

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Фізичний факультет

Ящук В.М., Кудря В.Ю., Кравченко В.М., Лосицький М.Ю.

ВСТУП ДО БІОФОТОНІКИ

Навчальний посібник
для студентів фізичних факультетів вузів

Київ - 2017

УДК 535.37

Рецензенти:

д-р. біол. наук, канд. фіз.-мат. наук, проф. Говорун Д.М.

д-р. фіз.-мат. наук, проф. Остапенко Н.І.

*Рекомендовано до друку вченою радою фізичного факультету
(протокол №7 від _____)*

Яшук В.М., Кудря В.Ю., Кравченко В.М., Лосицький М.Ю.

Вступ до біофотоніки: Навчальний посібник для студентів
фізичних факультетів вузів. - К., 2017. - 178 с.

Розглянуто електронно-коливальні процеси та оптичні спектри біологічних молекул та макромолекул: нуклеотидів, амінокислот, біополімерів (ДНК, РНК, білки), ферментів та інших молекул біологічного походження). Описано можливі фотохімічні процеси, що відбуваються в біологічних об'єктах, та особливості спектральних проявів цих процесів. Розглянуто деякі прикладні аспекти біофотоніки: спектроскопічні методики з використанням двох типів біосенсорів з оптичним відгуком (аутолюмінесцентні біосенсиори та біосенсиори на основі молекулярних зондів), аутофлюоресцентна діагностика та фотодинамічна терапія.

Посібник розраховано на студентів фізичних факультетів, що спеціалізуються в галузі біофотоніки.

УДК 535.37

© Яшук В.М., Кудря В.Ю., Кравченко В.М., Лосицький М.Ю.

2017

З М І С Т

Розділ 1. Вступ. Біофотоніка: предмет, мета та основні завдання. Особливості електронних процесів в молекулярних системах

- 1.1. Енергетична структура молекулярних систем. Класифікація енергетичних рівнів. Квантові переходи
- 1.2. Перенесення енергії електронно-коливального збудження в молекулярних середовищах

Розділ 2. Електронно-коливальні процеси в біологічних об'єктах та їх оптичні спектри

- 2.1. Низькомолекулярні сполуки
 - 2.1.1. Нуклеотиди
 - 2.1.2. Амінокислоти
 - 2.1.3. Модифіковані нуклеотиди
 - 2.1.4. Компоненти ферментів
 - 2.1.4.1. Нікотинамідаденіндинуклеотид
 - 2.1.4.2. Флавінаденіндинуклеотид
 - 2.1.4.3. Порфірини
- 2.2. Біополімери
 - 2.2.1. ДНК
 - 2.2.2. РНК
 - 2.2.3. Білки

Розділ 3. Фотохімічні процеси в біологічних об'єктах. Особливості спектральних характеристик

- 3.1. Вступ
- 3.2. Типи фотохімічних реакцій
 - 3.2.1. Фотохімічне розщеплення

- 3.2.2. Реакції фотосинтезу
- 3.2.3. Реакції фотоприєднання
- 3.2.4. Реакції фотогідратації
- 3.2.5. Реакції фотоізомеризації
- 3.2.6. Фотоокислення
- 3.2.7. Внутрішньомолекулярне фотоіндуковане перенесення заряду
- 3.3. Основні параметри та закономірності фотохімічних реакцій. Методи опису та досліджень
 - 3.3.1. Параметри, що характеризують фотохімічні реакції
 - 3.3.2. Закони фотохімії
- 3.4. Застосування експериментальних методів фотоніки для дослідження фотохімічних реакцій
- 3.5. Приклади фотохімічних процесів в біологічних об'єктах
 - 3.5.1. Фотосинтез вітаміну Д
 - 3.5.2. Фотосинтез меланіну
- 3.6. Фотосинтез у природі
- Розділ 4. Прикладні аспекти біофотоніки. Біосенсиори з оптичним відгуком. Люмінесцентна діагностика. Фотодинамічна терапія**
 - 4.1. Аутолюмінесцентні біосенсиори
 - 4.2. Біосенсиори на основі молекулярних зондів
 - 4.2.1. Однофотонна детекція ДНК
 - 4.2.2. Двофотонна флюоресцентна детекція ДНК
 - 4.2.3. Деякі вимоги до флюоресцентних зондів
 - 4.2.4. Отримання внутрішньоклітинних

флюоресцентних зображень за допомогою
молекулярних зондів

4.2.5. Двофотонна флюоресцентна детекція РНК

4.2.6. Флюоресцентна детекція білків

Розділ 5. Аутолюмінесцентна діагностика ракових захворювань

5.1. Взаємодія оптичного випромінювання з біологічними
тканинами

5.2. Аутофлюоресцентна ендоскопія і бронхоскопія

5.3. Природні флюорофори у біологічних тканинах, які
можуть бути використані для діагностики раку

5.4. Природа зміни АФ тканин при ракових захворюваннях

5.5. Спектральні прояви злоякісних новоутворень у
тканинах

5.5.1. Відмінність в інтенсивності свічення

5.5.2. Відмінність у кольорі свічення (зміна форми
спектра)

5.5.3. Поява або зникнення характерних смуг

5.5.4. Зміна відношення інтенсивності смуги
флюоресценції до інтенсивності розсіяного
зразком пучка

5.5.5. Відмінність у часі загасання

5.6. Підсумки до розділу 5

Розділ 6. Фотодинамічна терапія

6.1. Поняття про фотодинамічну терапію та її фотофізичні
аспекти

6.2. Введення ФС в організм та локалізація його в пухлині

6.3. Збудження ФС

6.4. Генерація активних форм кисню та пошкодження пухлини

6.5. Фотосенсибілізатори: історія і перспективи

Список літератури

Розділ 1. Вступ. Біофотоніка: предмет, мета та основні завдання. Особливості електронних процесів в молекулярних системах

Біофотоніка – це галузь науки, що вивчає процеси взаємодії фотонів з біологічними об'єктами на рівні біомолекул та більш складних систем. В коло основних питань, що розглядає біофотоніка, входять особливості фотофізичних та фотохімічних процесів, що відбуваються в біологічних системах, а також прикладні проблеми, пов'язані з детекцією певних компонентів біологічних об'єктів на молекулярному рівні та отриманням їх просторових зображень; застосуванні методів фотоніки в молекулярній фармакології та медицині.

