

Laboratorinis darbas

**Fotosensibilizuota navikų terapija ir navikų
vaizdinimas**

2008
Vilnius

Fotosensibilizuota navikų terapija ir navikų vaizdinimas

1. Darbo tikslas

Ištirti fotodensibilizatorių tinkamumą fotosensibilizuotoje diagnostikoje ir fotodinaminėje terapijoje

2. Darbo uždaviniai.

1. Išmatuoti hemato porfirini ir rodamino sugerties bei fluorescencijos spektrus.
2. Ištirti kaip priklauso fotosensibilizatorių sugertis ir fluorescencija nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio ir fotosensibilizatoriaus koncentracijos.
3. Ištirti fotosensibilizatorių fotosensibilizacijos efektyvumą, esant skirtingoms žadinančios spinduliuotės bangoms ilgiams, matuojant singletinio deguonies koncentraciją.
4. Įvertinantys sklaidančios terpės įtaką fotosensibilizatoriaus žadinimo efektyvumui.

3. Teorinė dalis

I. Šviesos sugerties dėsnis

Pereinant elektromagnetinei bangai medžiaga, dalis bangos energijos išsekvojama elektronų virpesių sužadinimui atomuose ir molekulėse. Idealyje vienalytėje terpėje periodiškai virpantis dipolis spinduliuoja antrines to paties dažnio elektromagnetines bangas, kurios interferuodamos su pirmine banga pakeičia jos fazinį greitį ir pilnutinai grąžina sugertos energijos dalį.

Realioju atveju ne visa virpančiųjų elektronų energija išspinduliuojama atgal elektromagnetinių bangų pavidalu. Dalis energijos virsta kitomis energijos

formomis - pagrindinai šilumine. Sužadinti atomai ir molekulės sąveikauja ir susiduria vieni su kitais. Šiuose susidūrimuose elektronų virpesių energija atomų viduje gali virsti išorinio atomų kaip visumos netvarkingojo judėjimo energija. Metaluose elektromagnetinė banga sukelia laisvųjų elektronų virpesius, kurie po to susidūrimuose atiduoda sukauptą energijos perteklių kristalo gardelės jonams ir tuo pačiu jį sušildo. Atskirais atvejais molekulės sugertoji energija gali susikaupti tam tikroje cheminėje jungtyje ir išsikvojama jos suardymui. Turime taip vadinamas *fotochemines reakcijas*.

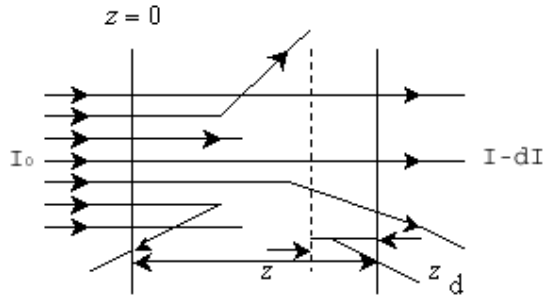
Kai yra ženklūs optiniai terpės netolygumai, tai tam tikra elektromagnetinės bangos dalis, spinduliuojama atomų ir molekulių atgal, yra nekoherentinės pirminės bangos atžvilgiu ir išsklaidoma į visas puses. Tokios sklaidos pasekoje pirminio pluoštelio energija palaipsniui mažėja.

Šviesos sugertis kiekybiškai įvertinama *sugerties koeficientu*, kuris priklauso nuo medžiagos prigimties, cheminės sudėties, agregatinės būsenos, koncentracijos, temperatūros ir nuo sąveikaujančios su medžiaga šviesos bangos ilgio. Sugerties koeficiento priklausomybė nuo bangos ilgio vadinama *sugerties spektru*.

Tegu šviesos intensyvumas plokštumoje $z=0$ yra I_0 (1 pav.). Perėjus sluoksnį z , šviesos pluoštelis susilpnėja iki I ir tampa mažesnis už I_0 . Išskirkime sritį dz . Šviesos intensyvumas perėjus sluoksnį $z+dz$, bus $I-dI$. Dydis dI yra sugertas ir išsklaidytas sluoksnyje dz šviesos srautas ir priklauso nuo krentančiojo į šį sluoksnį šviesos intensyvumo:

$$-dI = kI dz ; \quad (1)$$

čia k - šviesos silpimo koeficientas, į kurį įeina tikrasis sugerties koeficientas ir koeficientas, charakterizuojantis pirminio pluoštelio energijos nuostolius dėl kitų procesų, ypač sklaidos.



1 pav. Šviesos sugertis ir sklaida

Integruojant (1) gaunama: $I = I_0 \exp(-kz)$. Tai *Bugerio dėsnis*. Koeficientas k nusakomas konkrečiam bangos ilgiui: $k_\lambda = 1/z \ln I_{0\lambda}/I_\lambda$. Kai $z = 1/k_\lambda$, tai $I_\lambda = I_{0\lambda}/e$, t.y. silpimo (sugerties) koeficientas yra dydis, atvirkščias sluoksniui, kurį perėjęs šviesos intensyvumas sumažėja e kartų.

Dydis $D_\lambda = \ln(I_{0\lambda}/I_\lambda)$ vadinamas *optiniu tankiu*. Dar naudojamas *optinis pralaidumas* $T_\lambda = I_\lambda/I_{0\lambda}$.

Tada optinį tankį galima užrašyti tokiu pavidalu: $D_\lambda = \ln 1/T_\lambda = -\ln T_\lambda$.

Tirdamas tirpalus Beras nustatė, kad sugerties koeficientas k_λ proporcingas tirpalo koncentracijai c : $k_\lambda = a_\lambda c$; čia a_λ - vienetinės koncentracijos koeficientas. Tada jungtinis Bugerio ir Bero dėsnis užrašomas taip:

$$I_\lambda = I_{0\lambda} \exp(-a_\lambda cz). \quad (2)$$

Iš čia $a_\lambda = (1/cz) \ln I_{0\lambda}/I_0 = D_\lambda/cz$.

Kadangi sugerties koeficientas priklauso nuo bangos ilgio tai Bugerio ir Bero dėsnis taikomas tik monochromatinei spinduliutei. Sugerties koeficiento dispersija (priklausomybė nuo bangos ilgio) labai ryški arti rezonanso tarp krentančios šviesos dažnio ir nuosavųjų elektronų virpesių dažnio atomuose. Šiuo atveju smarkiai išauga elektronų priverstinių virpesių amplitudė ir padidėja jų perėjimo tikimybė į šiluminio judėjimo energiją. Tokiu būdu įvairių ilgių

bangos tame pačiame sluoksnyje sugeriamos skirtingu laipsniu. Rezonansinio dažnio bangos visiškai sugeriamos ploname sluoksnyje.

Proporcingumas tarp $-dI$ ir I išsklaidytiems spinduliams galioja tik esant vienkartinei sklaidai ir siauriems pluošteliams.

Iš Bugerio ir Bero dėsnio dar išplaukia, kad sugerties koeficientas nepriklauso nuo krentančiosios šviesos intensyvumo. Pagal Vavilovą intensyvumo pokytis netgi

iki 10^{20} kartų nepažeidžia Bugerio ir Bero dėsnio. Tačiau naudojant labai stiprius šviesos srautus (lazerinius), jau pastebimi nuokrypiai.

II. Šviesos sklaida

Biologinis audinys - sudėtinga sistema, sudaryta iš daugybės biologinių molekulių, organoidų, ląstelių, kurie gali išsklaidyti šviesą. Dėl to fotonas prieš jį sugeriant daug kartų pakeis savo sklidimo kryptį – bus išsklaidytas.

Sklaida tai vienas iš pagrindinių fizikinių procesų kurio metu kinta spinduliuotės sklidimo kryptis.

Elektromagnetinės spinduliuotės sklaida, kurios metu nepakinta jos dažnis, vadinama koherentine sklaida (priešingu atveju sklaida vadinama nekoherentine sklaida). Be to, jeigu elektromagnetinės bangas sklaido laisvieji elektronai, tuomet koherentine sklaida vadinama Tomsono sklaida, o jeigu jas sklaido atomu elektronai ir jeigu bangos ilgis yra žymiai didesnis už atomo matmenis, tuomet koherentine sklaida vadinama Relėjaus sklaida (Rayleigh scattering).

Kvantinės mechanikos požiūriu, sklaidos įvykis – tai dviejų dalelių – fotono ir

elektrono arba fotono ir atomo – susidūrimas. Jeigu fotonas susiduria su laisvuoju elektronu, tuomet tokia sąveika yra tamprioji, nes jos metu nekinta dalelių kinetinių energijų suma. Dalelių energijas ir judesio kiekius po susidūrimo nusako energijos ir judesio kiekio tvermes dėsniai. Iš šių dėsnių

išplaukia, kad dėl atatrąkos sklaidos metu fotonas dalį savo energijos ir judesio kiekio perduoda elektronui. Dėl to fotono energija ir dažnis sumažėja (taigi, sklaida yra nekoherentinė). Šis reiškinys, kuri 1922 m. apraše amerikiečių fizikas A. Komptonas, tapo vienu iš kvantinės mechanikos kertiniu akmeniu, nes jis parodė, jog elektromagnetinė spinduliuotė turi korpuskulinių savybių.

