

7. FOTOSENSIBILIZACIJA BIOLOGINĖSE SISTEMOSE

7.1. Fotosensibilizacijos reiškinys

Kaip buvo minėta 6 skyriuje, UVC ir UVB spinduliuotė gali sukelti biologinių molekulių pažaidas, kadangi kaip tik šių sričių spinduliuotė biomolekulės sugeria intensyviausiai. Tuo tarpu UVA ir regimosios srities spinduliuotė paprastai nesukelia tiesioginių fotopažaidų biologinėse sistemose, kadangi dauguma biomolekulių šių bangų spinduliuotė sugeria silpnai. Tačiau jei biologinėje sistemoje yra tam tikrų chromoforinių molekulių, vadinamų fotosensibilizatoriais, organizmo ląstelės gali būti pažeistos arba sunaikintos veikiant ir šių bangų spinduliuotei. Tai vyksta todėl, kad fotosensibilizatorius (donoras) sugėręs šviesą, perteklinę energiją gali atiduoti aplinkinėms molekulėms (akceptoriams). Tuomet akceptoriaus molekulė atsiduria sužadintoje būsenoje ir gali dalyvauti įvairiose fotocheminėse reakcijose. Toks procesas vadinamas elektroninio sužadinimo energijos pernaša, o vyksmai, kuriuose dalyvauja energijos pernašos būdu sužadinta akceptoriaus molekulė vadinami fotosensibilizuotais.

Ne visos šviesą sugeriančios molekulės gali būti sensibilizatoriais. Pagrindinis reikalavimas fotosensibilizatoriams – santykinai ilga sužadintos būsenos gyvavimo trukmė, užtikrinanti efektyvų energijos pernašą akceptoriaus molekulėms. Dėl šios priežasties efektyviausi fotosensibilizatoriai yra molekulės, turinčios didelį interkombinacinės konversijos į sužadintą tripletinę būseną kvantinį našumą ϕ_{IK} , kadangi šioje būsenoje sužadinta molekulė gali gyvuoti pakankamai ilgai, nuo 1 ms iki kelių sekundžių (tripletinė sužadintos molekulės būseną dar vadinama metastabilia būseną). Pavyzdžiui, bimetalių porfirinų ϕ_{IK} gali siekti 0,9.

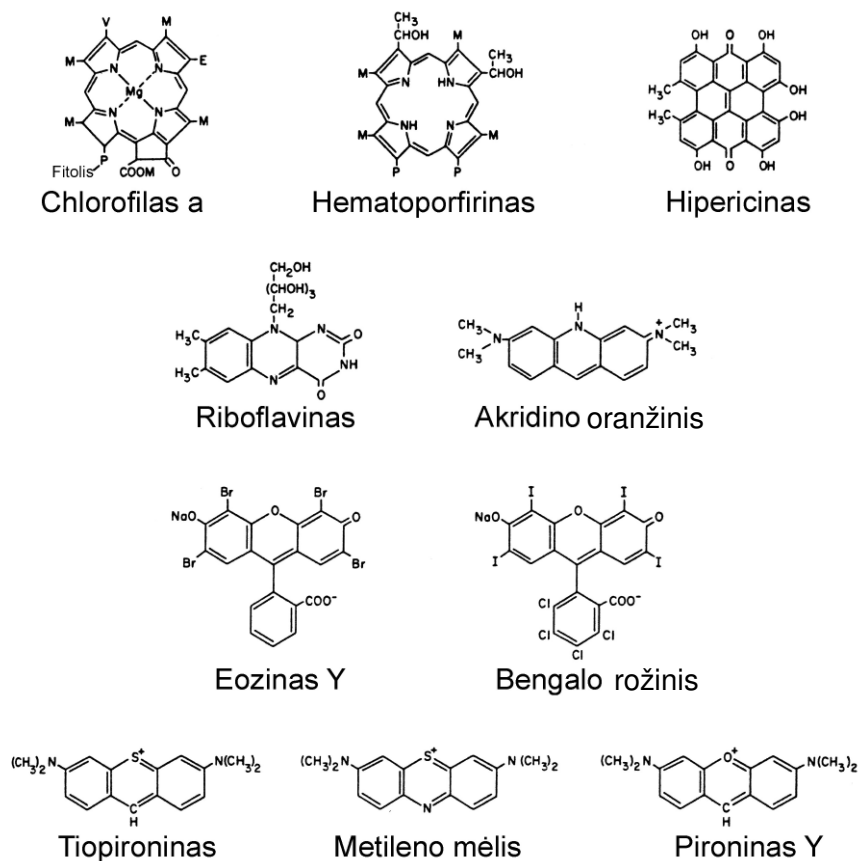
Taip pat galimas atvejis, kai tarp šviesos sužadinto fotosensibilizatoriaus ir aplinkinių molekulių (substratų) vyksta ne elektroninio sužadinimo energijos pernaša, o dalelės – elektrono (arba vandenilio atomo) pernaša.

Taigi, bendruoju atveju, geras fotosensibilizatorius turi:

1. efektyviai sugerti fotonus, t. y. turėti didelį molinį ekstinkcijos koeficientą;
2. pasižymėti dideliu energijos pernašos į tripletinę būseną (interkombinacinės konversijos) kvantiniu našumu;
3. pasižymėti ilga tripletinės būsenos gyvavimo trukme.

Atsižvelgiant į fotocheminės reakcijos pirminį mechanizmą, efektyvus I tipo fotosensibilizatorius turi lengvai atiduoti ir / arba atplėšti elektronus, tuo tarpu II tipo sensibilizatorius turi efektyviai generuoti singuletinį deguonį.