Біологічні молекули, клітини та тканини формуються органічними сполуками. Тому фотоніка біологічних об'єктів є близькою до фотоніки органічних систем небіологічного походження. Оптичні властивості біологічних молекул та макромолекул, як і у випадку органічних молекул та полімерів небіологічного походження, значною мірою визначаються наявністю в них π -електронних систем, енергія збудження яких знаходиться в діапазоні $1\div 6$ еВ, що відповідає довжинам хвиль фотонів $1200\div 200$ нм. Саме наявність таких систем зумовлює особливості електронно-коливальних процесів в біооб'єктах: оптичне поглинання, перенесення енергії електронного збудження та його деактивація (флюоресценція, фосфоресценція, теплова конверсія, фотогенерація носіїв струму, фотохімічні реакції). Загалом, схема процесів, ініційованих виникненням електронного збудження, в біологічному об'єкті (наприклад, в біополімері) має вигляд, представлений на рис.1. [1].



Рис.1. Загальна схема процесів, спричинених поглинанням фотонів

Вивчення представлених на схемі процесів в біологічних системах є фундаментальною метою біофотоніки. В той же час предметом досліджень біофотоніки є і прикладні задачі, пов'язані із застосуванням біофотоніки в молекулярній біології, молекулярній фармакології та медицині.

1.1. Енергетична структура біологічних молекулярних систем. Класифікація енергетичних рівнів оптичних центрів та квантові переходи між ними

Одним з основних завдань досліджень біологічних об'єктів так як і органічних систем (молекул, полімерів, агрегатів і т.п.) є побудова їх енергетичної діаграми (для молекул – схеми енергетичних рівнів) та вивчення можливих квантових переходів. В багатьох випадках використовують діаграму, запропоновану польським фізиком Олександром Яблонським (1898-1980) [2]. Систематика станів молекул в даному типі діаграм здійснюється за величиною енергії, а також за значенням спіну системи. Для нейтральних органічних молекул спінове число може набувати значень $S=0$ або $S=1$. Тому в даному випадку стани можуть бути або синглетними з $S=0$ (позначаються S), або триплетними з $S=1$ (позначаються T) (мультиплетність системи визначається як $2S+1$).

На рис.2 подано типову енергетичну схему електронно-коливальних рівнів та можливі квантові переходи між ними [1]. S_0 , S_1 , T_1 – електронні синглетні та триплетні рівні. Над "чисто" електронними рівнями, пов'язаними зі зміною руху електронів, більш "щільно" розміщені коливальні рівні (пов'язані з коливанням ядер атомів, що входять до складу молекули або молекулярної системи).

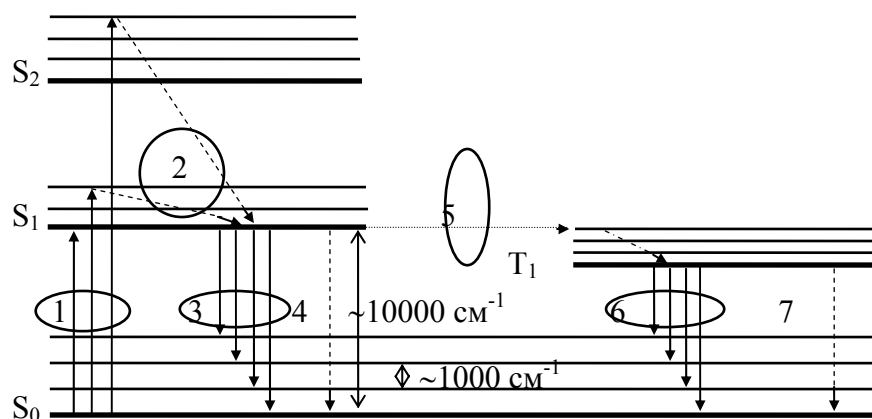


Рис.2. Енергетична діаграма органічних молекулярних систем

Можливий перебіг процесів, що стартують з моменту поглинання фотону (процес 1, час $\sim 10^{-15}$ с), такий (рис.2): 2 – $S_2 \rightarrow S_1$, $S_n \rightarrow S_1$, – внутрішня конверсія між збудженими станами ($\sim 10^{-13}$ с) (безвипромінюваний перехід); 3 – флюоресценція ($\sim 10^{-9} \div 10^{-8}$ с); 4 – $S_1 \rightarrow S_0$ – внутрішня конверсія в основний стан (безвипромінювальна деградація збудження); 5 – $S_2 \rightarrow T_2$, $S_1 \rightarrow T_1$ – інтеркомбінаційна конверсія між збудженими станами; 6 – фосфоресценція ($\sim 10^{-6} \div 10^3$ с); 7 – $T_1 \rightarrow S_0$ – інтеркомбінаційна конверсія в основний стан.

В спектроскопії органічних систем в енергетичних діаграмах для характеристики енергетичного положення рівнів

використовують так звані хвильові числа $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$, що пропорційні значенням енергії.

Використовуючи цю термінологію, зауважимо, що енергії електронних переходів відповідають величинам $\Delta\tilde{\nu}_e \sim 10000 \text{ см}^{-1}$, а типові енергії коливальних переходів – $\Delta\tilde{\nu}_v \sim 1000 \text{ см}^{-1}$. Положення перших збуджених синглетних електронних рівнів експериментально визначають, користуючись спектрами поглинання та флюоресценції (з перетину довгохвильового фронту спектру поглинання з короткохвильовим фронтом флюоресценції). Положення першого триплетного рівня оцінюють, за положенням короткохвильового краю спектру фосфоресценції.

Методи досліджень кожного з процесів, параметри, що їх характеризують, та основні закономірності, подано в ряді навчальних посібників [1,3], статтях та монографіях [4-10]. Для вивчення матеріалу, представленого далі, студентам та аспірантам необхідно опрацювати подані джерела.

1.2. Процеси перенесення електронно-коливальних збуджень в молекулярних системах

В загальному випадку енергія електронно-коливального збудження оптичного центру після поглинання фотону переноситься (рис.1) на певну відстань. Таке перенесення може бути реалізовано за рахунок випромінювального (реабсорбція) або ж безвипромінювального механізму.

У тому випадку, коли відстань між молекулами, чи іншими оптичними центрами не переважає 20 Å, в основному домінує безвипромінювальний механізм передачі електронно-коливального збудження, що реалізується за рахунок взаємодії між оптичними

центрами (для органічних середовищ – між окремими Р-електронними системами (див., наприклад). Елементарний акт передачі енергії між двома органічними молекулами по синглетним станам переважно здійснюється за диполь-дипольним механізмом (Механізм Фьорстера), якщо відповідні оптичні переходи – дозволені. Якщо ж відповідні переходи оптично заборонені, передача енергії електронного збудження все-таки може відбуватися, але на настільки малих відстанях, що хвильові функції молекул перекриваються. Саме в цьому випадку передача енергії збудження можлива за рахунок обмінного механізму (механізм Декстера). Наприклад, триплет – триплетна передача електронних збуджень здійснюється за механізмом Декстера.