Tokia sklaida, kurios metu sumažėja spinduliuotės dažnis, vadinama Komptono sklaida, o dažnio sumažėjimas (ir atitinkamas bangos ilgio padidėjimas) vadinamas Komptono efektu. Dažniausiai fotonas perduoda elektronui žymią savo energijos dalį. Šie greitieji elektronai, kurie atsirado dėl Komptono sklaidos, yra vadinami Komptono atatrąkos elektronais. Fotonus gali sklaidyti ne tik laisvieji elektronai, bet ir atomai (tiksliau, atomų elektronai). Jeigu tokios sklaidos metu sumažėja fotono energija, tuomet sklaida taip pat yra vadinama Komptono sklaida. Komptono sklaida dėl fotono sąveikos su atomu (o ne su laisvu elektronu) nėra tamprioji, nes jos metu dalis fotono energijos virsta atomo vidine energija. Pvz., jeigu atomas jonizuojamas, tuomet fotono energijos nuostoliai yra sudaryti iš dviejų dalių: Komptono atatrąkos elektrono kinetinės energijos ir to elektrono ryšio energijos atome (elektrono ryšio energija – tai darbas, kuri reikia atlikti, pašalinant elektroną iš duotojo elektrono

Elektromagnetinės spinduliuotės sklaidos rūšys

	Klasikinė fizika		Kvantinė fizika		
	Pavad.	Koher.?	Pavad.	Koher.?	Ribiniai atvejai
Sklaida laisvaisiais elektronais ^a	Tomsono sklaida	Taip	Komptono sklaida	Ne	Kai $h\nu \ll m_0c^2$, Komptono sklaidą galima laikyti Tomsono sklaida (t.y., aprašyti klasikinės fizikos metodais).
Netamprioji sklaida atomais	–	–	Komptono sklaida	Ne	Kai $h\nu > m_0c^2$, sklaidą atomais galima aprašyti taip pat, kaip sklaidą laisvaisiais elektronais; atomas sklaidos metu yra jonizuojamas. Be to, šiuo atveju Komptono sklaida yra vyraujantis sklaidos mechanizmas. Kai $h\nu$ tampa mažesnė už valentinių elektronų ryšio energiją, jonizavimas tampa neįmanomas ir netampriosios sklaidos metu atomas yra tik sužadinamas. Be to, šiuo atveju netamprioji sklaida vyksta žymiai rečiau, negu koherentinė sklaida. Kai $h\nu$ yra mažesnė už mažiausią sužadinimo energiją, netamprioji sklaida tampa neįmanoma. Tuomet vyksta tik koherentinė sklaida.
Tamprioji sklaida atomais	Koherentinė sklaida; Reilėjaus sklaida	Taip	Koherentinė sklaida	Taip	Kai $h\nu > 500$ keV, koherentinė sklaida vyksta žymiai rečiau, negu Komptono sklaida. Kai $h\nu \ll 10$ keV, koherentinė sklaida yra vyraujantis sklaidos mechanizmas.

sluoksnio). Minėtoji ryšio energija Komptono sklaidos metu virsta atomo vidine energija. Be to, įmanomas toks vyksmas, kai sklaidos metu atomas nėra jonizuojamas, o yra tik sužadinamas. Pastaruoju atveju visas fotono energijos sumažėjimas yra lygus atomo vidinės energijos padidėjimui.

Sklaida aprašoma sklaidos koeficientu, kurio atvirkščias dydis nusako laisvąjį fotono kelią iki išsklaidymo.

Intensyvumo sumažėjimas sklaidančioje aplinkoje aprašomas analogiškai sugerčiau:

$$I(z) = I_0 \exp(-a_s z). \quad (3)$$

Elastinės sklaidos atveju – atsakomieji virpesiai yra tokio pat dažnio kaip ir juo sukėlusio bangos. Kai dalelės matmenys mažesni už krintančios bangos matmenis ($> 0.1 \lambda$), vyksta Relėjaus sklaida. Tai elastinės sklaidos rūšis, kurios intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio aprašoma taip:

$$I_s(\Theta) \propto \frac{1 + \cos^2(\Theta)}{\lambda^4}. \quad (4)$$

Skirtingi bangos ilgiai bus išsklaidyti skirtingais kampais. $I \sim 1/\lambda^4$ – trumpesnės bangos bus sklaidomos labiau nei ilgosios. $I \sim 1 + \cos 2\theta$ – spinduliuotės išsklaidytos į priekį ir atgal intensyvumai vienodi

Jei sklaidančios dalelės yra didelės (arba labai mažos $< 0.01 \lambda$), tai Relėjaus sklaidą keičia *Mi* sklaida. Šiuo atveju:

$$I_s \propto \lambda^{-x}, x = 1 - 4. \quad (5)$$

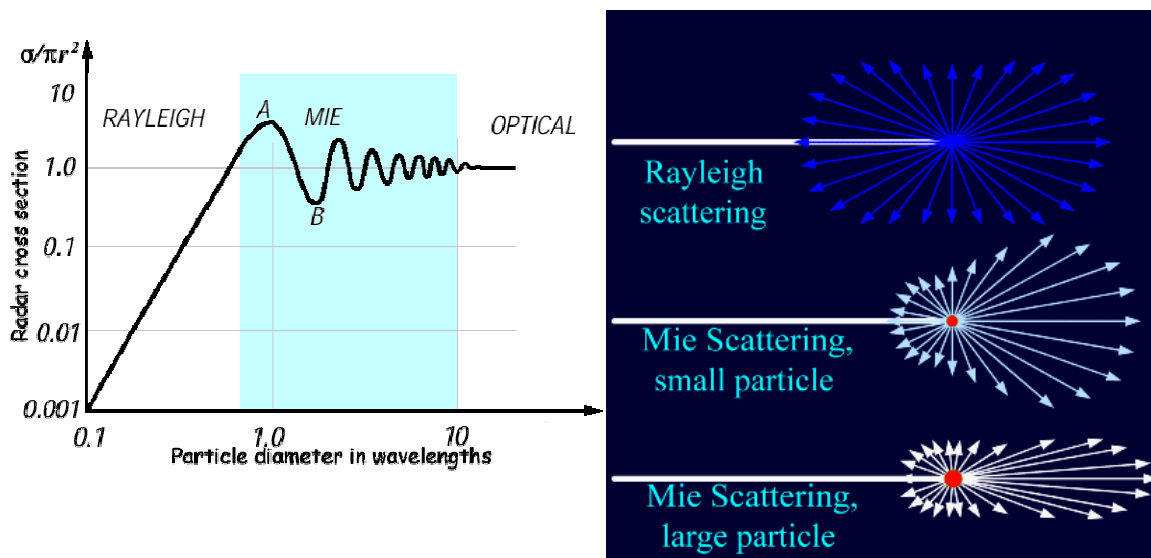
Mi sklaidos pagrindiniai skirtumai:

1. Silpnė priklausomybė nuo bangos ilgio;
2. Mi sklaidos atveju šviesa sklaidoma nedideliais kampais, t.y. nedaug nukrypsta nuo pradiės krypties

Jeigu fotono energija nėra žymiai (bent 100 kartu) didesnė už K sluoksnio elektronų ryšio energiją, tuomet, be Komptono sklaidos, pasireiškia ir kitokio

tipo sklaida – fotonu tamprioji sklaida atomais. Tokios sklaidos metu atomas nėra nei jonizuojamas, nei sužadinamas, o fotono energija praktiškai nepakinta (tai išplaukia iš energijos ir judesio kiekio tvermes dėsnio). Taigi, tokia sklaida yra koherentine. Tokio įvykio tikimybe yra didžiausia, kai kvantą sklaido sunkiųjų elementu atomu vidiniu sluoksniu elektronai, kuriu mažiausioji sužadinimo energija yra palyginti didele. Koherentine sklaida pasireiškia tuo, kad išsklaidytoje spinduliuotėje yra ir pradinio bangos ilgio komponente. Koherentine sklaida tampa vyraujančiu sklaidos mechanizmu, kai fotono energija yra mažesnė už 10 keV (kuo didesnis elemento atominis numeris, tuo platesniame energijų intervale vyrauja koherentine sklaida).

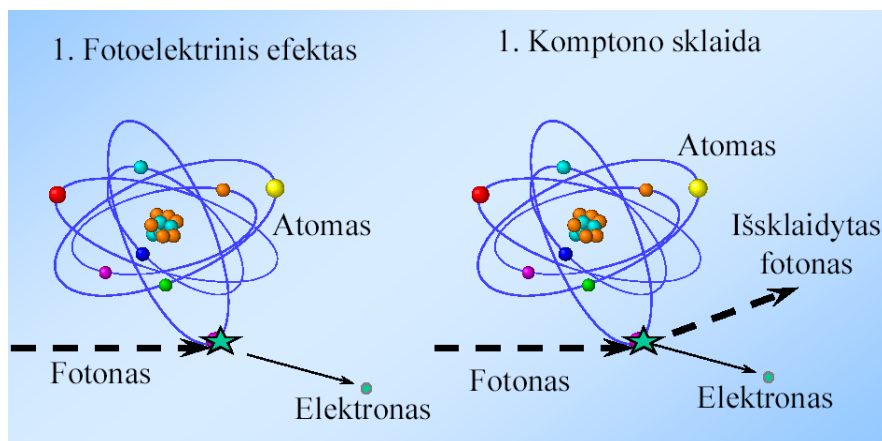
Koherentinę sklaidą galima aprašyti klasikines fizikos metodais. Mažėjant kvanto energijai arba augant sklaidančiosios medžiagos atominiam numeriui, koherentines sklaidos tikimybe auga. Vykstant vidutinės ir aukštos energijos (> 500 keV) . kvantu sklaidai mažo atominio numerio medžiagose (pvz., aliuminyje), koherentine sklaida praktiškai nepasireiškia ir galima laikyti, kad vienintelis sklaidos vyksmas yra Komptono sklaida.



2 pav. Relėjaus ir Mi sklaidos priklausomybė nuo dalelių, kurios sklaido, dydžio ir Relėjaus bei Mi sklaidos erdvinis pasiskirstymas

III. Fotoefektas

Fotoefektas arba fotoelektrinė sugertis – tai tokia fotono sąveika su atomu, kurios metu atomas sugeria visą fotono energiją (t.y., fotonas nustoja egzistuoti), o vienas iš atomo elektronų išlekia iš atomo. Išlaisvintasis iš atomo elektronas vadinamas fotoelektronu. Taigi, pagrindinis skirtumas tarp fotoefekto ir Komptono sklaidos yra tas, kad Komptono sklaidos metu fotonas praranda tik dalį savo energijos, o fotoefekto metu fotonas yra pilnai sugeriamas.



3 pav. Fotoelektrinis efektas ir Komptono sklaida

IV. Liuminescencijos rūšys

Chemiliuminescencija – spinduliuojantis kūnas naudoja energiją, kuri atsiranda vykstant kūno viduje cheminėms reakcijoms.

Biochemiliuminescencija – biologinis objektas naudoja biocheminių vyksmų metu išlaisvintą energiją.

Fotoliuminescencija – kai kūnas išspinduliuoja energiją, kurią prieš tai sugėrė.

Elektroliuminescencija – dujos naudoja elektros išlydžio energiją.

Rentgenoluminescencija – kūnas spinduliuoja energiją, kurią suteikė rentgeno spinduliuotė.

Radioluminescencija – žadinama greitomis dalelėmis, kurios susidaro skylant radioaktyvioms medžiagoms, ir kosminiais spinduliais.

Bioluminescencija – žadinama scheminės reakcijos metu išskiriama energija.

V. Liuminescencija

Liuminescencija yra nepusiausvyrisis savasis sužadintų dalelių arba iš jų sudarytų medžiagų švytėjimas. Nepusiausvyrisis švytėjimo pobūdis skiria ją nuo šiluminės spinduliuotės, o savasis - nuo šviesos atspindžio bei sklaidos.