Fotosensibilizatorių pavyzdžiai. Šimtai skirtingų organinių, metaloorganinių ir neorganinių junginių biologinėse sistemose gali veikti kaip fotosensibilizatoriai. Daug sensibilizatorių susintetinama pačiame organizme, ypač augaluose. Tai kai kurie alkaloidai, benzofuranai, chlorofilai, flavinai, poliacetilenai, daugybė policiklinių polihidroksichinonų (pvz., hipericinas), porfirinai (pvz., protoporfirinas), psoralenai (furanokumarinai), piridoksalas, chinonai, tiofenai ir kt. Taip pat yra sukurta daug sintetinių junginių, kurie yra fotosensibilizatoriai, pvz., akridinai (akridino oranžinis, proflavinas ir kt.), antrachinonai,



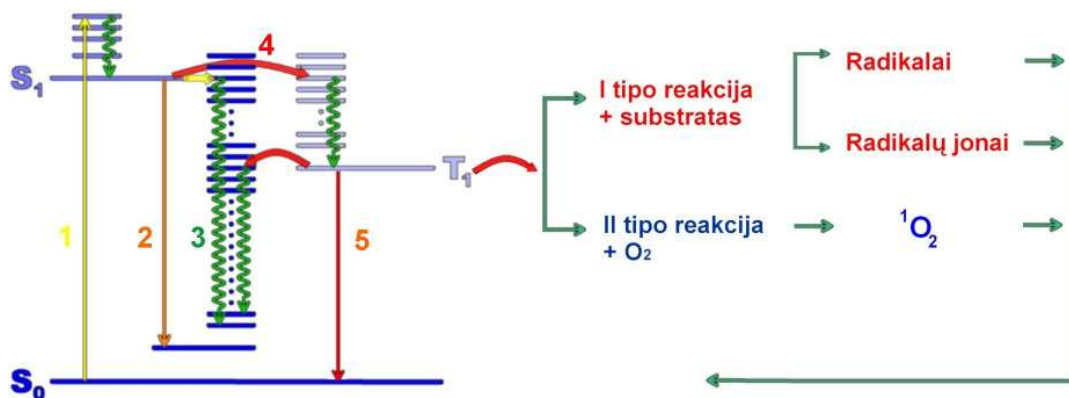
7.1 pav. Fotosensibilizatorių pavyzdžiai. E – etilo, M – metilo, V – vinilo grupė, P – propioninė rūgštis. Hipericinas yra policiklinis polihidrochinonas. Eozinas Y (tetrabromofluoresceinas) ir bengalo rožinis (tetrachlorotetraiodofluoresceinas) yra fluoresceinai.

safraninai, haloaromatiniai dariniai, ketonai, fenotiazinai (metileno mėlis, chlorpromazinas ir kt.), ftalocianinai, daugybė įvairių rūšių porfirinų, ksantenai (eozinas, bengalo rožinis ir kt.) ir t.t. Neorganiniai fotosensibilizatoriai – kadmio sulfidas, vario, geležies jonai, rutenio trispiridilas, titano dioksidas ir urano junginiai. Tačiau daug šviesą sugeriančių molekulių

nėra efektyvūs fotosensibilizatoriai dėl mažo tripletinės būsenos kvantinio našumo ir trumpos tripletinės būsenos gyvavimo trukmės. Tokie yra antocianinai, azo dažai, indofenoliai, geležį turintys porfirinai (hemas), nitro, nitrozo, oksazino ir triarilmetano dažai. Keleto fotobiologijos tyrimuose dažniausiai naudojamų fotosensibilizatorių struktūros pavaizduotos 7.1 paveiksle.

7.2. Fotosensibilizacijos reakcijos

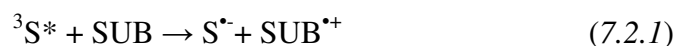
Sąveikaujant sužadintam sensibilizatoriui su biologine terpe galimi du pagrindiniai reakcijų tipai: I tipo reakcijose sensibilizatorius tiesiogiai sąveikauja su aplinkinėmis molekulėmis (substratu) atplėšdamas arba atiduodamas elektroną (arba vandenilį), o II tipo reakcijose citotoksinius procesus sukelia sensibilizatoriaus generuojamas singuletinis deguonis (7.2 pav).



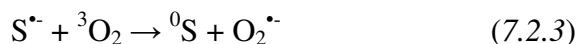
7.2 pav. Jablonskio diagrama, vaizduojanti elektroninius šuolius sužadintoje fotosensibilizatoriaus molekulėje (1 – sugertis, 2 – fluorescencija, 3 – vidinė konversija, 4 – interkombinacinė konversija, 5 – fosforescencija) bei pagrindiniai procesai, vykstantys sužadintam tripletinėje būsenoje (T_1) fotosensibilizatoriui sąveikaujant su biologine terpe.

7.2.1. I tipo fotosensibilizuotos reakcijos

Bendru atveju, sensibilizatoriaus molekulė, esanti sužadintoje tripletinėje būsenoje, gali daug lengviau, negu nesužadintoje būsenoje, atplėšti ar atiduoti elektroną (arba vandenilį) kitoms molekulėms. Šių reakcijų efektyvumas priklauso nuo sensibilizatoriaus ir substrato cheminės struktūros bei nuo reakcijos sąlygų. Tripletinėje būsenoje sensibilizatorius, atplėšęs elektroną nuo substrato (SUB) (dažniausiai pasitaikantis atvejis biologinėse sistemose), tampa dalinai redukuotu, $S^{\bullet-}$ arba SH^{\bullet} , o substratas semioksiduotu, $SUB^{\bullet+}$ arba SUB^{\bullet} :



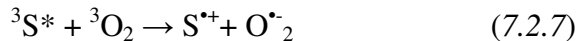
Šių reakcijų metu susidarę sensibilizatoriaus ir substrato radikalai yra chemiškai labai aktyvūs. Daugeliu atvejų substrato radikalai reaguoja su deguonimi, sudarydami įvairių tipų oksiduotus produktus; dažnai tai būna peroksidai, kurie gali toliau reaguoti inicijuodami grandininius laisvųjų radikalų tipo savioksidacijos procesus. Daugelyje sistemų dalinai redukuotas sensibilizatorius, reaguodamas su deguonimi $^3\text{O}_2$, grįžta į pagrindinę būseną, susidarant superoksianijono radikalui $\text{O}_2^{\cdot-}$ (arba peroksiradikalui HO_2^{\cdot}):



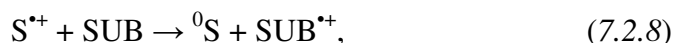
$\text{O}_2^{\cdot-}$ (arba HO_2^{\cdot}) gali reaguoti su kitomis biomolekulėmis. Kai kurie dalinai redukuoti sensibilizatoriai, pvz., flavinai, dalyvauja dismutacijos reakcijose, kurių produktai – vienas pagrindinės būsenos sensibilizatorius ir vienas pilnai redukuotas sensibilizatorius SH_2 . SH_2 gali toliau reaguoti su deguonimi, susidarant pagrindinės būsenos sensibilizatoriui ir vandenilio peroksidui H_2O_2 :