Зазначим, що ймовірності елементарних актів передачі енергії електронних збуджень для різних механізмів передачі по різному залежать від відстані.

Згідно з теорією Фьорстера (див., наприклад, [1]) ймовірність за одиницю часу здійснення акту передачі енергії за диполь-дипольним механізмом

$$P_{DA} = 8,8 \cdot 10^{-29} K^2 Q_D B / n^4 \tau_D R^6, \quad (1.1)$$

де K - фактор, що враховує орієнтації дипольних моментів донорної та акцепторної молекул;

Q_D - квантовий вихід флюоресценції донора;

$B = \int_0^\infty \frac{F_D(\nu) \varepsilon_A(\nu)}{\nu^4} d\nu$ – інтеграл перекриття спектрів поглинання

акцепторної та флюоресценції донорної молекул;

ε_A - молярний коефіцієнт екстинкції;

$F_D(\nu)$ - інтенсивність спектрів випромінювання донора;

τ_D - час життя донора;

R - відстань між донорною та акцепторною групами;

n - показник заломлення.

У випадку передачі енергії збудження за обмінним механізмом ймовірність елементарного акту передачі енергії (механізм Декстера)

$$P = \frac{2\pi}{\hbar^2} z^2 \int F_D(E) \cdot \varepsilon_A(E) dE, \quad (1.2)$$

$$\text{де } z^2 = \sum_I \sum_F \frac{e^4}{g'_D g_A \varepsilon^2} \left| \int Q'(r_1) \frac{1}{r_{12}} Q(r_2) dr_{12} \right|^2.$$

$$z^2 \approx Y \cdot \exp\left(-\frac{2R}{L}\right),$$

де L - так званий ефективний середній борівський радіус для збудженого та незбудженого станів;

Y - безрозмірна константа, величина якої $Y \ll 1$;

$F_D(E)$ - спектр випромінювання донорних молекул, нормований так, що $\int F_D(E) dE = 1$;

$\varepsilon_A(E)$ - функція, пов'язана зі спектром поглинання акцептора.

Одним із основних параметрів, яким характеризують ефективність елементарного акту передачі електронного збудження (одноступінчатого перенесення енергії), є так званий критичний радіус передачі (R_0), що вводиться як відстань між молекулами, на якій ймовірність передачі електронного збудження від молекули до молекули дорівнює сумарній (випромінювальній та безвипромінювальній) ймовірності деактивації електронного збудження в молекулі – донорі.

Зауважимо, що в роботах з біофотоніки ефект перенесення

енергії електронного збудження часто скорочено позначають як FRET (Forster Resonance Energy Transfer), що не є коректним в загальному випадку. Більш коректним є позначення EEET (Electronic Excitation Energy Transfer).

В ряді випадків (у молекулярних кристалах, в полімерах з ароматичними боковими групами, агрегатах спостерігається безвипромінювальне багатоступінчате перенесення електронних збуджень. Опис цього процесу здійснюють, застосовуючи модель Френкеля, згідно якій енергія збудження переноситься квазічастинками – екситонами. Незалежно Файдишем, а згодом – Сімпсоном була запропонована модель дифузійного руху екситонів, що знайшла експериментальне підтвердження в багатьох роботах. В подальшому дифузійна модель була розвинута Аграновичем та іншими дослідниками. Давидовим було вперше вказано на таку важливу особливість спектральних властивостей екситонних станів в молекулярних кристалах як розщеплення смуг поглинання та випромінювання (Davidov splitting). Екситони, що відповідають збудженим синглетним станам називають синглетними екситонами, а ті, що відповідають збудженням триплетних станів (рівнів) – триплетними.

Основними параметрами, якими характеризують процеси перенесення енергії Френкелівськими екситонами в молекулярних органічних середовищах є:

- 1.Результуюча довжина пробігу екситона - середня відстань між точками народження та деактивації екситона (за рахунок різного типу релаксаційних процесів)

2. Час життя екситона.

3. Кількість елементарних стрибків, що здійснює екситон за час життя.

4. Гранична довжина елементарного стрибка екситона.

Зауважим, що термін екситон застосовують в основному до перенесення енергії електронного збудження в молекулярних кристалах, гомополімерах з ароматичними боковими групами, агрегатах молекул. У випадку кополімерів та біополімерів частіше використовують термін – мобільне або мігруюче електронне збудження. Варто також зазначити, що параметри 1 та 3 зв'язані між собою.

Встановлено, що основними доказами перенесення енергії електронного збудження в органічних (в тім числі біологічних) системах є:

1. Гасіння флюоресценції чи фосфоресценції донорних молекул молекулами домішок (акцепторних) малих концентрацій.
2. Близькість спектрів збудження флюоресценції (фосфоресценції) акцепторних центрів зі спектрами поглинання донорного середовища.
3. Деполяризація флюоресценції (фосфоресценції) домішкових (акцепторних) молекул при збудженні в області поглинання основного (донорного) середовища.
4. Наявність затриманої флюоресценції (у випадку триплетних екситонів).

Розділ 2. Електронно-коливальні процеси в біологічних об'єктах та їх оптичні спектри

Органічні сполуки і, зокрема, біологічні молекули та макромолекули характеризуються наявністю π - та σ - зв'язків. π -електронні системи перпендикулярні до площини молекули і в значній мірі перекриваються одна з іншою; саме вони, в основному, визначають оптичні властивості цих об'єктів. Біологічні молекули та макромолекули відносяться до так званого другого типу π -електронмістких сполук, в якому π -електрони локалізовані в межах елементарної ланки у так званих хромофорних групах. У такій ланці σ -електрони є остовом або "скелетом", відносно якого π -електрони можуть переміщатися [11]. Енергія збудження таких ланок знаходиться в діапазоні 1÷6 eV, що відповідає довжинам хвиль фотонів 1200÷200 нм (оптичний діапазон). Саме наявність π -електронних систем зумовлює особливості електронно-коливальних процесів у біоб'єктах та їх оптичних спектрів.