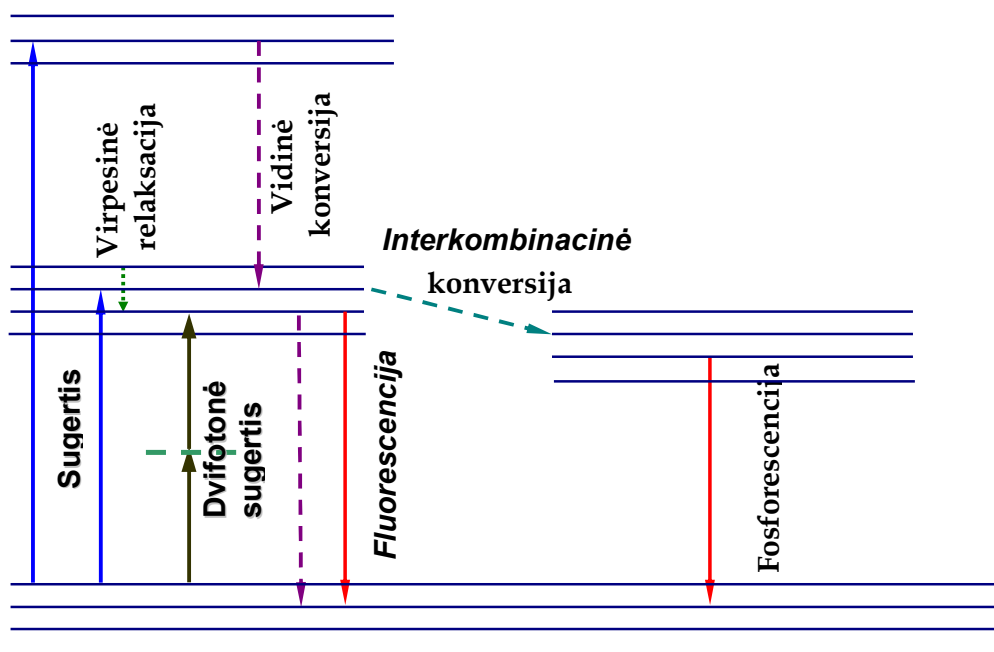
Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija yra skirstoma į fluorescenciją (10^{-11} - 10^{-8} s) ir fosforescenciją ($>10^{-6}$ s). Sužadintosios būsenos gyvavimo trukmė nusako liuminescencijos trukmę. Nutraukus žadinimą molekulių liuminescencija gęsta eksponentiškai: $I = I_0 \exp(-t/\tau)$; I – liuminescencijos intensyvumas laiku t , I_0 – pradinis intensyvumas, τ – švytėjimo trukmė, per kurią liuminescencijos intensyvumas sumažėja e kartų.

Liuminescencijos gesinimas yra procesas, kuris mažina medžiagos liuminescencijos našumą. Liuminescencijos gesintojais gali būti organiniai ir neorganiniai junginiai. Egzistuoja įvairūs liuminescencijos gesinimo būdai. Išskiriamos kelios gesimo grupės.

Pirmajai grupei priskiriami procesai, kurių metu liuminescencijos našumas mažėja dėl gesintojo molekulių ir medžiagos nesužadintų molekulių sąveikos (statinis gesimas). Statinis gesimas susietas su neliuminescuojančių kompleksų susidarymu pagrindinėje būsenoje. Po absorbcijos kompleksas neišspinduliuodamas kvanto pereina į pagrindinę būseną.

Antrajai grupei priskiriami procesai, kurių metu liuminescencijos našumas mažėja dėl gesintojo molekulių medžiagos sužadintų molekulių sąveikos. Tuo pačiu vyksta sužadintų molekulių nespindulinė dezaktyvacija, kurios metu sužadintų molekulių energija perduodama nesužadintoms molekulėms arba sužadinimo energija virsta branduolių virpesine energija.

Mažose koncentracijose ($< 10^{-4}$ mol/l) švytėjimo intensyvumas didėja proporcingai absorbuojančių dalelių skaičiui. Esant tam tikrai koncentracijai intensyvumas pasiekia maksimumą. Toliau didinant koncentraciją intensyvumas nekinta, o dar padidinus – mažėja. Mažose koncentracijose absorbuotas šviesos intensyvumas auga proporcingai koncentracijai, tai vyksta tol, kol tam tikrame koncentracijų intervale tirpalas absorbuoja ne visą žadinančią šviesą. Toliau didinant koncentraciją liuminescencija silpnėja. Liuminescencijos gesinimas taip pat priklauso ir nuo molekulių sandaros. Koncentracinis gesinimas aiškinamas dviem procesais vykstančiais tirpale vienu metu: molekulių absorbcija ir



4 pav. Jablonskio daugiaatomės molekulės lygmenų diagrama

neliuminescuojančių asociantų susidarymu, ir energijos migracija nuo sužadintų monomerų nešvytintiems asociantams. Tokio pobūdžio gesinimo procesai vyksta įvairių organinių junginių tirpaluose. Susidarant asociantams kvantinis našumas sumažėja, bet liuminescencijos spektro pati forma nepakinta. Kaip šviesa sugerama ir kaip vyksta liuminescencija iliustruoja Jablonskio diagrama (žr. 4 pav.). Pagrindinėje būsenoje visos molekulinės orbitalės yra užpildytos

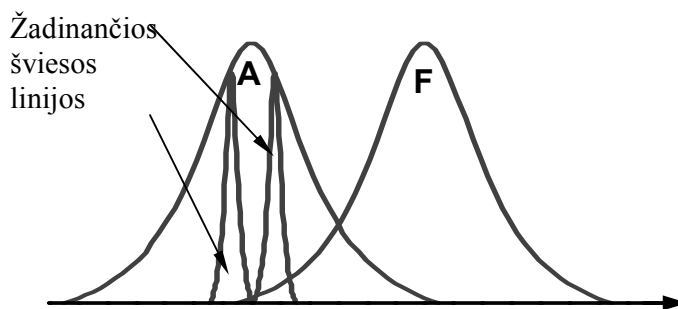
elektronų poromis. Pagal Paulio draudimo principą vienas elektronas gali būti tik vienoje mikrobūsenoje, o pagrindinėje būsenoje mikrobūsenos skiriasi tik sukiniais (sukinio vertės gali būti tik dvi: $1/2$ ir $-1/2$), todėl vienoje orbitalėje esančių elektronų sukiniai yra priešingi. Iš to seka, kad pagrindinės būsenos sukinys yra lygus nuliui. Sužadinus molekulę elektronas peršoka į aukštesnę orbitalę.

Elektrono sukinys gali būti orientuotas ta pačia arba priešinga kryptimi. Iš to seka, kad sužadinta molekulė gali būti dviejų būsenų. Pirmoje būsenoje suminis sukinių kvantinis skaičius yra 0, o antroje 1. Išoriniame magnetiniame lauke pirmuoju atveju sukinio projekcija gali įgyti vieną vertę (0), antruoju atveju – tris vertes (-1, 0 ir 1), todėl šios būsenos atitinkamai vadinamos singletinėmis ir tripletinėmis.

Žadinant, molekulės iš pagrindinės S_0 (singletinės) būsenos pereina į aukštesnes sužadintas singletines būsenas (žr. 4 pav.) atitinka būsenas S_1 ir S_2 .

Daugiatomių molekulių kiekvienas energetinis lygmuo turi daug virpesinių ir rotacinių polygmenų, dėl to sugerties juostos yra išplitusios. Juostų išplitimą taip pat sąlygoja tarpmolekulinė sąveika. Sužadintos molekulės nespinduliniu keliu pereina į to paties sužadinto elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį. Tai vadinama virpesine relaksacija. Nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Po vidinės konversijos molekulė atsiduria S_1 lygmens nuliniame polygmenyje. Iš žemiausio sužadinto energinio lygmens S_1 galimi trys vyksmai: vidinė konversija $S_1 \rightarrow S_0$, interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ (kai sužadinimas pereina į tripletinę būseną, kurioje šis sužadinimas gali gan ilgai išsilaikyti), ir fluorescencija – kai molekulė sugrįžta į pagrindinę S_0 būseną, išspinduliuodama šviesos kvantą. Šių perėjimų tikimybė priklauso nuo energijos skirtumo ΔE tarp S_1 ir S_0 lygmenų. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė.

Jau Stoksas 1852 suformulavo taisyklę, kuri teigė, kad liuminescencijos bangos ilgis yra didesnis nei kūno sugertos šviesos bangos ilgis. Dažniausiai liuminescencijos ir absorbcijos spektrinės juostos išsidėsto taip kaip pavaizduota 5 pav..



5pav. Jei žadiname šviesa kurios bangos ilgis yra absorbcijos juostos ribose tai fluorecencijos spektras liks nepakitęs.

Eksperimentiškai įrodyta, kad Stokso taisyklė galioja tik dalinai. Daugumos medžiagų absorbcijos ir liuminescencijos spektrai persikloja. Prieštaravimą tarp Stokso taisyklės ir daugelio eksperimentų pašalina Lomeris, suformuodamas bendresnę taisyklę. Joje teigiama, kad liuminescencijos intensyvumo maksimumas yra pasislinkęs absorbcijos maksimumo atžvilgiu į ilgų bangų pusę. Savo fizikiniu turiniu ji skiriasi nuo Stokso taisyklės, kurioje tvirtinama, kad molekulė negali emituoti didesnės energijos kvantų, absorbuodama mažesnius žadinančios šviesos kvantus.

Absorbcijos juosta yra gan plati, todėl mes galime įvairiai varijuoti sužadinančios šviesos bangos ilgiu, tik svarbu, kad žadinančios šviesos bangos ilgis būtų absorbcijos juostos viduje (5 pav.). Tokio pobūdžio bandymai parodė, kad fluorescencijos spektras nekinta tol, kol sužadinančios šviesos bangos ilgis guli absorbcijos juostoje.

VII. Liuminescencijos gesimas dėl koncentracijos

Mažose koncentracijose ($< 10^{-4}$ mol/l) švytėjimo intensyvumas didėja proporcingai absorbuojančių dalelių skaičiui. Po to, intensyvumas pasiekia maksimumą, o toliau, didinant koncentraciją, intensyvumas nekinta, o dar

padidinus – mažėja. Mažose koncentracijose absorbuotas šviesos intensyvumas auga proporcingai koncentracijai, tai vyksta tol, kol tam tikrame koncentracijų intervale tirpalas absorbuoja ne visą žadinančią šviesą. Toliau didinant koncentraciją, liuminescencija silpnėja. Liuminescencijos gesinimas taip pat priklauso ir nuo molekulių sandaros.

Koncentracinis gesinimas aiškinamas dviem procesais vykstančiais tirpale vienu metu: molekulių absorbcija ir neliuminescuojančių asociantų susidarymu ir energijos migracija nuo sužadintų monomerų nešvytintiems asociantams.

Tokio pobūdžio gesinimo procesai vyksta įvairių organinių junginių tirpaluose. Susidarant asociantams kvantinis našumas sumažėja, bet liuminescencijos spektro pati forma nepakinta.