Nors nedideliu efektyvumu, tačiau superoksidas gali būti generuojamas ir tiesiogiai iš tripletinio sensibilizatoriaus perduodant elektroną deguonies molekulei:

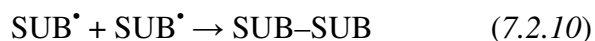
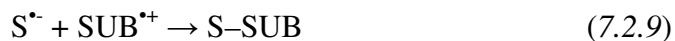


Susidaręs dalinai oksiduotas sensibilizatorius $\text{S}^{\cdot+}$ gali reaguoti su redukuojančiu substratu, susidarant pagrindinės būsenos sensibilizatoriui ir dalinai oksiduotam substratui:



o $\text{SUB}^{\cdot+}$ gali dalyvauti tolimesnėse reakcijose.

Galiausiai, kai kuriais atvejais sensibilizatoriaus ir substrato radikalai gali reaguoti sudarydami kovalentinius sensibilizatoriaus–substrato ir substrato–substrato fotoaduktus:

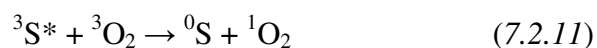


I tipo reakcijos vyksta efektyviausiai, kai aplinkoje yra daug substrato ir mažai deguonies molekulių. Nekovalentinio sensibilizatoriaus–substrato komplekso susidarymas prieš apšvietimą gali padidinti I tipo reakcijos tikimybę dėl mažo atstumo tarp sensibilizatoriaus ir substrato. I tipo fotoreakcijų eigoje efektyviausiai degraduojami substratai yra molekulės, kurias lengva oksiduoti (pvz., aminai ir fenoliai) arba redukuoti (pvz., chinonai). I tipo reakcijos pavyzdys – flavino sensibilizuota aminorūgštis metionino fotodegradacija. Apšvietus sugeneruojamas sužadintas tripletinėje būsenoje flavinas, kuris atplėšia elektroną nuo metionino sieros atomo; susidaręs metionino radikalas netenka amino

ir karboksilo grupių ir virsta metionalu. Flavino radikalas dalyvauja reakcijose, pažymėtuose (7.2.5) ir (7.2.6), susidarant pagrindinės būsenos flavinui ir vandenilio peroksidui.

7.2.2. II tipo fotosensibilizuotos reakcijos

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



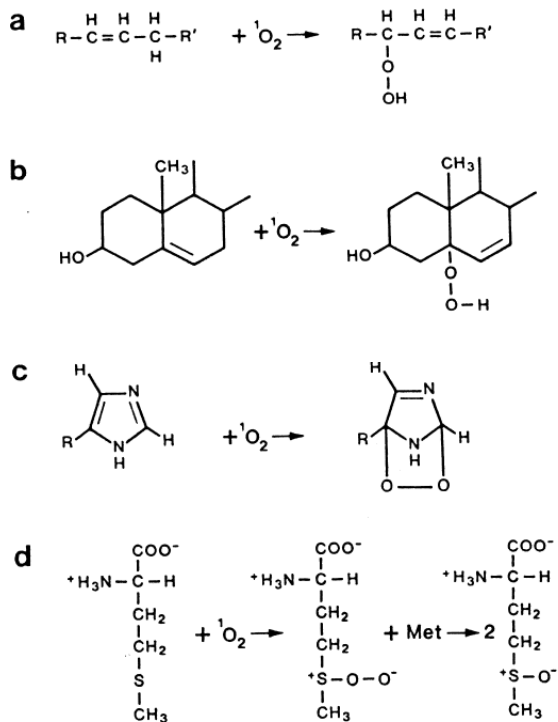
Kadangi tiek sužadintas sensibilizatorius, tiek deguonis pagrindinėje būsenoje yra tripletinių būsenų, energijos pernaša tarp jų nėra draudžiama ir vyksta efektyviai. Po energijos pernašos sugeneruotas singuletinis deguonis gali būti dviejų būsenų: ${}^1\Sigma_g^+$ ir ${}^1\Delta_g$, tačiau tik ilgiau gyvuojanti atmaina ${}^1\Delta_g$ dalyvauja fotodinaminėse reakcijose. Singuletinio deguonies (${}^1\Delta_g$) gyvavimo trukmė vandenyje yra maždaug 4 μs , o lipiduose ir kitokioje nepolinėje terpėje gerokai ilgesnė.

Pagrindinės būsenos deguonis (tripletinis) dėl sukinio draudimo negali aktyviai reaguoti su biomolekulėmis, kadangi organinės molekulės paprastai yra singuletinėse pagrindinėse būsenose. Tuo tarpu singuletiniam deguoniui sukinio draudimas nebegalioja. Be to, sužadintas singuletinis deguonis yra labiau elektrofiliškas, negu pagrindinėje būsenoje, todėl aktyviau reaguoja su biomolekulėmis, kurios linkę atiduoti elektronus.

Pagrindinės singuletinio deguonies reakcijos su biomolekulėmis. Pagrindinės reakcijos yra (1) singuletinio deguonies prisijungimas prie oleinų su alilinais vandenilio atomais (pvz., nesočiosios riebalų rūgštys ir cholesterolis) susidarant hidroperoksidams (7.3 pav. a,b), (2) singuletinio deguonies prisijungimas prie heterociklinių junginių (pvz., histidino) dieno sistemos susidarant endoperoksidams (7.3 pav. c) ir (3) singuletinio deguonies reakcija su organiniais sulfidais (pvz., metioninu) susidarant sulfoksidams (7.3 pav. d).

Fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmo nustatymo metodai Dauguma

fotosensibilizuotų reakcijų tyrimo metodų yra pagrįsti singuletinio deguonies dalyvavimo



7.3 pav. Kai kurios pagrindinės singuletinio deguonies reakcijos su biomolekulėmis. (a) singuletinio deguonies prisijungimas prie oleino su aliliniu vandenilio atomu (pvz., prie nesočios riebalų rūgšties) susidarant hidroperoksidui; (b) singuletinis deguonis prisijungia prie cholesterolio, sudarydamas 5- α -hidroperoksidą, specifinį singuletinio deguonies produktą; (c) singuletinio deguonies prisijungimas prie heterociklinio junginio dieno sistemos (imidazolo žiedas panaudotas kaip histidino modelis), susidarant endoperoksidui; (d) singuletinio deguonies prisijungimas prie organinio sulfido, amino rūgšties metionino (Met), susidarant nestabiliam produktui, kuris reaguodamas su kita metionino molekule, sudaro dvi metionino sulfoksido molekules.

kitų produktų.

3) Lyginant reakcijos greičius vandenyje (H_2O) ir sunkiajame vandenyje (D_2O). Vandenyje singuletinio deguonies gesimas yra bent 10 kartų greitesnis, negu D_2O (H_2O : $\tau_{\Delta}=3\mu\text{s}$; D_2O : $\tau_{\Delta}=65\mu\text{s}$ [Gorman, Rodgers, 1992], todėl sunkiajame vandenyje fotosensibilizuotų reakcijų sparta atitinkamai didesnė.

reakcijose nustatymu. Dažniausiai naudojami singuletinio deguonies nustatymo metodai yra:

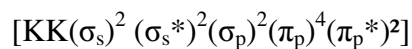
1) Panaudojant gesiklius, kurie efektyviai gesina singuletinį deguonį, pvz. azidą arba β -karotiną. Gesikliai sulėtina fotosensibilizuotus procesus. Tačiau naudojant gesiklius ne visada galima gauti vienareikšmišką atsakymą. Pirmiausia turi būti įrodyta, kad inhibitorius negesina paties sensibilizatoriaus tripletinės būsenos.

2) Panaudojant gaudykles, t. y. medžiagas, kurias efektyviai oksiduoja singuletinis deguonis, pvz., furaną, histidiną, triptofaną. Deja, daugelis gaudyklių gali būti oksiduojamos iki tų pačių produktų ir vykstant I tipo reakcijoms, t.y. dalyvaujant laisviesiems radikalams. Cholesterolis yra vienas iš nedaugelio gaudyklių, kuris suteikia vienareikšmišką atsakymą, nes reaguodamas su singuletiniu deguonimi jis sudaro tik vieną produktą- 5 α -hidroperoksidą, tuo tarpu reaguodamas su laisvaisiais radikalais sudaro daugybę

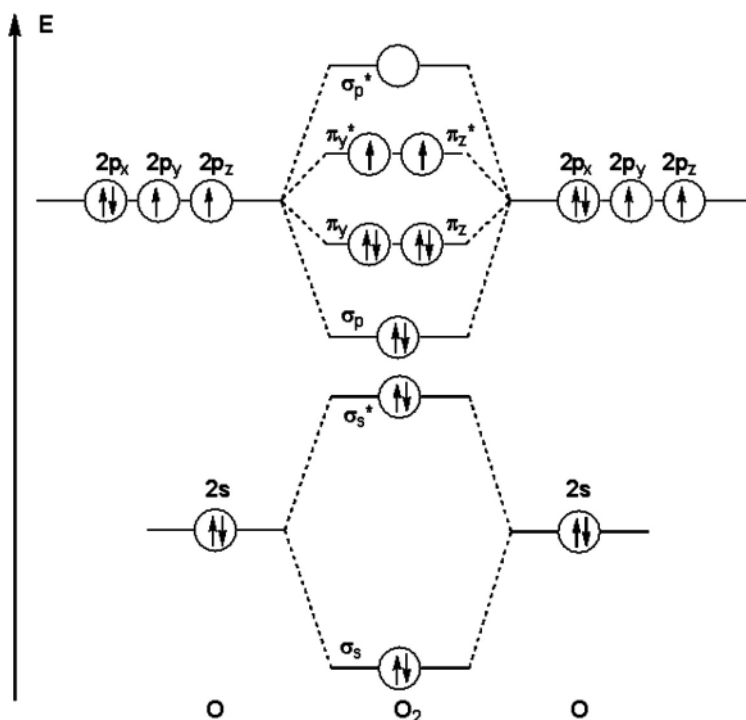
4) Singuletinio deguonies liuminescencijos ties 1270 nm registravimas. Tačiau, kadangi singuletinio deguonies liuminescencijos kvantinis našumas labai mažas, tam reikia panaudoti labai jautrius IR spinduliuotės detektorius.

7.3. Singuletinio deguonies savybės

Molekulinis deguonis. Pirmasis paramagnetines deguonies O₂ savybes pastebėjo M.Faradėjus 1840 metais. Beveik po šimtmečio, 1928 m. R.Mulikenas (Mulliken) pasiremdamas molekulių orbitalių (MO) teorija, užrašė deguonies molekulės elektroninę struktūrą ir parodė, kad pagrindinėje būsenoje molekulinis deguonis turi du nesuporuotus elektronus:

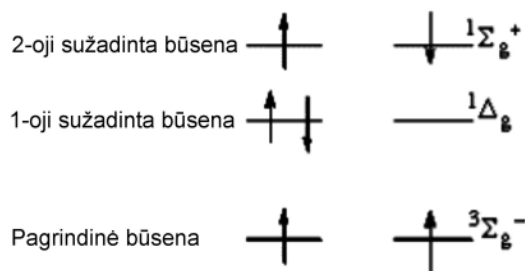


Deguonies O₂ molekulėje, sudarytoje iš dviejų deguonies atomų O (1s² 2s² 2p⁴), molekulinėse orbitalėse 16 elektronų pasiskirsto taip, kaip parodyta 7.4 pav.:



7.4 pav. Deguonies molekulės molekulių orbitalių užpildymo schema.

Dviejose skiriančiose MO π_p* yra po vieną nesuporuotą elektroną. Deguonis gamtoje yra vienintelė dviatomė homobranduolinė molekulė, kurios pagrindinės būsenos multiplietiškumas M=3 (tripletinė būseną). Spektroskopijoje šios būsenos terminas žymimas ${}^3\Sigma_g^-$.



7.5 pav. Deguonies molekulės elektroninių būsenų konfigūracijos ir termai.