2.1. Низькомолекулярні сполуки

2.1.1. Нуклеотиди

Серед простих π -електронмістких сполук, що мають, принаймні, один атом азоту, досить важливими є піримідин (рис.3,а) та пурин (рис.3,б) (останній утворюється шляхом злиття піримідинового та імідазольного кілець) [12].

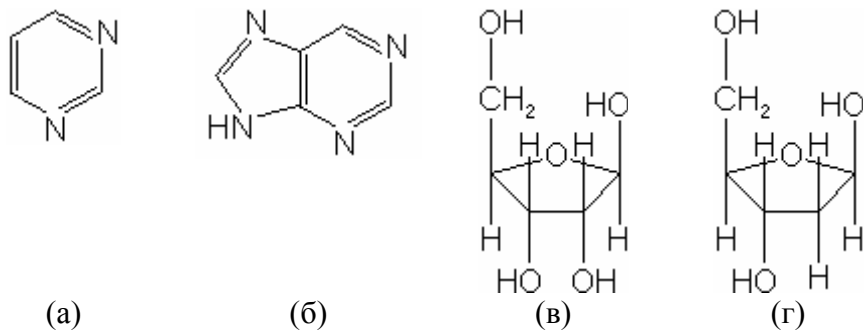


Рис.3. Хімічні формули (а) піримідину, (б) пурину, (в) рибози та (г) дезоксирибози

Піримідини та пурини утворюють біологічно важливий клас сполук. Макромолекули ДНК і РНК містять одні і ті ж пуринові основи: аденін (рис.4 та рис.10) і гуанін (рис.5 та рис.11), які є похідними пурину. Усі піримідинові основи є похідними піримідину: з них цитозин (рис.6 та рис.12) входить до складу як РНК, так і ДНК, урацил (рис.13) входить до складу РНК, а тимін (рис.7) – у складі ДНК.

Нуклеїнові кислоти, які були виділені спочатку з дріжджів, містять цукровий залишок, який було ідентифіковано як рибозу (рис.3,в) [12]. Крім того, з ДНК тканин деяких ссавців та різних мікроорганізмів було виділено інший цукровий залишок – дезоксирибозу (рис.3,г). Нуклеозиди складаються з π -електронної групи (в даному випадку, піримідинова або пуринова похідна) та відповідного (в залежності від типу макромолекули – ДНК чи РНК) цукрового залишку. Нуклеотиди, які є, власне, найменшими фрагментами – ланками макромолекул ДНК і РНК, являють собою фосфорні ефіри нуклеозидів (до нуклеозида приєднується фосфатна група PO_4H , приєднана у положенні 5').

Таким чином, ланками ДНК є 5'-монофосфати дезоксиаденозину (дАМФ, англ. dAMP) (рис.4), дезоксигуанозину

(дГМФ, англ. dGMP) (рис.5), дезоксицитидину (дЦМФ, англ. dCMP) (рис.6) та тимідину (дТМФ, англ. dTMP) (рис.7). Останній, власне говорячи, мав би називатися дезокситимідином, але рибонуклеозид, що містить рибозу та тимін, у природі практично не зустрічається. Вперше 5'-монофосфат дезоксиаденозину було знайдено у вільному стані в м'язах, тому його ще називають м'язовою аденіловою кислотою. Окремі дезоксирибонуклеотиди та рибонуклеотиди містяться у живих клітинах у кількостях, достатніх для "неперервного" синтезу макромолекул ДНК та РНК.

Спектральні характеристики дезоксирибонуклеотидів, досліджені авторами посібника в роботах [13-20] (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі, флюоресценція та фосфоресценція в температурному діапазоні $T=4.2\div 77\text{K}$), а також їхні хімічні формули представлені на рис.4-7. Слід зазначити, що фосфоресценція дТМФ має дуже низький квантовий вихід у порівнянні з іншими нуклеотидами. Тому для порівняння з іншими спектрами інтенсивність фосфоресценції дТМФ збільшують в 50 разів ($\times 50$).

В спектрі кожного з досліджуваних дезоксирибонуклеотидів є дві смуги, що відповідають першому та другому електронним переходам. У ці смуги у дТМФ, дЦМФ та дГМФ (довгохвильовий максимум), вносить свій вклад --C=O група ($\sim 270\text{ нм}$) [11,21]. Крім того, відомо, що молекула бензолу має смугу поглинання з максимумом 255 нм , і в залежності від того, які атоми заміщують основні атому вуглецю та які радикали можуть приєднуватись, ця смуга може зсуватися за спектральним положенням. Отже, суттєвим є вплив взаємодії між вищезгаданими групами, а саме: група --C=C--C=O спектрально проявляє себе в діапазоні

210÷257 нм, чим пояснюється наявність ще одного максимуму в спектрі поглинання дГМФ, і що також, можливо, вносить свій вклад в спектр поглинання дТМФ; група $-C=C-C=N-$ проявляє себе в діапазоні 259÷271 нм, що є причиною максимуму в спектрі поглинання дАМФ, і що також вносить свій вклад в поглинання дЦМФ [11]. Крім того, в спектрі поглинання дТМФ, можливо, проявляється вплив $-CH_3$ на інші групи (~275 нм.).

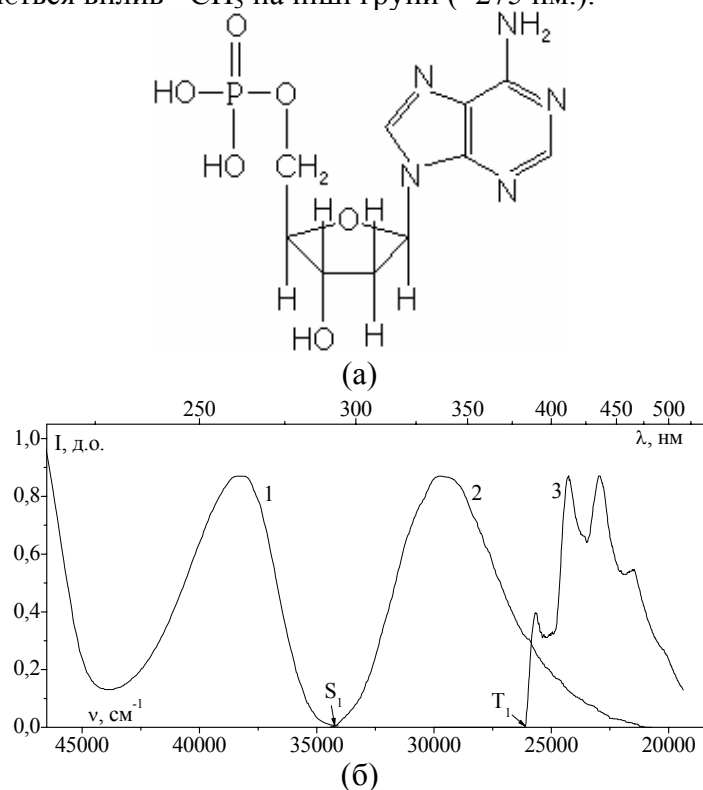


Рис.4. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) дАМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флуоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при T=4.2K)