Energijos perdavimo procesas bus tuo stipresnis, kuo labiau persiklos nešvytinčių asociantų spektrai su monomerinių molekulių liuminescencijos spektrais. Tai susiję su tuo, kad sužadinimo energijos perdavimo nuo molekulės (i) molekulei (j) tikimybė W_{ij} nusakoma taip:

$$W_{ij} = \frac{3hC^2\varepsilon(v')}{3\pi^3n^2N^2v^2R_{ij}}, \quad (6)$$

čia C – medžiagos koncentracija tirpale, n – lūžio rodiklis, N – Avogadro skaičius, v – elektroninio šuolio dažnis, R_{ij} – atstumas tarp i ir j molekulių, $\varepsilon(v')$ integralas, kuriame įskaityta sąveikaujančių molekulių absorbcijos ir liuminescencijos spektrų persiklojimas.

$$\varepsilon(v') = \frac{\int F(v)\varepsilon(v)dv}{\int F(v)dv}. \quad (7)$$

Čia $\varepsilon(v)$ – nefluorescuojančių asociantų spektras, $F(v)$ – išreikštas kvantų skaičiumi, monomerų fluorescencijos spektras.

VIII. Liuminescencijos gesinimas priemaišomis

Ši gesinimo rūšis pastebėta skystuose tirpaluose. Gesinančios medžiagos gerai oksiduojasi. Geriausias gesintojas yra jodo jonas, blogiausias – chloro jonas. Gesinimo stiprumas priklauso nuo tirpiklio fizikinių ir cheminių savybių.

Stipriausia sąveika tarp molekulių arba kitų švytėjimo centrų vyksta smūgio metu. Kadangi dujų molekulių ir atomų greičiai dideli, tai smūgių metu įvyksta stiprus molekulių centrų suartėjimas ir didėja sąveikos jėgos. Dvi dalelės susilieja ir gali įvykti sužadinimo energijos perdavimas iš sužadintosios molekulės į nesusądintą, t.y. gali įvykti pirmos molekulės švytėjimo gesimas. Energijos, patekusios į antrą dalelę, likimas gali būti įvairus. Jei antra dalelė nešvyti, tai bus gesimas, o jei švyti, tai toks švytėjimas sensibilizuotas.

Dažniausiai gesinimo metu cheminės reakcijos neįvyksta – negaunama naujų junginių, o susidaro nepastovūs kompleksai, kurie įvykus gesinimui, disocijuoja.

Bendriausia gesinimo schema:



Čia D^* - sužadinta fluorescuojanti molekulė, X – gesinanti molekulė, E – išlaisvinta energija.

Organinės medžiagos, žinomos kaip fluorescencijos gesintojai, paprastai yra stiprūs elektronų donoriai arba akceptorai.

IX. Energinis ir kvantinis našumai

Viena iš svarbiausių liuminescencijos charakteristikų yra našumas, parodantis sužadinimo šviesos virtimo emituojama šviesa efektyvumą. Energinis liuminescencijos našumas nusakomas emituotosios energijos E_L santykiu su absorbuotąja energija E_A :

$$\varphi_{en} = \frac{E_L}{E_A}. \quad (9)$$

Kvantiniu liuminescencijos našumu vadinamas medžiagos emituojamų kvantų N_L skaičiaus santykis su absorbuotųjų kvantų skaičium N_A :

$$\varphi_{kv} = \frac{N_L}{N_A}. \quad (10)$$

Šie našumai vienas su kitu susiję ryšiu:

$$\varphi_{en} = \frac{E_L}{E_A} = \frac{h\nu_L N_L}{h\nu_A N_A} = \varphi_{kv} \frac{\nu_L}{\nu_A}; \quad (11)$$

Čia ν_A ir ν_L - absorbuotosios ir emituotosios šviesos vidutiniai dažniai.

Paprastai $\nu_A > \nu_L$ ir $\varphi_{en} < \varphi_{kv}$.

Pagal kvantinio našumo apibrėžimą emituotų per sekundę kvantų skaičius N_L lygus absorbuotų per sekundę kvantų skaičiui N_A , padaugintam iš kvantinio našumo:

$$N_L = N_A \varphi = (I_0 - I) \varphi = I_0 (1 - e^{-\alpha c d}) \varphi. \quad (12)$$

Išskleidę eilute ir atmetę aukštesnės eilės narius, gauname:

$$N_L = I_0 \alpha c d \varphi. \quad (13)$$

Plotas po fluorescencijos kreive proporcingas emituotų kvantų skaičiui. Dviejų vienodo sluoksnio storio tirpalų tame pačiame tirpiklyje, esant vienodam geometriniam bandinio ir optinių dalių išdėstymui ir vienodiems sužadavimo šviesos

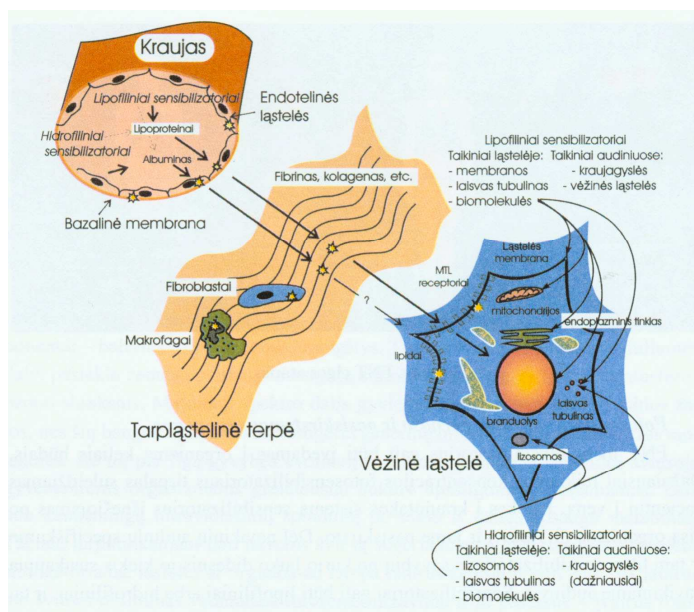
intensyvumams, fluorescencijos intensyvumų santykis lygus:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{I_0 \alpha_2 c_2 d \varphi_2}{I_0 \alpha_1 c_1 d \varphi_1} = \frac{\varphi_2 D_2}{\varphi_1 D_1} = \frac{N_2}{N_1}. \quad (14)$$

Bandinio emisijos spektras – tai fluorescencijos intensyvumo, išmatuoto kvantais vienetiniam dažnių intervalui, priklausomybė nuo dažnio arba bangų skaičiaus. Jeigu N_L yra bendras emituotų per laiko vienetą kvantų skaičius, tai $dN_L/d\nu$ - intensyvumas ties dažniu ν , o grafikas, išreiškiantis $dN_L/d\nu$ priklausomybę nuo ν , yra tikras ištaisytais fluorescencijos spektras. Praktikoje spektrai išreiškiami santykiniais, o ne absoliučiais vienetais.

X. Fotosensibilizuota navikų terapija

Gyvuose organizmuose vyksta įvairios fotocheminės reakcijos, kurios yra svarbios ar net esminės jų išgyvenimui. Tačiau šviesa gali būti ir pražūtinga gyvoms ląstelėms ir organizmams. Visos fotocheminės reakcijos prasideda specifiniams biologiniams pigmentams sugėrus šviesos fotonus (pirmasis fotochemijos dėsnis, kurį 1817 metais teoriškai suformulavo mūsų tėvynainis T. Grotus (T. Grotthuss), o 1843 metais eksperimentiškai pagrindė amerikietis Dž. Dreiperis (D. Draper).



6 pav. Sensibilizatorių pernaša, kaupimasis bei galimi taikiniai audiniuose ir ląstelėse.

Ultravioletinė saulės spinduliuotės dalis yra labai pavojinga gyviems organizmams, nes šios spektrinės srities šviesą labai gerai sugeria svarbiausi ląstelių komponentai - baltymai, lipidai ir nukleorūgštys, bet tik neženkli šios spinduliuotės dalis pasiekia žemės paviršių, kadangi ją sulaiko atmosfera, o ypač - stratosferos ozono sluoksnis. Matomoji spektro dalis gyviems organizmams nedaro jokios žalos, nes šių bangos ilgių šviesos nesugeria genetinę informaciją perduodančios molekulės. Be to, per ilgą gyvybės evoliucijos periodą gamta nuolat saulės šviesoje gyvenantiems organizmams sukūrė apsauginius mechanizmus. Odą nuo kenksmingų ultravioletinių spindulių poveikio iš dalies apsaugo melaninas. Tačiau, tarpininkaujant tam tikroms šviesą sugeriančioms medžiagoms - fotosensibilizatoriams, ląstelės ar organizmai tampa jautrūs šviesai ir gali žūti. Šis jautrumo šviesai didinimas vadinamas

fotosensibilizavimu ir jo pasekmė - įvairūs foto-fizikiniai, fotocheminiai ir fotobiologiniai vyksmai šviesos nesugeriančiame substrate.

Fotosensibilizuota navikų terapija (FNT) pagrįsta kai kurių fotosensibilizatorių savybe kauptis navikiniuose audiniuose ir, apšvitinus juos tinkamo bangos ilgio šviesa, sukelti šių audinių ląstelių pažaidas. FNT eiga apima kelis etapus: sensibilizatorius suleidžiamas į organizmą, po kelių ar keliolikos valandų (nelygu sensibilizatoriaus prigimtis) navikas apšvitinamas šviesa, kurią gerai sugeria fotosensibilizatoriaus molekulės, o praėjus dar kuriam laikui atliekama kontrolė ir pašalinami nekrotizavę audiniai. Šviesos sužadintas sensibilizatorius inicijuoja fotochemines reakcijas, kurių pasekmė - žalingų ląstelių veiklai produktų susidarymas ir navikinių audinių destrukcija.. Tačiau kad gydymas būtų sėkmingas, nuo sensibilizatoriaus suleidimo iki navikinio audinio nekrozės turi įvykti visa fiziologinių, biocheminių, fotofizikinių ir fotocheminių vyksmų seka.

Fotosensibilizatoriaus pernaša ir pasiskirstymas organizme

FNT metu sensibilizatorius gali būti įvedamas į organizmą keliais būdais. Dažniausiai reikiamos koncentracijos fotosensibilizatoriaus tirpalas suleidžiamas pacientui į veną. Patekęs į kraujotakos sistemą sensibilizatorius išnešiojamas po visą organizmą (6 pav.) ir jame pasiskirsto. Dėl navikinių audinių specifiškumo ir tam tikrų sensibilizatoriaus savybių po kurio laiko didesnis jo kiekis susikaupia navikiniame audinyje. Sensibilizatoriai gali būti lipofiliniai arba hidrofiliniai, ir tai lemia jų lokalizaciją audiniuose ir ląstelėse (6 pav.). FNT taikiniai būna labai įvairūs - parenkant tinkamų savybių sensibilizatorius galima sukelti pažaidas įvairiose ląstelių organelėse.