Sužadinto deguonies elektroninės būsenos yra singuletinės ir žymimos $1\Delta_g$ ir $1\Sigma_g^+$ (7.5 pav.), o tokių būsenų deguonis vadinamas singuletiniu. Energijos skirtumas tarp pagrindinės $3\Sigma_g^-$ ir pirmosios sužadintos būsenos $1\Delta_g$ ($O_2(3\Sigma_g^-) \rightarrow O_2(1\Delta_g)$) $\Delta E = 7882 \text{ cm}^{-1}$,

o tarp pagrindinės ir antrosios sužadintos būsenos ($O_2(3\Sigma_g^-) \rightarrow O_2(1\Sigma_g^+)$) $\Delta E = 13121 \text{ cm}^{-1}$.

Singuletinio deguonies gyvavimo trukmė Šuolis $O_2(1\Delta_g) \rightarrow O_2(3\Sigma_g^-)$ yra griežtai draudžiamas kvantinės mechanikos požiūriu, todėl būsenos $1\Delta_g$ gyvavimo trukmė gana ilga (metastabilus lygmuo). Dujose $1\Delta_g$ gyvuoja labai ilgai ($\tau = 45 \text{ min}$), tuo tarpu $1\Sigma_g^+$ gyvavimo trukmė $\tau = 7 \text{ s}$. Tirpaluose singuletinio deguonies gyvavimo trukmė daug trumpesnė, nes minėto šuolio draudimas susilpnėja molekulėms susiduriant, be to, gyvavimo trukmė priklauso nuo tirpiklio prigimties. Pavyzdžiui, $1O_2(1\Delta_g)$ vandenyje $\tau \sim 4 \mu\text{s}$, o sunkiajame vandenyje (D_2O) – $67 \mu\text{s}$. Kitą $1O_2$ būseną $1\Sigma_g^+$ efektyviai gesina vanduo, todėl jos gyvavimo trukmė trumpesnė negu 10^{-10} s . Būtent dėl ilgos gyvavimo trukmės, reakcijose, vykstančiose vandeniniuose tirpaluose (tuo pačiu ir biologinėse sistemose), svarbus tik $1O_2(1\Delta_g)$, o $1O_2(1\Sigma_g^+)$ inaktyvuojasi nespėjęs difuzijos būdu pasiekti substrato. Manoma, kad $1\Sigma_g^+$ labai greitai virsta $1\Delta_g$. Singuletinis deguonis $1O_2(1\Delta_g)$ yra nepaprastai aktyvus oksidatorius, nes dėl singuletinio multiplėtiškumo jam nėra jokių sukinio draudimo taisyklių dalyvauti reakcijose su kitomis molekulėmis.

7.4. Fotosensibilizacijos pavyzdžiai biologinėse sistemose

7.4.1. Fotosensibilizacinis poveikis biomolekulėms (in vitro): lipidams, azotinėms bazėms ir nukleino rūgštims, aminorūgštims ir baltymams

Lipidai. Kadangi lipidai yra pagrindiniai ląstelių membranų struktūriniai komponentai bei yra daugelio maisto rūšių sudėtyje, daug tyrimų buvo atlikta tiriant lipidų fotosensibilizuotą oksidaciją. Nesočiosios riebalų rūgštys gali būti fotooksiduotos tiek I tipo, tiek II tipo reakcijų metu [Foote, 1981; Straigh, Spikes, 1985]. Nors pirminiai abiejų tipų reakcijų produktai yra aliliniai hidroperoksoidai, tačiau produktų izomerai bei reakcijų

kinetikos abiem atvejais yra skirtingos. I tipo reakcijos yra sudėtingos, jų metu susidaro aliliniai laisvieji radikalai, kurie toliau reaguoja sudarydami įvairius hidroperoksirus ir kitus produktus, pvz., alkoholius, epoksidus ir ketonus.

Pagrindiniai nesočiųjų trigliceridų ir fosfolipidų sensibilizuotos fotooksidacijos produktai yra hidroperoksirus, tačiau, dėl galimos tamsinės šių produktų savioksidacijos, galutiniai produktai yra sudėtingas įvairių junginių mišinys. Vykstant I tipo reakcijoms iš cholesterolio susidaro daug įvairių produktų, tame tarpe 7- α - ir 7- β -hidroperoksirus. Tuo tarpu vykstant II tipo reakcijai, dominuoja tik vienas produktas – 5- α -hidroperoksirus. Būtent dėl šios savybės cholesterolis naudojamas nustatant fotosensibilizacijos reakcijų tipą.

Azotinės bazės (purinai ir pirimidinai) ir nukleino rūgštys. Nors nukleino rūgščių ir jų sudėtį įeinančių azotinių bazių fotosensibilizuotos reakcijos buvo intensyviai tiriamos, tačiau iki šiol šie procesai nėra gerai suprasti. Purinai yra lengviau fotooksiduojami negu pirimidinai naudojant daugelį fotosensibilizatorių; fiziologinėmis sąlygomis guaninas ir jo dariniai yra jautriausi šviesai. Fotooksidacijos sparta įprastai auga, didėjant terpės pH. Pavyzdžiui, guanino fotooksidacija efektyviausia, kai pH > 9, t.y. tuomet, kai guaninas virsta anijonu, įvykus protono disociacijai nuo N₁ atomo.

Vykstant sensibilizuotai purinų ir pirimidinų fotooksidacijai, susidaro daugybė įvairių reakcijos produktų. Guanino ir jo darinių fotooksidacijos metu suskaldomi abu žiedai, ir susidaro daug antrinių produktų, įskaitant guanidiną, šlapalą, anglies dioksidą ir kt. Naudojant skirtingus fotosensibilizatorius, susidaro skirtingi oksidacijos produktai, todėl manoma, kad vyksta abiejų (I ir II) tipų reakcijos.

Apšvietus nukleino rūgščių tirpalą, kuriame yra sensibilizatoriaus molekulių, pasikeičia cheminės, fizikinės ir biologinės nukleino rūgščių savybės. Reakcijos mechanizmas priklauso nuo pasirinkto sensibilizatoriaus. Pavyzdžiui, efektyviausi nukleino rūgščių sensibilizatoriai (akridinai, metileno mėlis, tiopironinas ir kt.) yra teigiamai įkrauti junginiai, galintys prisijungti prie nukleino rūgščių. Sensibilizatoriui prisijungus prie substrato, padidėja I tipo reakcijos tikimybė. Tačiau, naudojant kai kuriuos porfirinus, nukleino rūgščių fotooksidacija vyksta dalyvaujant singuletiniam deguoniui. Kaip ir gryną azotinių bazių atveju, nukleino rūgščių ir sintetinių polinukleotidų tirpaluose guaninas fotooksiduojamas lengviausiai. Įvykus guanino liekanos destrukcijai, nukleino rūgšties grandinėje susidaro labilus glikozilinis ryšys, dėl ko gali atsirasti grandinės trūkiai.