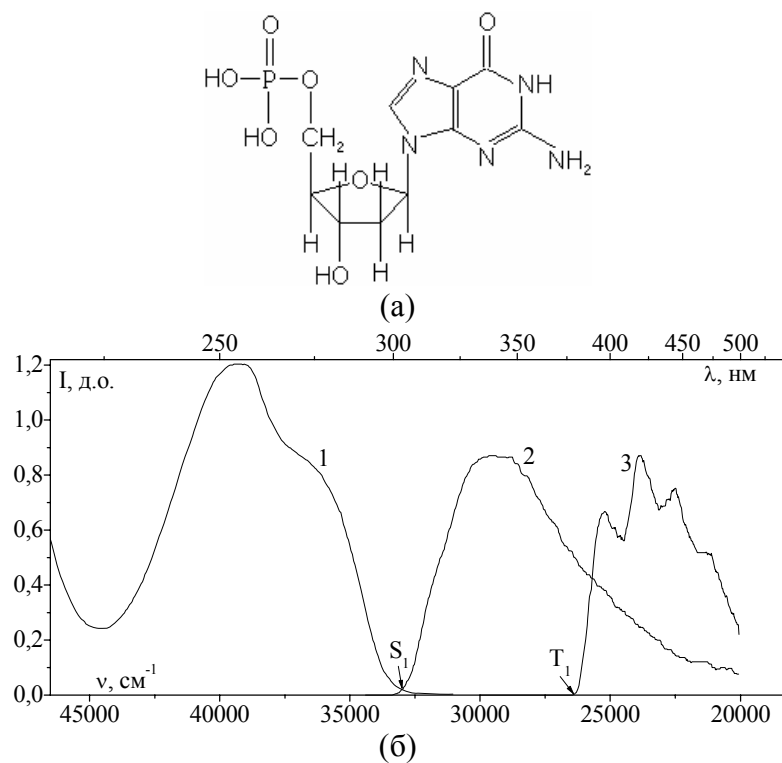


Рис.5. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) дГМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

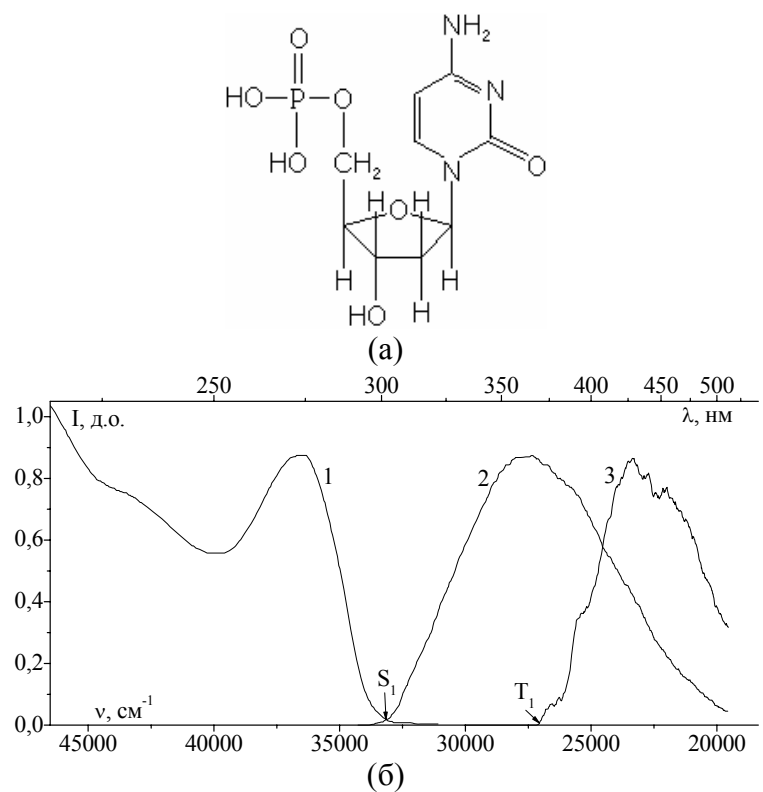


Рис.6. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) дЦМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

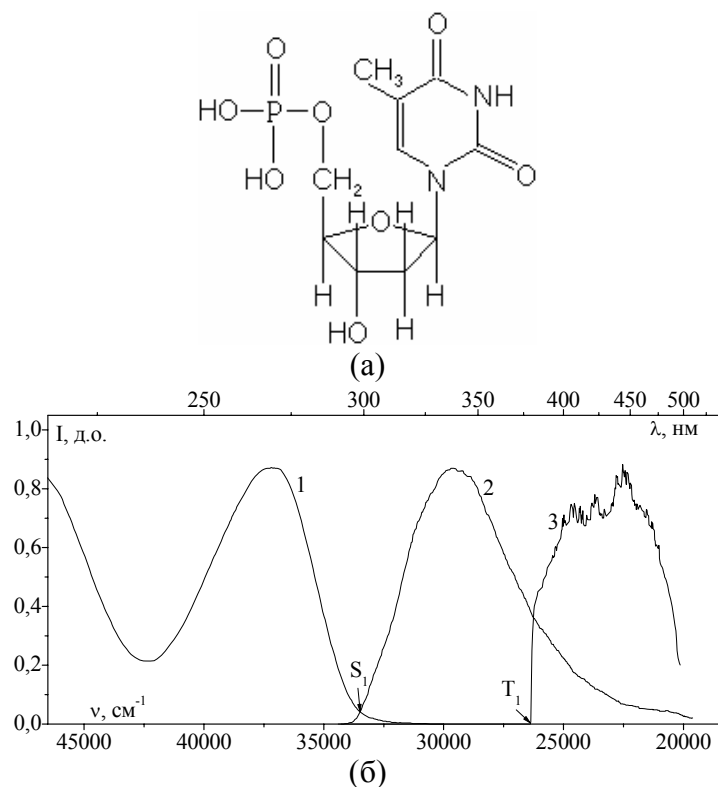


Рис.7. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) дТМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція ($\times 50$) (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

На перший погляд здається, що короткохвильовий край спектра фосфоресценції дАМФ зсунутий в бік менших довжин хвиль, ніж короткохвильовий край спектра фосфоресценції дТМФ, як це стверджується, наприклад, в [22]. Однак, детальне вивчення короткохвильових країв спектрів фосфоресценції (рис.8) дає підставу стверджувати, що короткохвильовий край спектра фосфоресценції дАМФ є більш довгохвильовим, ніж відповідний край у дТМФ. А це, в свою чергу, означає, що перший збуджений триплетний рівень дАМФ є найнижчим у порівнянні з іншими

базами (при визначенні даного рівня за вищевказаним методом (рис.9).