Fotosensibilizatoriaus susikaupimas/išsilaikymas navike

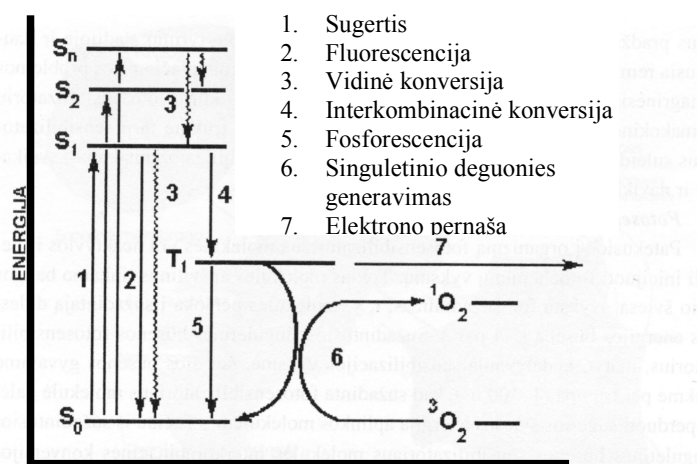
Selektyvus sensibilizatoriaus susikaupimas navikiniame audinyje yra vienas iš pagrindinių veiksnių, sąlygojančių naviko suardymą minimaliai pažeidžiant sveikus audinius. Todėl šis gydymo metodas kelia vis didėjantį susidomėjimą. Tiek chirurginis, tiek chemoterapinis bei spindulinis navikinių

susirgimų gydymo metodai nėra pakankamai selektyvūs, dažnai pašalinamas ar sunaikinamas ne visas navikas ir tik iš dalies pristabdomas navikinių darinių formavimasis. Dėl to kai kuriais atvejais atsiranda antrinių navikų - recidyvų. Be to, spindulinis gydymo metodas visada susijęs su rizika pažeisti sveikus audinius ar inicijuoti kitokį organizmui žalingą poveikį. Cheminių preparatų poveikis irgi labai priklauso nuo atskiro individo, organizme vykstančių metabolinių procesų, todėl ne visada pasiseka parinkti tinkamas priešnavikinių vaistų dozes ir pasiekti teigiamą jų poveikį. Selektyvus fotosensibilizatorių kaupimasis navikiniuose audiniuose, pastebėtas XX amžiaus pradžioje, vis dar yra nedaug į priekį pažengusioje tyrimų stadijoje ir daugiausia remiasi empiriniais stebėjimais.

Fotosensibilizatoriaus fotosužadinimas

Patekusios į organizmą fotosensibilizatoriaus molekulės yra neaktyvios ir negali inicijuoti fotocheminių vyksmų. Tokias molekules apšvitinus tinkamo bangos ilgio šviesa, įvyksta fotosužadinimas, t. y. molekulės peršoka į sužadintąją didesnės energijos būseną (7 pav.). Sužadintosios singuletinės būsenos fotosensibilizatorius, matyt, nedalyvauja sensibilizacijos vyksme, nes šios būsenos gyvavimo trukmė per trumpa (1-100 ns), kad sužadinta fotosensibilizatoriaus

molekulė galėtų perduoti sugertos šviesos energiją aplinkos molekulėms. Tačiau iš sužadintosios singuletinės būsenos sensibilizatoriaus molekulės interkombinacinės konversijos keliu gali peršokti į tripletinę būseną, kurios gyvavimo trukmė yra



7 pav. Jablonskio diagrama, parodanti elektroninius šuolius sužadintoje fotosensibilizatoriaus molekulėje

ilgesnė (net iki kelių milisekundžių). Šioje būsenoje sensibilizatorius jau gali inicijuoti fotocheminius procesus, sukeliančius vėlesnę ląstelės žūtį.

Sensibilizatoriaus molekulės sugebėjimas peršokti į tripletinę būseną yra apibrėžiamas tripleto susidarymo kvantiniu našumu, kuris efektyviam sensibilizatoriui turėtų būti artimas vienetui.

Sužadinimo energijos pernaša biomolekulėms, chemiškai aktyvių tarpinių darinių generavimas

Sąveikaujant sužadintam sensibilizatoriui su audinio biomolekulėmis, galimi du pagrindiniai reakcijų tipai. Pirmojo tipo reakcijose sensibilizatorius tiesiogiai sąveikauja su biomolekule. Tos sąveikos metu vyksta elektrono arba vandenilio atomo pernaša ir susidaro laisvieji radikalai. Antrojo tipo reakcijose sužadintosios tripletinės būsenos sensibilizatorius sąveikauja su audinių molekulinio deguonimi, perduodamas jam sužadinimo energiją.

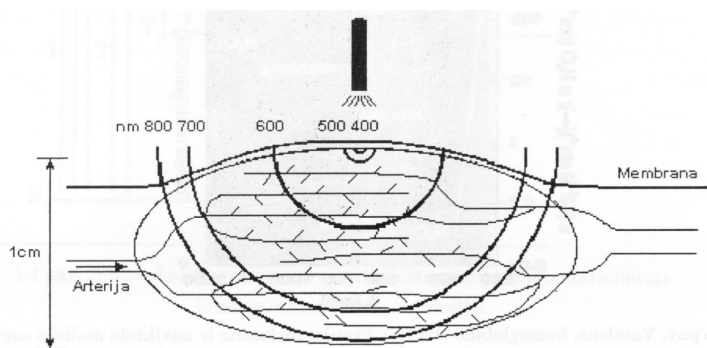
Dėl sužadinimo energijos pernašos susidarę laisvieji radikalai yra labai aktyvūs ir inicijuoja biomolekulių oksidacijos reakcijas, sukeliančias vėlesnę ląstelių žūtį. Sužadinta deguonies molekulė taip pat yra chemiškai labai aktyvi, oksiduoja biomolekules ir, sutrikdydama ląstelių metabolizmą, sukelia ląstelių žūtį. Daugelis fotosensibilizatorių gali generuoti tiek laisvuosius radikalus, tiek ir aktyvias deguonies formas. Tačiau į klausimą, kas vis dėlto sukelia ląstelės žūtį dar neatsakyta. Vyrauja nuomonė, kad porfirinų fototoksinis poveikis biomolekulėms FNT metu yra sąlygotas aktyvių deguonies formų, generuojamų fotosensibilizacijos metu.

Šviesos įsiskverbimo gylis biologiniame audinyje

Šviesą sugeria ne tik fotosensibilizatorius, bet ir pats švitinamas audinys. Audinio sugertį nulemia šviesą sugeriančios medžiagos (vanduo, pigmentai, hemoglobinas, baltymai, lipidai ir t. t.). Daugelis organinių molekulių ir vanduo smarkiai sugeria šviesą ultravioletinėje (UV) spektro srityje. Nukleorūgštys ir baltymai turi intensyvią sugerties juostą 240-290 nm intervalu, o

infraraudonuosius spindulius gerai sugeria vanduo. Vadinasi būtina ieškoti tokios spektro srities, kurioje audinys sugertų mažiausiai šviesos, o fotosensibilizatorius toje spektro srityje turėtų intensyvią sugerties juostą. Tuomet padidėja galimybė toje spektro srityje sužadinti daugiau sensibilizatoriaus molekulių, drauge paveikti gilesnius navikinio audinio sluoksnius ir padidinti FNT efektyvumą. 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) įsiskverbia į audinius dvigubai giliau. Dar ilgesnių bangų skvarbumo gylis padidėja tik 10% (8 pav.).

Taigi audinys silpniausiai sugeria šviesą 650-1000 nm spektro srityje. Ši sritis vadinama „fototerapiniu langu“, nes tokių bangos ilgių šviesa į audinius prasiskverbia giliausiai (audinys yra skaidriausias šviesai)..



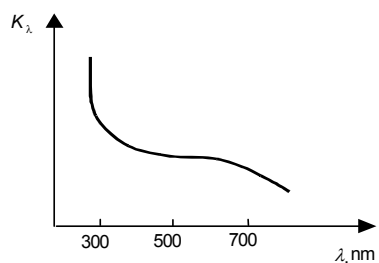
8 pav. Įvairių bangos ilgių šviesos prasiskverbimo į audinį gylis

Taigi labai svarbu, kad fotosensibilizatoriai turėtų stiprią šviesos sugertį audinių optinio laidumo srityje ($\lambda > 600$ nm). Tačiau pageidautina, kad jie neturėtų intensyvių sugerties juostų regimosios šviesos intervalu nuo 350 iki 600 nm, nes tuomet liekamasis odos jautrumas šviesai būtų mažesnis .

Kai kurių biologinių objektų sugerties spektrai

Su šviesos sugertimi yra susiję daugelis biologinių procesų, iš jų ir *fotosintezė* – neorganinių medžiagų (vandens ir anglies dvideginio) vartimas organinėmis (angliavandeniais). Fotosintezė vyksta veikiant Saulės šviesai, kurią sugeria turintys chlorofilo augalų audiniai. Fotosintezės reakcijos schema yra tokia:



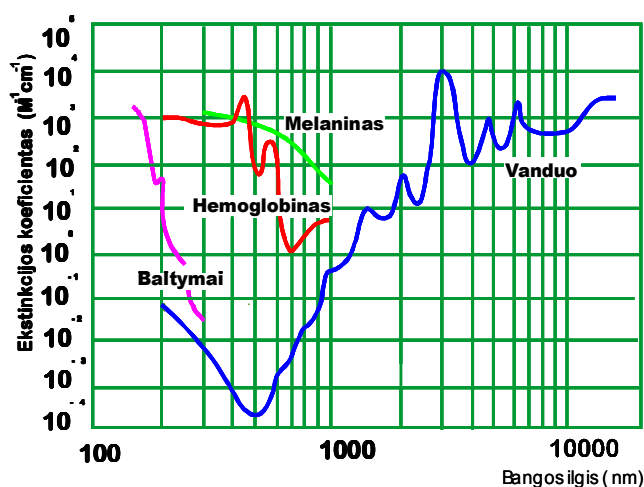


9 pav. Žmogaus odos sugerties spektras

Ypač intensyviai fotosintezė vyksta, veikiant raudoniesiems spinduliams ($\lambda \approx 0,68 \mu\text{m}$). Apskaičiuota, kad Žemės augalai fotosintezės būdu per metus pagamina apie 450 mlrd. tonų organinių medžiagų ir apie 500 mlrd. tonų deguonies.