Kiti fizikocheminiai nukleino rūgščių pokyčiai, sąlygoti fotosensibilizuotų procesų tirpaluose, yra klampumo sumažėjimas, lydymosi temperatūros sumažėjimas, spektriniai

poslinkiai, konformaciniai pokyčiai ir padidėjęs jautrumas fermentų degraduojančiam poveikiui.

Aminorūgštys ir baltymai. Tik penkios aminorūgštys, esančios baltymų sudėtyje, yra fotooksiduojamos sensibilizacinių reakcijų metu: cisteinas, histidinas, metioninas, triptofanas ir tirozinas. Visos šios aminorūgštys turi elektronais turtingas šonines grupes. Fotosensibilizuotų reakcijų mechanizmas ir kinetikos priklauso nuo aminorūgšties, sensibilizatoriaus, tirpiklio, pH ir kitų reakcijos sąlygų.

Cisteino fotooksidacinių reakcijų metu, naudojant daugelį sensibilizatorių, susidaro cisteino dimeras sujungtas disulfidiniu tilteliu. Fotooksidacijos sparta tuo didesnė, kuo didesnis terpės pH. Tai rodo, kad efektyviam fotooksidacijos reakcijos vyksmui užtikrinti cisteino tiolo (-SH) grupė turi būti deprotonuota.

Histidinas yra efektyviai fotooksiduojamas II tipo reakcijų metu. Manoma, kad histidino fotooksidacijos atveju pirminis produktas yra endoperoksidas, tačiau jis nestabilus ir greitai skyla susidarant įvairiems galutiniams produktams. Didėjant pH, fotooksidacijos reakcijos greitėja, tad reakcijos centras molekulėje greičiausiai yra deprotonuotas imidazolo žiedas.

Priklausomai nuo sensibilizatoriaus tipo, tirpiklio ir kitų reakcijos sąlygų, metioninas gali būti fotooksiduojamas tiek I tipo, tiek II tipo reakcijose. Šiuo atveju pH neturi didelės įtakos reakcijos greičiui. Vykstant I tipo reakcijoms, susidaro metionalas, tuo tarpu II tipo reakcijų metu susidaro sulfoksidas.

Vykstant triptofano fotooksidacijai, susidaro įvairūs fotoproduktai; reakcija gali vykti dalyvaujant tiek laisviesiems radikalams, tiek singuletiniam deguoniui. Gerai žinomas vienas stabilus triptofano fotooksidacijos produktas – N-formilkinureninas, kuris ir pats yra efektyvus fotosensibilizatorius.

Tirozino fotooksidacijos tikslus mechanizmas nėra žinomas, tačiau manoma, kad reakcija gali vykti I ir II tipų mechanizmais. Reakcijos produktai nėra gerai ištirti, tačiau žinoma, kad reakcijos metu suyra tirozino žiedas. Reakcijos sparta išauga, kai terpės pH didelis, tad molekulės reaktyvi forma galėtų būti fenolato anionas.

Apšvietus terpę, kurioje yra sensibilizatoriaus molekulių ir deguonies, beveik visi baltymai yra greitai fotooksiduojami. Tokie tyrimai atlikti su įvairiais baltymais: įvairiais fermentais, kraujo plazmos baltymais, hemoglobinu, bakterijų toksinais, ovalbuminu, baltymiais hormonais, kolagenu ir kt. [Straigh, Spikes, 1985]. Daugeliu atvejų baltymų pažaidos pasireiškia minėtų amino rūgščių liekanose- cisteinile, histidile, metionile, triptofile

ir tirozile. Amino rūgščių liekanos, esančios baltymo paviršiuje, yra fotooksiduojamos lengviau, negu liekanos baltymo viduje.

7.4.2. Fotosensibilizuoti vyksmai ląstelėse

Ląstelėje fotoksiškumo, kuri sąlygoja fotosensibilizacijos reakcijos, tyrimai yra gana sudėtingi, kadangi pati ląstelė pasižymi labai sudėtinga struktūra. Pavyzdžiui, ląstelės membrana veikia kaip barjeras, kuri pirmiausia turi įveikti fotosensibilizatorius. Ląstelės viduje taip pat gausu mikrosričių, kurių fiziko-cheminės savybės labai skirtingos. Dėl šios priežasties sensibilizatoriaus lokalizacija ląstelėje, o tuo pačiu ir fotosensibilizacijos reakcijų mechanizmas ir galutiniai produktai priklauso tiek nuo sensibilizatoriaus savybių (dydžio, krūvio, tirpumo ir kt.), tiek nuo sąveikos su viduląsteliniais komponentais, tiek nuo ląstelės fiziologinių sąlygų.

Pirminių fotosensibilizuotų procesų nustatymui biologinėje terpėje dažnai naudojamos modelinės sistemos, pvz., surfaktantų micelės arba liposomos, kurios struktūriškai imituoja ląstelės membraną. Žinduolių eritrocitai taip pat dažnai naudojami biologiniu modeliu tiriant ląstelių membranų fotosensibilizuotas pažaidas. Dar 1908 m. buvo parodyta, kad apšvietus triušio eritrocitus, kuriuose yra hematoporfirino arba chlorofilo, vyksta jų hemolizė [Blum, 1941].