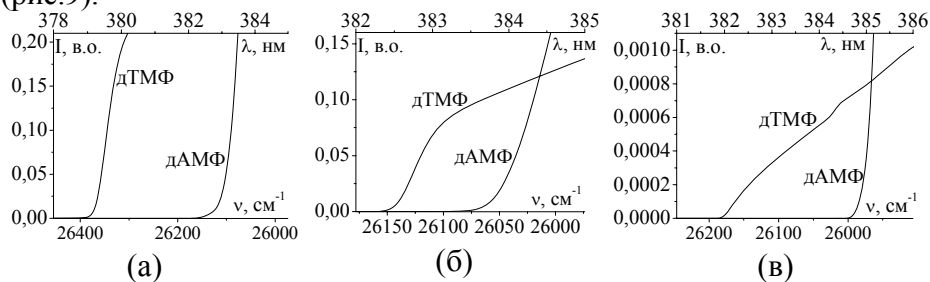


Рис.8. Короткохвильові "хвости" спектрів фосфоресценції нуклеотидів: дАМФ та дТМФ при (а) $T=4,2$; (б) $T=35$ та (в) $T=77$ К

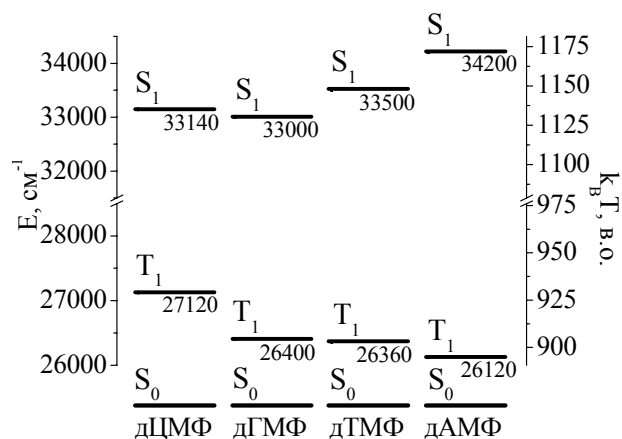


Рис.9. Схема розташування перших збуджених електронних рівнів 5'-монофосфатів дезоксирибонуклеотидів (ланок ДНК) при $T=4,2$ К

Ланками РНК є 5'-монофосфати аденозину (рАМФ, англ. rAMP) (рис.10), гуанозину (рГМФ, англ. rGMP) (рис.11), цитидіну (рЦМФ, англ. rCMP) (рис.12) та уридін (рУМФ, англ. rUMP) (рис.13). Спектральні характеристики рибонуклеотидів, досліджені авторами посібника в роботах [20, 24-25] (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі, флюоресценція та фосфоресценція в температурному діапазоні $T=4.2\div 77$ К), а також їхні хімічні формули представлені на рис.10-13. Схема розташування перших

збуджених синглетних (S_1) та триплетних (T_1) електронних рівнів цих сполук представлена на рис.14. Особливості спектрів поглинання досліджуваних рибонуклеотидів є майже ідентичними до відповідних особливостей дезоксирибонуклеотидів.

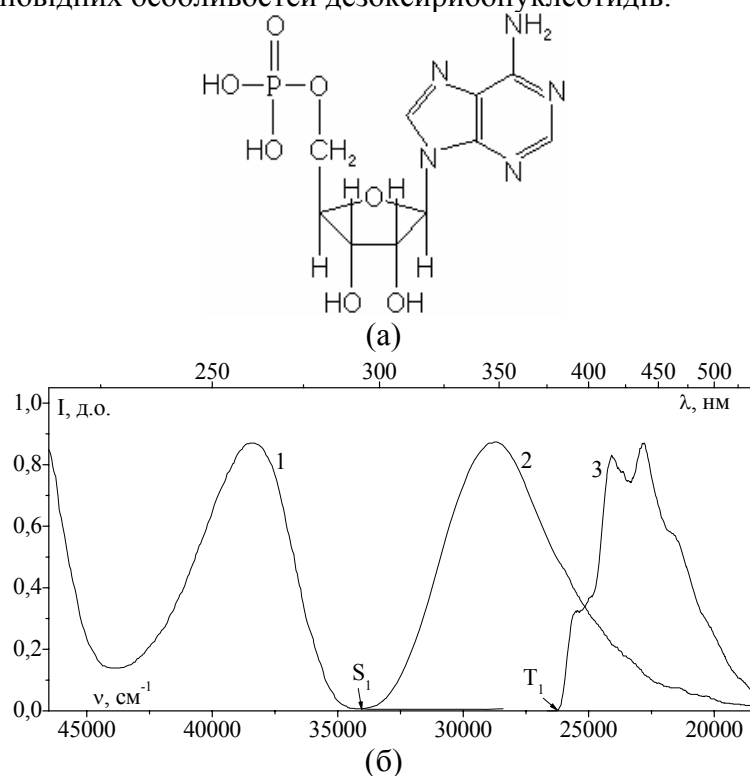


Рис.10. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) рАМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