Taigi augmenija yra ne tik žmogaus ir gyvulių maisto bei kuro šaltinis, bet ir savotiškas oro grynintojas: fotosintezės metu iš atmosferos oro augalai sugeria anglies dvideginį ir praturtina jį deguonimi.

Žmogaus odos sugerties spektras parodytas 9 paveiksle. Ultravioletinėje dalyje sugerties koeficientas didelis, ir oda sugeria spinduliuotę savo viršutiniais sluoksniais. Regimosios šviesos dalyje sugerties koeficientas mažesnis ir beveik pastovus iki raudonosios spektro dalies.



10 pav. Kai kurių biologinių objektų sugerties spektrai

Kelių paprasčiausių biologinių objektų molinio ekstinkcijos koeficiento priklausomybė nuo bangos ilgio pavaizduota 10 paveiksle. Dauguma organinių molekulių stipriai sugeria šviesą ultravioletinėje spektro dalyje. Baltymai, sudarantys 15–20% visų ląstelių, dažniausiai sugeria šviesą (elektromagnetinę

energiją) taip pat šioje srityje, paprastai jų sugerties smailė būna ties 280 nm aplinka. Hemoglobinei sugertis vyksta regimojo spektro dalyje (turi dvi smailes žaliojoje ir geltonojoje spektro dalyse). Baziniame odos pigmente – melanine sugertis vyksta ties regimajame spektro dalimi, bet labiau yra pasislinkusi į UV sritį.

XI. Fluoroforų prigimtis

Fluoroforai – tai natūralūs arba įvesti iš išorės fluorescuojantys audinio komponentai. Fluoroforai pagal savo pobūdį skirstomi į tokią grupę:

- **Endogeniniai fluoroforai**

Endogeniniai fluoroforai atsakingi už natūralaus audinio savąją fluorescenciją. Iš jų galima paminėti sekančius:

a) Baltymai. Triptofanas - labai intensyviai fluorescuojanti aminorūgštis baltymuose. Apie 90% visos baltymų fluorescencijos priklauso triptofano liekanoms. Be to, šis endogeninis fluoroforas labai jautrus aplinkos poliškumui. Baltymai sugeria šviesą apie 280nm, o jų fluorescencijos spektrų smailės yra 320 – 350nm ruože.

b) Nukleininės rūgštys. Nukleotidai ir nukleininės rūgštys dažniausiai nefluorescuoja. Bet yra ir išimčių, tRNA^{phe} iš mielių turi intensyviai fluorescuojanti pagrindą, visiems žinoma kaip Y-pagrindas, kuris turi fluorescencijos smailę arti 470nm, o gyvavimo trukmė ~6 ns.

c) Kofaktoriai. Fermentai - baltyminės medžiagos, pagreitinančios chemines reakcijas. Yra fermentų, kurių veikimui reikalingas ne tik baltymas, bet ir nebaltyminė dalis - kofaktorius. Kofaktoriai skirstomi į:

- kofermentus

- prostetinę grupę

d) Riboflavinai ir FAD. Riboflavinai, FMN (flavinmononukleotidas) ir FAD (flavinadenindenukleotidas) sugeria šviesą matomoje srityje (~450nm) ir

fluorescuoja apie 515nm. Gyvavimo trukmės FMN ir FAD atitinkamai yra 4.7 ir 2.3ns. Kaip ir NADH, flavino fluorescencija yra gesinama adenino. Flavoproteinai dažniausiai nefluorescuoja, bet yra ir išimčių.

- Audinyje susintetinti fluoroforai

Dažniausiai atsiranda po išorinio pirmtakės molekulės įvedimo t.y 5-amino levulininės rūgšties (ALA) įvedimas į organizmą pagamina protoporfiriną IX (PpIX). Tiek ALA, tiek PpIX yra natūralūs žmogaus organizmo kraujo hemo biosintezės tarpiniai produktai.

- Egzogeniniai fluoroforai ir biomarkeriai

Dažnai iš endogeninių fluoroforų gautos informacijos nepakanka todėl į organizmą tenka įvedinėti egzogeninius fluoroforus bei fotosensibilizatorius. Pastarieji nors ir yra pašaliniai, bet turi tinkamas specialiams taikymams spektrines savybes. Trumpai paminėsiu kai kuriuos iš jų:

a) Fluoresceino ir rodamino izocianatai ir izotiacianatai. Šiuos dažus plačiai naudoja baltymams žymėti. Imunoglobulinai pažymėti fluoresceinu – komerciniai reaktyvai; juos dažnai naudoja fluorescencinėje mikroskopijoje. Būtent šiais medžiagas parenka dėl to, kad jos turi didelį kvantinį našumą ir yra fotochemiškai stabilus. Be to dėl didelių fluorescencijos ir sugerties bangos ilgių, stebima mažesnė foninė fluorescencija, todėl nereikia naudoti kvarcinę optiką. Izocianatinė ir izotiacianatinė grupės dažniausiai būna arba meto-, arba para- padėtyje karboksi-grupės atžvilgiu. Komerciniai žymėtieji reagentai – izomerų mišinys. Šie dažikliai visų pirmą reaguoja su cisteinine baltymų vieta. Dažiklių fluorescencijos gyvavimo trukmės yra apie 4ns, ir jų fluorescencijos spektrai yra mažiau jautrūs tirpiklio poliškumui.

b) Dansilchloridas. Dansilchloridą (DNS- C.1) plačiai naudoja baltymams žymėti ypač tada, kai vyksta poliarizacijos matavimai. Ši medžiaga jau seniai yra žinoma ir turi palyginti ilgą fluorescencijos gyvavimo trukmę (~10ns).

Dansilininės grupės fluorescencijos spektrui didelę įtaką daro tirpiklio poliškumas.

c) Naftilaminosulfoninės rūgštys. 1-Anilino-8-naftalinsulfoninė rūgštis (1,8-ANS arba TNS), 2-n-toluidinilnaftalin-6-sulfoninė rūgštis (2,6-TNS arba TNS) ir jų dariniai dažnai naudojami kaip nekovalentiškai sujungti zondai baltymams ir membranoms. Šie zondai beveik nefluorescuoja vandenyje, bet intensyviai fluorescuoja kai yra ištirpinti nepoliniuose tirpikliuose, arba kai yra sujungti su makromolekulėmis.

d) Hidrofobiniai membraniniai zondai. Lipidai dažniausiai nefluorescuoja. Membranas dažniausiai žymi tokiais zondais kaip perilenas, 9-vinilantracenas ir 1,6-difenilheksatrienas (DPH). Šie zondai netirpsta vandenyje ir susijungia į hidrofobines membranų grandinėles. Nepakeisti daugiabranduoliniai aromatiniai angliavandeniai ir DPH mažai jautrūs tirpiklio poliškumui. Jų pagalba įvertina vidinį dvigubų sluoksnių klampumą, pagal fluorescencijos poliarizuotumo pokyčius.

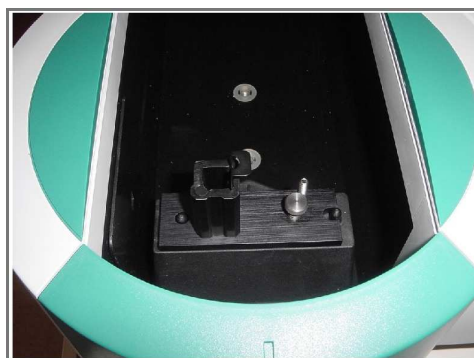
e) Nukleininės rūgštys. Įvedant etileninį tiltelį ATP ir jo darinių fluorescencija tampa žymiai intensyvesnė. Tokie dariniai kaip ϵ -ATP jautrūs tirpiklio klampumui, turi didelę ribinę fluorescencinę poliarizaciją ir jų fluorescencijos gyvavimo trukmė yra apie 23ns. Nukleotidiniai analogai aktyvūs daugelyje reakcijų, kurios yra katalizuojamos fermentais. Šie analogai fluorescuoja ir sugeba sudaryti nemodifikuotų nukleotidų vandenilines jungtis.

4. Praktinės užduotys.

1. Mėlynai 460 nm šviesai sklindant sugerencia terpe jos intensyvumas sumažėja du kartus koks šios terpės pralaidumas ir optinis tankis.
2. Kuo skiriasi sugerties spektras nuo fluorescencijos spektro?
3. Kuo skiriasi sugerties spektras nuo žadinimo spektro?
4. Kiek kartų sumažės praėjusios šviesos intensyvumas, du kartus padidinus šviesos sklidimo kelią.
5. Kokiomis ir kodėl savybėmis pasižymi „geras“ fotosensibilizatorius
 - a. trumpa tripletinės būsenos gyvavimo trukmė;
 - b. ilga tripletinės būsenos gyvavimo trukmė;
 - c. pirmos sužadintos būsenos energetinis lygmuo yra aukščiau tripletinės būsenos energijos lygmens;
 - d. pirmos sužadintos būsenos energetinis lygmuo yra žemesnis tripletinės būsenos energijos lygmens;
 - e. aukštas kvantinis našumas;
 - f. didelė kaina;
 - g. toksiškas;

5. Aparatūra ir darbo metodika.

Tiriamų bandinių sugerties ir fluorescencijos spektrai registruojami Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometru 11 pav. ir Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometru 12 pav..



11 pav Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometras



12 pav Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometru.

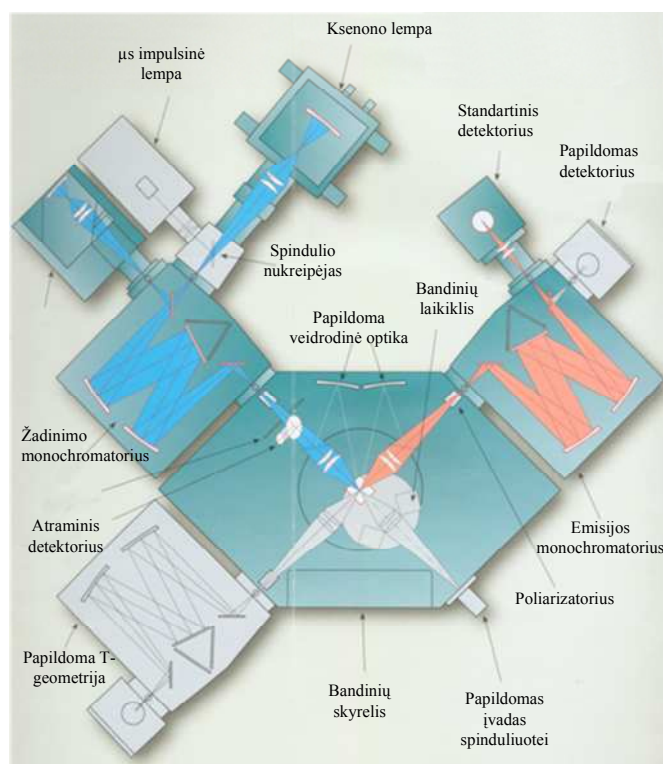
Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometro ir Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometro naudojimo instrukcija pateikta 1 priede.