Fotosensibilizuoti vyksmai intensyviai tiriami ir žinduolių bei žmogaus ląstelių kultūrose. Daugeliu atvejų pažaidos, sukeltos fotosensibilizuotų vyksmų, ląstelėje gali būti numatytos atsižvelgus į fotosensibilizatoriaus lokalizaciją. Pavyzdžiui, kadangi ląstelės membranoje išsidėstę įvairūs fermentai, struktūriniai baltymai ir nesotieji lipidai, tai sensibilizatorius, kuris lokalizuojasi membranoje, gali sukelti pokyčius membranos katalitiniuose ir transporto procesuose, taip pat pakeisti membranos pralaidumą ir mechanines savybes. Sensibilizatorius, kuris lokalizuojasi įvairiose citoplazmos srityse, gali sąlygoti fermentų, tRNR fotodegradaciją bei įvairių organelių struktūrinių komponentų pažaidas. Tuo tarpu apšvietus sensibilizatorių, kuris lokalizuojasi branduolio srityje, bus sukelta guanino destrukcija DNR grandinėje, galimi DNR grandinės trūkiai bei tikėtinas DNR-baltymo aduktų susidarymas. Visi šie pokyčiai, dažniausiai sukeltantys ląstelės žūtį, buvo eksperimentiškai stebimi, naudojant įvairias ląstelių kultūras ir skirtingus sensibilizatorius [J. D. Spikes, 1983].

7.4.3. Fotosensibilizuoti vyksmai daugialąsčiuose organizmuose: augaluose, žinduoliuose ir žmonėse

Fotosensibilizuoti vyksmai augaluose. Susiklosčius tam tikroms sąlygoms, augalai gali būti pažeisti dėl endogeninio chlorofilo fotosensibilizuotų reakcijų. Pavyzdžiui, lapuose užblokavus fotosintezę, ir po to lapus apšvietus, fotosintetinantys audiniai žūna, tačiau tik tuomet, kai terpėje yra deguonies [Rabinowitch, I. Fridovich, 1983]. Chloroplastuose yra sukauptos didelės koncentracijos karotinoidų, kurie normaliomis sąlygomis apsaugo ląsteles nuo fotodinaminių pažeidimų, užgesindami tripletinį chlorofilą ir singuletinį deguonį. Superoksido dismutazė apsaugo lapus nuo superoksido sukeliamų pažeidimų.

Dauguma augalų, be chlorofilo, turi ir kitų chromoforų, kurie gali veikti kaip endogeniniai fotosensibilizatoriai. Pavyzdžiui, berberinas, chinolino alkaloidas, sintetinamas keleto rūšių augaluose, veikiant šviesai inhibuoja svogūnų (šaknų) augimą [Molero *et. al.*, 1985]. Kai augaluose yra egzogeninių sensibilizatorių, po apšvietimo pažeidžiami augalų lapai, kotai ir šaknys.

Fotosensibilizuoti vyksmai žinduoliuose. Sensibilizatoriui patekus į žmogaus arba kitų žinduolių organizmą, šviesa gali sukelti fototoksiškumą arba fotoalergiją. Fototoksinės reakcijos įvyksta greitai ir gali vykti visų žinduolių organizmuose, jei tik sensibilizatoriaus koncentracija yra pakankamai didelė. Tuo tarpu fotoalerginis atsakas yra uždelstas, nes jį sąlygoja imuninio tipo reakcijos, sukeltos fotosensibilizuotų reakcijų metu pažeistų baltymų. Fototoksinis atsakas, sukeltas žinduolių organizmuose, pavyzdžiui, pelėse, kiaulėse, triušiuose, šunyse, paprastai pasireiškia kaip odos niežėjimas, žaizdų atsiradimas odoje (paraudimas, edema, nekrozė ir išopėjimas) ir tinklainės pažeidimas. Esant sunkiam fototoksiškumui, sumažėja kraujo spaudimas, sutrinka kraujo apytaka; manoma, kad šiuos atsakus sąlygoja iš odos į kraujotaką patekusios, fotosensibilizacijos reakcijų metu susidarę toksinės medžiagos. Daugelis sensibilizatorių, pvz., porfirinai, fototoksinį atsaką sukelia tik tuomet, kai aplinkoje yra deguonies.

Dėl kai kurių paveldimų arba vaistų sukeltų ligų, žinduolių organizmuose neįprastai dideliais kiekiais kaupiasi porfirinai. Tokios būsenos organizmas (šis susirgimas vadinama porfirija) yra ypač jautrus šviesai. Dėl įgimtos porfirijos kai kurių galvijų organizmuose kaupiasi protoporfirinas ir uroporfirinas. Tokių galvijų kaulai, dantys ir šlapimas yra rausvai rudos spalvos, o neapsaugoti, beplaukiai, nepigmentuoti odos plotai yra labai jautrūs šviesai.

Kartais ganyklose besiganantiems gyvuliams, karvėms, avims, sutrikus jų kepenų funkcijoms, pasireiškia neįprastas fotosensibilizuojantis poveikis. Šiuo atveju fotosensibilizatoriaus vaidmuo tenka filoeritrinui – fototoksiniam chlorofilo dariniui, kurį

pagamina bakterijos gyvūnų virškinamajame trakte. Paprastai filoeitritinas pašalinamas per tulžį, tačiau sutrikus gyvulių kepenų funkcijoms, ši medžiaga neįprastai dideliais kiekiais kaupiasi organizme. Gyvūnų kepenų funkcijos pažeidžiamos dėl kai kurių rūšių augaluose esančių hepatotoksinų bei mikotoksinų, kuriuos gamina ant augalų augantys grybai. Be to, kai kurių veislių avių turi įgimtą sutrikusį filoeitritino pašalinimo mechanizmą. Jeigu tokie gyvuliai maitinami žaliais augalais (turinčiais chlorofilo), dėl fotosensibilizuojančio poveikio gyvūnas gali net nugaišti. Tačiau fotosensibilizuojantis poveikis nepasireiškia, jei gyvūnas apsaugomas nuo šviesos arba maitinamas grūdais, ar kitu maistu, kuriame nėra chlorofilo.

Kai kurios augalų rūšys turi ne tik chlorofilo, bet ir kitokių medžiagų, kurios gali veikti kaip fotosensibilizatoriai (pvz., *Hypericum* rūšies augalai sintetina hipericiną, griekiai-fagopirinus). Jei gyvūnai maitinasi tokiais augalais, jie tampa jautrūs šviesai. Istoriskai, dėl šios priežasties, kai kuriuose geografiniuose regionuose negalėjo būti auginamos baltos avys ir balti arkliai (nes nepigmentuotos baltos odos sritys yra pažeidžiamos labiausiai).