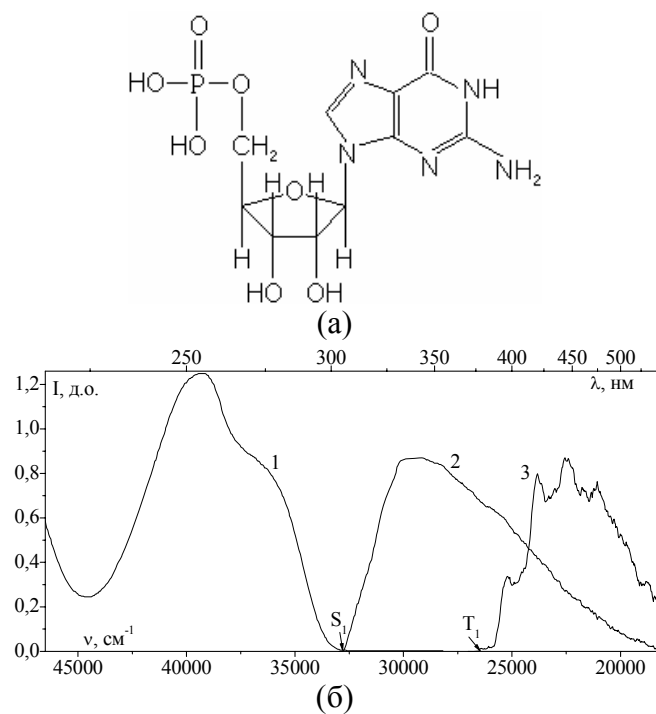


Рис.11. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) рГМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

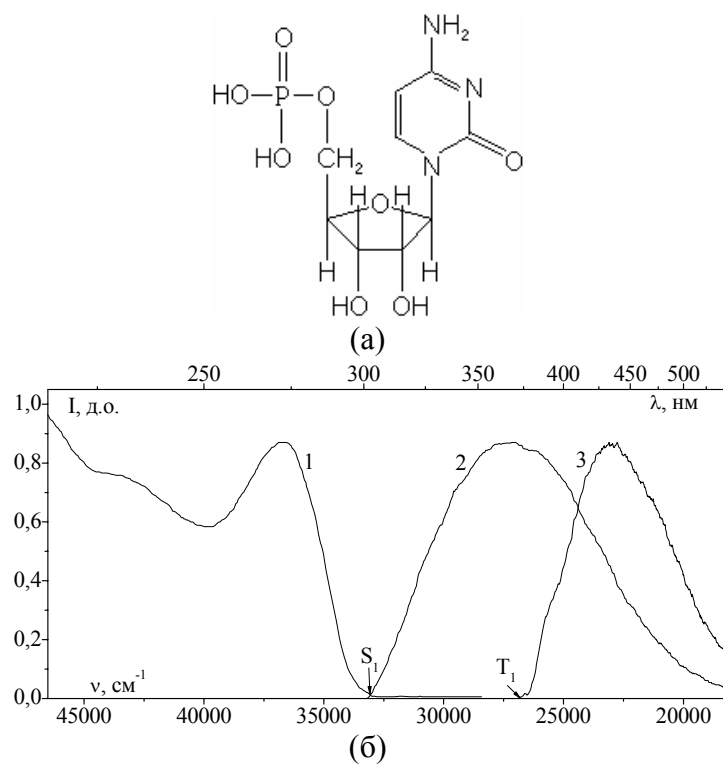


Рис.12. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) рЦМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

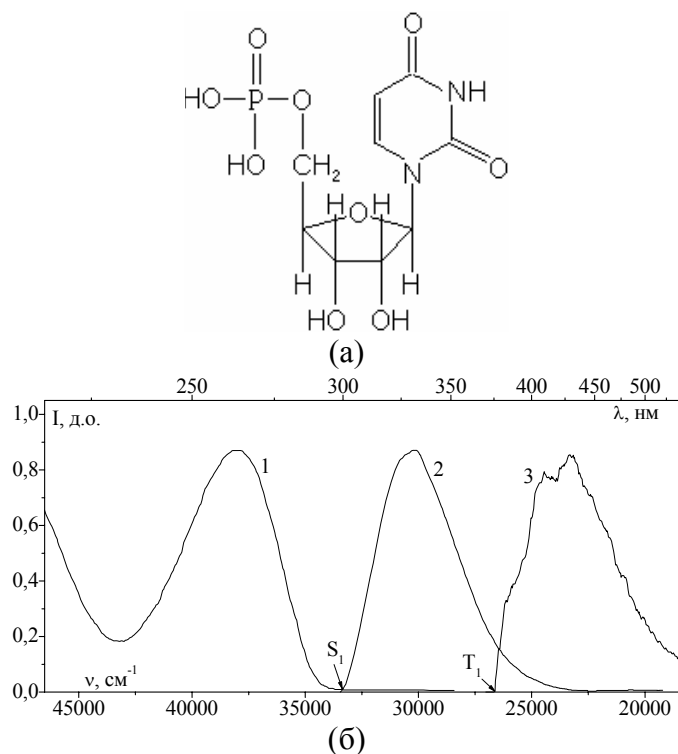


Рис.13. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) рУМФ (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

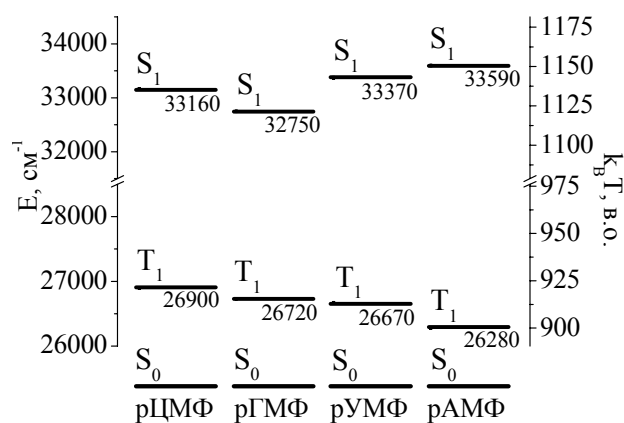


Рис.14. Схема розташування перших збуджених електронних рівнів 5'-монофосфатів рибонуклеотидів (ланок РНК) при $T=4,2\text{K}$

2.1.2. Амінокислоти

Амінокислоти – це органічні сполуки, які містять у своєму складі аміно- ($-\text{NH}_2$) та карбоксильну ($-\text{COOH}$) групи. Амінокислоти є, власне, найменшими фрагментами – ланками макромолекул білків, з'єднані пептидними зв'язками. Макромолекули білків разом з макромолекулами нуклеїнових кислот (ДНК та РНК) є найменшими "будівельними" блоками клітин будь-якого живого створіння. На даний момент відомо 22 амінокислоти, з яких будуються макромолекули білків, і які називають стандартними або протеїногенними амінокислотами. Крім стандартних в живих організмах зустрічаються інші амінокислоти, які можуть виконувати інші функції. Але лише три амінокислоти містять у своєму складі π -електронні групи та, відповідно, мають спектральні (електронні) характеристики у оптичному діапазоні і можуть бути досліджені за допомогою спектральних методів. Цими амінокислотами є фенілаланін (ФА, англ. Phenylalanine, Ph), тирозин (Тир, англ. Tyrosine, Tyr) та триптофан (Трп, англ. Tryptophane, Tr).