Kaip priklauso fotosensibilizatorių fluorescencijos intensyvumas nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio galima ištirti matuojant fotosensibilizatorių žadinimo spektrus. Žadinimo spektrų matavimai atliekami su Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometru. Žadinimo spektrų matavimo instrukcijos, Cary Eclipse Fluorescencijos spektrofotometru, pateikta 1 priede.

Singletinio deguonies fluorescencijos spektrai matuojami FS920 fluorescencijos spektrofotometru 13 pav. FS920 fluorescencijos spektrofotometras yra plačiausių galimybių spektrų registravimo įrenginys.

FS920 fluorescencijos spektrofotometras susideda iš kelių modulių (dalių): dvejų monochromatorių, šviesos šaltinio, bandinių skyriaus, detektoriaus.

Pirmoji visų spektrometrų dalis yra šviesos šaltinis. Čia puikiai tinka ksenono lempa, kuri gali būti naudojama tiek UV, tiek VIS, tiek ir NIR srityje. Neginčijamas lempų privalumas – galimybė pasirinkti žadinimo bangos ilgį iš plataus jų emituojamo spektro. Visiems plataus spektro šviesos šaltiniams reikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Taigi visos lempos yra jungiamos taip, kad įvairių optinių sistemų pagalba (lęšiai, veidrodžiai ir pan.) jų spinduliuotės būtų suvedamos į kitą modulį – monochromatorių.



13 pav. FS920 fluorescencijos spektrofotometras

Pagrindinė monochromatoriaus dalis, kuria šviesa yra išskaidoma į spektrą, yra difrakcinė gardelė, o pagrindinės monochromatorių apibūdinančios charakteristikos yra dispersija (arba išbarstymas), pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis. FS920 spektrometre monochromatorius yra kaip atskiras prietaisas, todėl šiuos reikalavimus galima išpildyti geriausiai. Dispersiją, arba kaip stipriai bus išskirtos šviesos spalvos, nulemia tiek pati gardelė, tiek monochromatoriaus matmenys. Kadangi tai yra atskiras modulis, jis gali būti daromas tiek mažas, tiek ir didelis. Pralaidumas yra nevienodas kiekvienam bangos ilgiui, tai vėlgi nulemia, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuoti difrakcinės gardelės režiai. Taigi dirbant skirtingose spektrinėse srityse (UV, VIS, NIR, IR) reikėtų prietaiso su keliomis skirtingomis gardelėmis. Mūsų aptariamame prietaise monochromatoriuje galima įmontuoti tris skirtingas gardeles ir vėliau pasirinkti tinkamą pagal spektrinę sritį, kurioje numatome dirbti. Tokiu būdu yra išlaikomas aukštas monochromatoriaus pralaidumas plačiame spektriniame ruože. Paskutinis parametras, kurio apibūdinamas monochromatorius yra šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų. Norint sumažinti pašalinės šviesos kiekį reiktų išskirtą tam tikros spalvos spinduliuotę dar kartą praleisti pro monochromatorių. Moduliniame spektrometre ir tai gali būti padaryta sujungiant du atskirus monochromatorius. Be abejo, monochromatoriai turi įėjimo bei išėjimo plyšius, kurių pločiai gali būti keičiami.

Sekanti modulinio spektrometro dalis – bandinių skyrius. Bandinių skyriuje be bandinių laikiklio yra ir kai kurie optiniai komponentai. Bandinių skyriuje yra poliarizuojama spinduliuotė, jei yra atliekami poliarizaciniai matavimai, bei intensyvumo reguliatorius, kuriuo galima keisti į audinį krentančios žadinančiosios spinduliuotės intensyvumą. Bandinio skyriuje taip pat yra įmontuotas spinduliuotės intensyvumo detektorius, kuris registruoja bet kokius žadinančiosios spinduliuotės svyravimus ir atitinkamai yra modifikuojamas fluorescencijos spektras.

Surinktas fluorescencijos signalas toliau tęsia savo kelionę į detektorių. Emisijos atšaka yra labai panaši į žadinimo atšaką: taipogi yra poliarizatorius, kuris šioje atšakoje yra vadinamas analizatoriumi, viengubas arba dvigubas monochromatorius ir detektoriai. Monochromatoriuose yra įmontuotos kitokios difrakcinės gardelės nei žadinimo atšakoje, nes fluorescencija vyksta kitoje spektrinėje srityje nei žadinimo spinduliuotė. Detektorių skaičių vėlgi apsprendžia tai, kokioje spektrinėje srityje ir kokio tipo yra atliekamas tyrimas. Bendrai galima išskirti tris detektorius – vienas UV – VIS sričiai, Kitas NIR ir IR sričiai, ir trečias, labai greitas – fluorescencijai su laikine skiriamąja geba.

FS920 fluorescencijos spektrofotometro naudojimo instrukcija pateikta 3 priede.

Sužadintas deguonis pereidamas iš sužadintos būsenos į pagrindinę išspinduliuos N fotonų visomis sferos kryptimis vienodai (Lomelio dėsnis). Todėl, registruodami fluorescencijos signalą tam tikra pastovia kampine apertūra, galima užrašyti:

$$N = a \int \frac{I(\nu) d\nu}{h\nu}, \quad (15)$$

čia a yra proporcingumo koeficientas

$$F(\nu) = \frac{I}{h\nu}, \quad (16)$$

mūsų užregistruotas singletinio deguonies fluorescencijos spektras.

$$N = a \int F(\nu) d\nu. \quad (17)$$

Kaip matome iš 17 formulės plotas po fluorescencijos kreivę proporcingas emituotų kvantų skaičiui.

Išfluoresuotų kvantų skaičius tiesiogiai proporcingas sužadinančios spinduliuotės intensyvumui, koncentracijai, bandinio storiui ir kvantiniui našumui

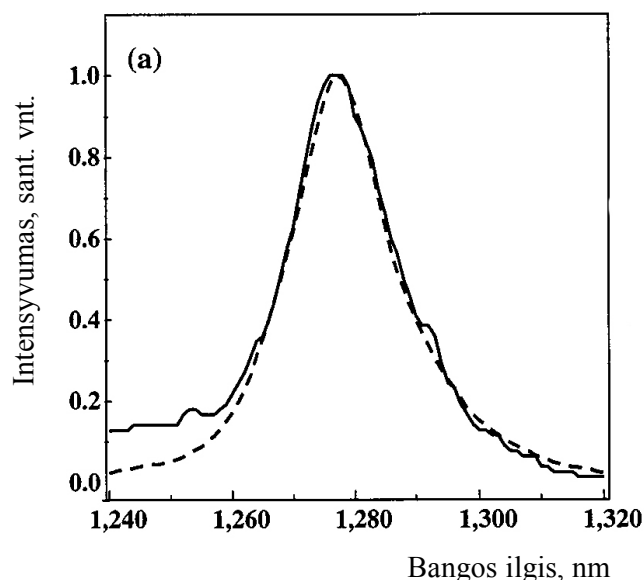
$$N = I_0 \alpha_1 c d \varphi. \quad (18)$$

Dviejų vienodo sluoksnio storio tirpalų tame pačiame tirpiklyje, esant vienodam geometriniam bandinio ir optinių dalių išdėstymui ir vienodiems sužadinimo šviesos

intensyvumams, bet skirtingoms tirpalų koncentracijoms suminis fluorescencijos intensyvumų santykis lygus:

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{a \int F_1(\nu) d\nu}{a \int F_2(\nu) d\nu} = \frac{I_0 a_1 c_1 d\phi}{I_0 a_1 c_2 d\phi}, \quad (19)$$

$$\frac{\int F_1(\nu) d\nu}{\int F_2(\nu) d\nu} = \frac{c_1}{c_2}, \quad (20)$$



14 pav. Singletinio deguonies fluorescencijos spektras

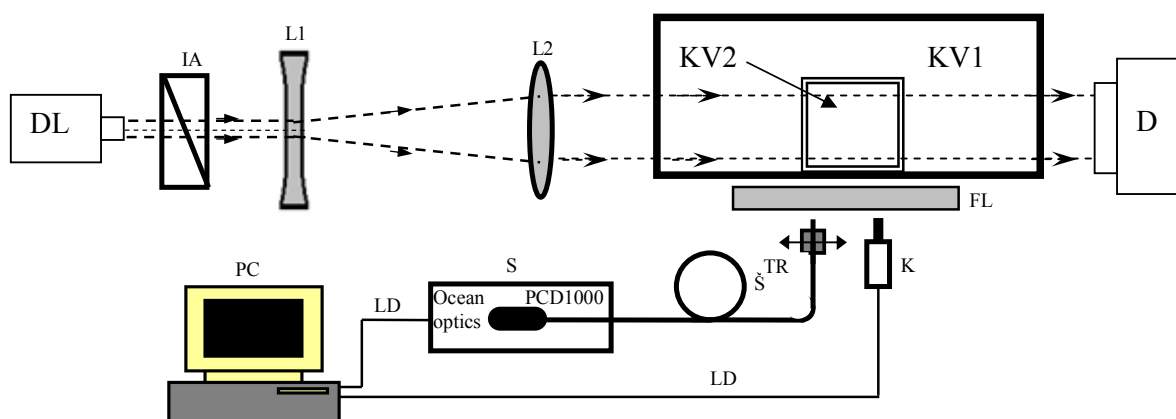
Fotosensibilizatorių fluorescencijos erdviniam pasiskirstymui modelinėse biologinėse sistemose matavimo standas pavaizduotas 15 pav.

Fluorescencijos erdviniam pasiskirstymui matuoti naudojamas 200 mW., 635 nm., bangos ilgio puslaidininkinis lazeris. Šio puslaidininkinio lazerio išspinduliuotos šviesos pluošto diametras yra apie 3-5 mm, todėl norėdami apšviesti didesni nei 0,2 cm² plotą turime išplėsti šio lazerio emituojama šviesą,

tam mūsų sistemoje panaudojama sklaidomo ir glaudžiamo lęšio sistema (15 pav. L1, L2). Keisdami atstumą tarp lęšių L1 ir L2 galima pasirinkti mums reikalingą žadinančios šviesos apšviečiamą plotą.

