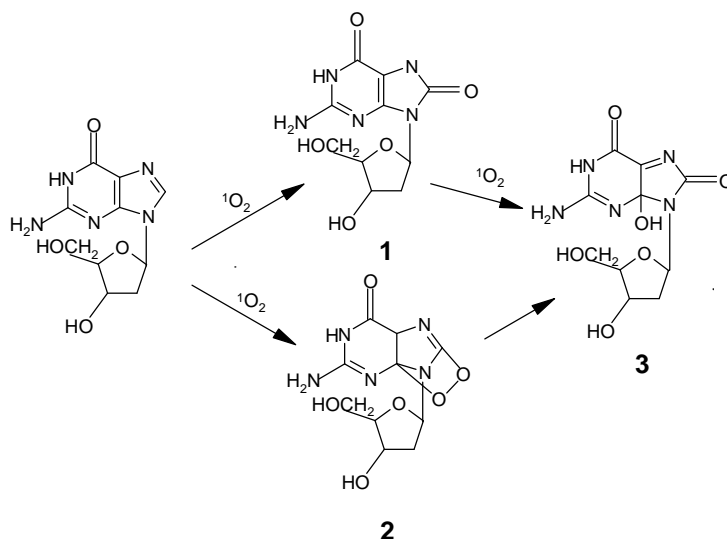
Visose lipidų peroksidacijos stadijose susidaro tarpinių junginių, kurie gali reaguoti su funkcinėmis baltymų grupėmis (NH₂, SH), taip juos keisdami ir inaktyvuodami. Ląstelė gali būti pažeista, nepaisant apsauginių detoksikacijos sistemų. Kai kurie hidroperoksidai virsta fiziologiniais tarpininkais, kurie pradeda ir reguliuoja ištiesas biocheminių reakcijų sekas.

Labai svarbi cholesterolio reakcija. Cholesterolis sudaro didelę dalį membranos (apie 40 % eritrocitų membranos). Jo oksiduotus produktus galima nustatyti lengviau negu riebalų rūgščių oksiduotus produktus. Tačiau reakcijos kvantinis našumas mažas, todėl matuojant cholesterolio oksidaciją reikia naudoti žymėtą radioaktyvų ¹⁴C-cholesterolį. Reakcijos produktų sudėtis priklauso nuo reakcijos mechanizmo. Radikalinės peroksidacijos metu susidaro 7β-hidroperoksicholesterolis, o veikiant ¹O₂, gaunamas 5α-hidroperoksicholesterolis. Ši cholesterolio savybė naudojama nustatant fotocheminės reakcijos mechanizmą (4.5 pav.).



4.5 pav. Cholesterolis ir jo oksidacija. Radikalinės peroksidacijos metu susidaro 7β-hidroperoksicholesterolis, veikiant $^1\text{O}_2$, gaunamas 5α-hidroperoksicholesterolis

Nukleorūgštys nėra labai jautrios fotosensibilizuotai oksidacijai. Jų sudėtyje esančios angliavandenių ir fosforo rūgšties liekanos nėra oksiduojamos. Iš nukleobazių fotosensibilizuotai oksidacijai jautriausios yra ksantinas ir guaninas. Guaninas yra pats reakcingiausias junginys tiek I, tiek II tipo fotosensibilizuotose reakcijose. 8-okso-guanozinas yra pagrindinis reakcijos su $^1\text{O}_2$ produktas. Tačiau 8-okso-guanozinas gali susidaryti DNR molekulėje ir per $\cdot\text{OH}$ ar guanino radikalkatijonus. 8-okso-guanozinas susidaro tiek vandeniniuose tirpaluose, tiek ląstelių kultūrose (4.6 pav.).



4.6 pav. 2'-deoksiguanozino sensibilizuota fotooksidacija

[1] 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksiguanozinas

[2] 4,8-endoperoksidai

[3] 4,8-dihidro-4-hidroksi-8-okso-2'-deoksiguanozinas

Svarbūs singuletinio deguonies biologiniai substratai yra lipiduose tirpus vitaminas E ir hidrofilinis vitaminas C. Tai veiksmingi singuletinio deguonies gesikliai.