Fotosensibilizuoti vyksmai žmonėse. Fotosensibilizuojantį poveikį žmonėms pirmą kartą pademonstravo 1913 m. daktaras Meyer-Betzas, kuris susileido sau 200 mg hematoporfirino ir pabuvo saulės šviesoje. Jau po kelių minučių tos odos vietos, kurios buvo apšviestos, smarkiai ištino ir buvo labai skausmingos. Po to oda dar du mėnesius išliko jautri šviesai [Meyer-Betz, 1913].

Fotosensibilizacija žmonėse nėra įprastas reiškinys ir dažniausiai yra sukeliamas, patekus į organizmą egzogeniniam sensibilizatoriui (nurijus arba susileidus intraveniškai, taip pat su sensibilizatoriumi kontaktuojant per odą), arba sergant tam tikromis vaistų sukeltomis arba paveldimomis ligomis, pvz., porfirija, pelagra, vilklige (*lupus erythematosus*). Kaip ir kitiems žinduoliams, žmonėms taip pat pasireiškia tiek fototoksinis, tiek fotoalerginis atsakas. Daug žmonių patiria fotosensibilizacinį poveikį dėl vartojamų vaistų. Kai kurie antibiotikai, antihistaminai, antiseptikai, barbituratai, diuretikai, sulfamidai ir kt. gali sukelti fotosensibilizuojantį poveikį. Žmonių, sergančių paveldima liga protoporfirija, eritrocituose ir serume yra neįprastai dideli kiekiai protoporfirino. Šviesoje, kurią sugeria porfirinas, tokių žmonių oda skausmingai “nudeginama”, o vėliau išsivysto eritema ir edema. Žmonių, sergančių porfirijos atmaina *cutanea tarda*, organizme dideliais kiekiais kaupiasi uroporfirinas ir daugeliu atvejų tokie žmonės taip pat yra labai jautrūs šviesai.

7.4.4. Fotosensibilizacijos reakcijų biologinis pritaikymas

Fotosensibilizuoti vyksmai gali būti sėkmingai pritaikyti gydant tam tikras ligas. Geriausiai žinomi gydymo pavyzdžiai, kuriuose naudojama šviesa ir egzogeniniai sensibilizatoriai yra PUVA terapija ir fotosensibilizuota navikų terapija (FNT).

PUVA terapija. PUVA terapijoje, naudojami sensibilizatoriai yra psoralenai, kurie sužadinami UVA šviesa. PUVA gydomos odos ligos, tokios kaip egzema, psoriazė ir vitiligo.

FNT. FNT principas pagrįstas tuo, kad kai kurie natūralūs ir sintetiniai sensibilizatoriai porfirinai selektyviai kaupiasi navikiniuose audiniuose. Suleidus porfirino į organizmą ir šiam susikaupus navike, navikas apšviečiamas šviesa, kurią sugeria sensibilizatorius (dažniausiai naudojama raudona spinduliuotė, kadangi dėl “fototerapinio lango” ji giliausiai prasiskverbia į audinį). Sužadinta sensibilizatoriaus molekulė sukelia fotochemines reakcijas, sąlygojančias biomolekulių pažaidas, dėl kurių vėžinės ląstelės žūsta.

Literatūra

- A. Blum, L.I Grossweiner (1982) *Photochem. Photobiol.* 36, 617-622.
- L.E. Bockstahler, T.P. Coohill, K.B. Hellman, C.D. Lytle, J. E. Roberts, in: *Int. Encycl. Pharmacol. Ther.* 1, 479-509, Pergamon Press, Oxford (1984)
- B. Britt (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 75–100.
- D. Creed (1984) *Photochem. Photobiol.* 39, 537-562.
- D. Creed (1984) *Photochem. Photobiol.* 39, 563-575.
- D. Creed (1984) *Photochem. Photobiol.* 39, 577-583.
- Cook, J. S., Regan, J. D. (1969) *Nature (London)* 233, 1066-1067.
- L. I. Grossweiner, G.W. Swenson, F.Zwincker (1963) *Science* 141, 805-806.
- L. I. Grossweiner (1984), *Curr.Eye.Res.* 3, 137-144.
- J. Jagger (1960) *Radiation Protection and Recovery* (Pergamon, Oxford), 352-377.
- A. Kelner (1949) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 35, 73-79.
- С. В. Конев, Д. Волотовский, *Фотобиология*, Минск., Издательство БГУ им. В. И. Ленина, (1979).
- A. Lamola (1968) *Photochem. Photobiol.* 7, 619.
- R. D. Ley (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, p. 4337.
- S. E. Ogut, S. M. D'Ambrosio, M. Samuel, B. M. Sutherland (1989) *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 4, 47-56.
- L. Roza, F. R. De Gruijl, J. B. A. Bergen Henegouwen , K. Guikers, H. Van Weelden , P. Van der Schans, R. A. Baan, (1991) *J. Invest. Dermatol.* 96, 903-907.
- R. Setlow, (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 49, 237
- A. Shima, O. Ikenaga, H. Nikaido, H. Takebe, N. Egami (1981) *Photochem. Photobiol.* 33, 313-316.
- R. P. Sinha, D. P. Häder (2002) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1, 225–236.
- K. C. Smith, R.C. Sharma (1987) *Mutation Res.* 183, 1-9.
- K. C. Smith (1971) *Photophysiology* 6, 209-278.

B. M. Sutherland (1974) *Nature (London)* 248, 109-112.

F. Thoma (1999) *EMBO J.* 18, 6585–6598.

B. Van Houten (1990) *Microbiol. Rev.* 54, 18-51.

H. F. Blum (1941), *Photodynamic action and diseases caused by light*, Reinhold, New York.

C. S. Foote (1981), in *Oxygen and Oxy –Radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, New York.

A. A. Gorman, M.A.J. Rodgers (1992) *J. Photochem. Photobiol.B*, 14, 159-176.

F. Mayer-Betz (1913) *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 112, 476-503.

M. L. Molero et. al., (1985) *J. Plant Physiol.*, 120, 91-94.

H. D. Rabinowitch, I. Fridovich, (1983) *Photochem. Photobiol.*, 37, 679-690.

J. D. Spikes (1983), in *Photoimmunology*, Plenum Press, New York.

R. C. Straigh, J. D. Spikes (1985) in *Singulet O₂ Vol. 4*, CRC Press, Boca Raton.