Keisdami lazerio emituojamos šviesos pluošto diametrą keisime ir žadinančios šviesos intensyvumą į ploto vienetą. Šviesos intensyvumas į ploto vienetą apskaičiuojamas:

$$I = \frac{P}{S} = \frac{P}{\pi r^2} = \frac{4P}{\pi d^2} \cdot (21)$$



15 pav. fluorescencijos spektrų bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymo modelinėje sistemoje matavimų

S –spektrofotometras; PC – personalinis kompiuteris; Š –šviesolaidis;; K – CCD kamera; TR – transliacinis stalielis, FL – atkirtimo filtras, KV1 – 5 cm kiuvetė su sklaidančia terpe, KV2 – 1 cm kiuvetė su sensibilizatoriaus tirpalu, DL – diodinis lazeris, L1 – sklaidomasis lęšis, L2 – glaudžiamasis lęšis, IA – intensyvumo atenuatorius, D – energijos matuoklis

Žadinančios spinduliuotės ir fluorescencijos intensyvumai registruojami CCD kamara (15 pav. K). Kadangi fluorescencija spektras yra pasislinkusi į ilgesnių bangų sritį (žadinančios spinduliuotės spektro atžvilgiu) fluorescencija galima išskirti naudojant šviesos filtras. Filtras parenkamas taip, kad filtro pralaidumo sritis sutaptu su sensibilizatoriaus fluorescencijos spektru, bet jis nepasizemētu laidumu toje srityje kurioje mes žadiname fotosensibilizatorių.

Modelinė sistema (15 pav. KV1, KV2) susideda iš 1 cm kiuvetės įdėtos į kitą 5cm kiuvetę. Į 1 cm kiuvetę pilama sensibilizatoriaus tirpalas, o į 5 cm kiuvetę pilama sklaidanti terpė. Sklaidančios terpės gamybai, naudojamas pienas. Sklaidančia terpe išsklaidytos šviesos kiekis priklauso nuo pieno koncentracijos. Norint gauti įvairias sklaidančias terpes, pienas skiedžiamas vandeniu.

Fluorescencijos spektrai bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas registruojami ties priekine kiuvetės sienele. Fluorescencijos spektrai ties priekine kiuvetės sienele matuoti su šviesolaidiniu firmos “OCEAN OPTICS” fluorimetru. Fluorescencijos erdvinis pasiskirstymas matuotas “Leica DSC290“ CCD kamera. Firmos “OCEAN OPTICS” fluorimetro naudojimo instrukcija pateikta 2 priede.

Išsklaidytos žadinančios spinduliuotės kiekį galima keisti keliais būdais:

1. Didinant sklaidančios terpės koncentraciją (tik reikia nepamiršti, kintant sklaidančios terpės koncentracijai kinta ir sklaidos gesimo koeficientas)
2. Stumdant 1 kiuvetę, ko pasakoje keičiasi atstumas kuri turi nueiti žadinanti spinduliuotė iki sensibilizatoriaus

Sklaidos gesinimo koeficientui įvertinti naudosime Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometras. Sklaidos gesinimo koeficientą apskaičiuosime naudodami Lamberto-Bugerio dėsnį:

$$I = I_0 \exp\left(-L\left(\sigma(\lambda)n + \varepsilon^R(\lambda) + \varepsilon^M(\lambda)\right)\right); \quad (22)$$

$\sigma(\lambda)$ - sugerties pagavos skerspjūvis. Kadangi pienas visą šviesą išsklaido tai šis pagavos skerspjūvis lygus 0.

$\varepsilon^M(\lambda)$ - Mi sklaidos gesinimo koeficientas. Ši sklaida vyks jei sklaidančios dalelės yra didelės (arba labai mažos $<0.01 \lambda$).

$\varepsilon^R(\lambda)$ - Relėjaus gesinimo koeficientas

Modifikuotas Lamberto-Bugerio dėsnis sklaidos gesinimo koeficientui nustatyti:

$$I = I_0 \exp\left(-L\left(\varepsilon^R(\lambda)\right)\right), \quad (23)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -L\left(\varepsilon^R(\lambda)\right), \quad (24)$$

Dydis $\ln(I/I_0)$ išmatuojamas Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometru.

6. Darbo eiga.

Fotosensibilizatorių sugerties ir fluorescencijos spektrų matavimai

1. Išmatuoti hemato porfirino ir rodamino sugerties spektrus. Matuojant sugertį, fotosensibilizatorių koncentracija parenkama taip, kad sugertis ties visais bangos ilgiais neviršytu 1 optinio tankio. Gautus duomenis sunormuoti ir pavaizduoti grafiškai.
2. Išmatuoti Hemato porfirino ir rodamino fluorescencijos spektrus. Matavimas naudojama tų pačių koncentracijų fotosensibilizatoriai kaip ir sugerties matavimuose. Gautus duomenis sunormuoti ir pavaizduojami grafiškai.
3. Sugerties ir fluorescencijos spektrus pavaizduoti viename grafike ir patikrinti Stokso taisyklę.

Fotosensibilizatorių fluorescencijos žadinimo spektrų matavimai

1. Grafiškai atvaizduotose fotosensibilizatorių fluorescencijos spektruose surasti prie kurio bangos ilgio fotosensibilizatorių fluorescencija didžiausia. Šis bangos ilgis bus reikalingas matuojant fotosensibilizatorių žadinimo spektrus
2. Cary Eclipse Fluorescence spektrofotometro nustatymuose parinkti taip, kad jis registruotu fluorescenciją tik ties tuo bangos ilgiu kuris nustatytas 1 punkte.e.

3. Keičiantis žadinančios šviesos bangos ilgiui užregistruoti fluorescencijos intensyvumo kitimą. Grafiškai atvaizduoti fotosensibilizatorių fluorescencijos intensyvumo kitimą prie pasirinkto bangos ilgio nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio (tai ir bus fotosensibilizatoriaus fluorescencijos žadinimo spektras). Nustatyti, ties kuriais žadinančios spinduliuotės bangos ilgiais, fluorescencija intensyviausia.
4. Vienaame grafike, atvaizduoti fotosensibilizatorių sugerties ir žadinimo spektrus ir juos palyginti.

Singletinio deguonies fluorescencijos matavimai

1. Singletinio deguonies matavimuose naudoti tas pačias hemato porfirino ir rodamino koncentracijas kaip ir sugerties matavimuose.
2. Nustatyti FS920 fluorescencijos spektrofotometro monochromatorių taip, kad žadinančios bangos ilgis būtų lygus tam bangos ilgiui prie kurios sensibilizatorius pasižymi didžiausia sugertimi.
3. FS920 fluorescencijos spektrofotometro nustatymuose pasirenkame tokią fluorescencijos registravimo spektrinę sritinį, kad atitiktų singletinio deguonies fluorescenciją (14 pav.).
4. Užregistuoti fotochemiškai sugeneruoto singletinio deguonies fluorescencijos spektrą ir paliginti jį su nurodytu singletinio deguonies fluorescencijos spektru (14 pav.). Matavimai atliekami su visais fotosensibilizatoriais.
5. Užregistuoti fotochemiškai sugeneruoto singletinio deguonies fluorescencijos spektrus, monochromatoriumi keičiant žadinančios spinduliuotės bangos ilgį. Matavimai atliekami nuo 400 nm iki 650 nm. ne rečiau kaip kas 10 nm. Matavimai atliekami su visais sensibilizatoriais.

Fotosensibilizatoriaus fluorescencijos pasiskirstymas

1. Pagaminti $2 \cdot 10^{-4}$ ir $2 \cdot 10^{-5}$ rodamino bei $5 \cdot 10^{-5}$ ir $5 \cdot 10^{-6}$ hemato porfirino tirpalus.
2. Į 1 cm kiuvetę įpilti jau pagamintos koncentracijos fotosensibilizatoriaus tirpalo ir įstatyti į 5 cm kiuvetę be sklaidančios terpės (15 pav.).
3. Filtrų pagalba, nufiltruoti žadinančią spinduliuotę ir užregistruoti fotosensibilizatorių fluorescencijos spektrą bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą 1 cm kiuvetėje.
4. Pagaminti sklaidančią terpę tokią, kad matuojant, Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometru 1 cm kiuvetėje, sklaidos spektrą, ties 635 nm $\ln(I/I_0)$ būtų lygu apie 0,7.
5. Įpilti pagamintą sklaidančią terpę į 5 cm kiuvetę ir į šią kiuvetę įstatę 1 cm kiuvetę su sensibilizatoriumi, nufiltruoti žadinančią spinduliuotę ir užregistruoti sensibilizatorių fluorescencijos spektrą bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą 1 cm kiuvetėje.
6. Paliginti gautus fluorescencijos spektrus su sensibilizatorių fluorescencijos spektrais.
7. Keičiant 1 cm kiuvetės padėtį 5 cm kiuvetėje (didinant žadinančios spinduliuotės sklaidimo kelią sklaidančia terpę) užregistruoti sensibilizatorių fluorescencijos spektrą bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą 1 cm kiuvetėje.
8. Grafiškai pavaizduoti kaip priklauso fluorescencijos intensyvumas nuo žadinančios spinduliuotės sklaidimo kelio sklaidančioje terpėje

7. Kontroliniai klausymai

1. Sugertis ir pagrindiniai jos dėsniniai.
2. Fluorescencija ir pagrindiniai jos dėsniniai.
3. Sklaida ir pagrindiniai jos dėsniniai.
4. Kas vyksta molekulėse, jas sužadinus šviesa?
5. Pagrindinės fluorofortų rūšys.

8. Literatūra

1. BAGDONAS, S., L.-W. MA, V. IANI, R. ROTOMSKIS, P. JUZENAAS and J. MOAN. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: A spectroscopic study. 2000, *Photochem. Photobiol.* **72**, 186-192.
2. DICKSON G., E.F. and R.H. POTTIER. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. 1995, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **29**, 91-93.
3. KENNEDY, J.C., R.H. POTTIER and D.C. PROSS Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical practice. 1990, *J. Photochem. Photobiol B* **6**, 143-148.
4. Liuminescensijos laboratoriniai darbai: magistrantams/ Parengė doc. V. Urba.- 1997, p. 3-16.
5. ROTOMSKIS R., STRECKYTĖ G., GRICIŪTĖ L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai: monografija.- Vilnius: Lietuvos mokslas, 2002, p. 50-68.
6. ŠALNA Vaidutis Antanas. Optika: mokymo priemonė universitetų fizikos specialybės studentams.- Vilnius, 2000, p. 9-10.
7. Javorskis B., Detlafas A. Fizikos kursas III t. Vilnius: Mintis, 1975. 582 p.
8. Aliaksandr Karotki, Mikalai Kruk, Mikhail Drobizhev, Aleksander Rebane, Eric Nickel, and Charles W. Spangler. Efficient Singlet Oxygen Generation Upon Two-Photon Excitation of New Porphyrin With Enhanced Nonlinear Absorption. IEEE JOURNAL ON SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS, VOL. 7, NO. 6, NOVEMBER/DECEMBER 2001