Спектральні характеристики π -електрон-містких амінокислот (ФА, Тир та Трп), досліджені авторами посібника в роботах [25,26] (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі, флюоресценція та фосфоресценція в температурному діапазоні $T=4.2\div 77\text{K}$), а також їхні хімічні формули представлені на рис.15-17. Схема розташування S_1 та T_1 рівнів представлена на рис.18.

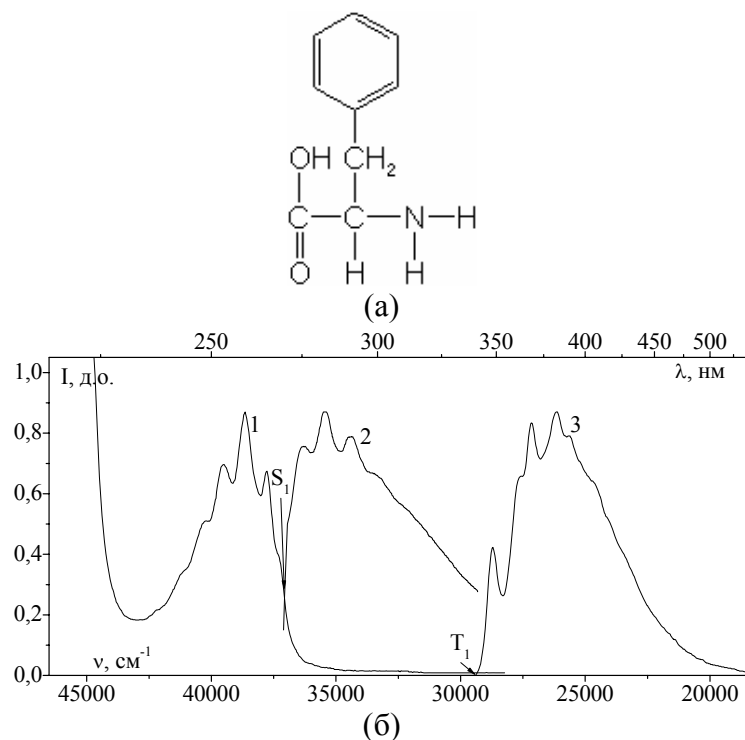


Рис.15. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) ФА (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

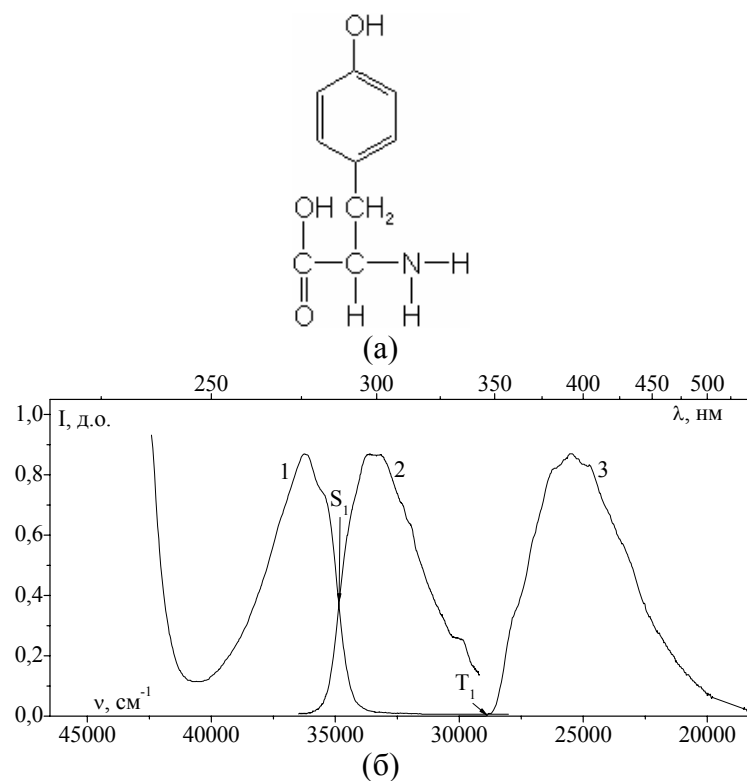


Рис.16. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) Тир (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

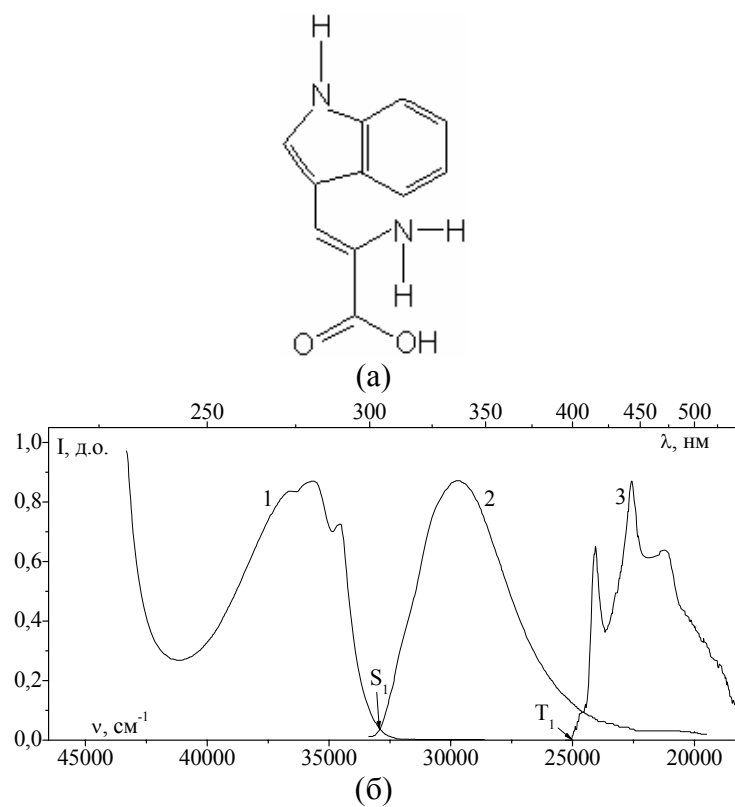


Рис.17. Хімічна формула (а) та оптичні спектри (б) Трп (оптичне поглинання при "кімнатній" температурі (кр.1), флюоресценція (кр.2) та фосфоресценція (кр.3) при $T=4.2\text{K}$)

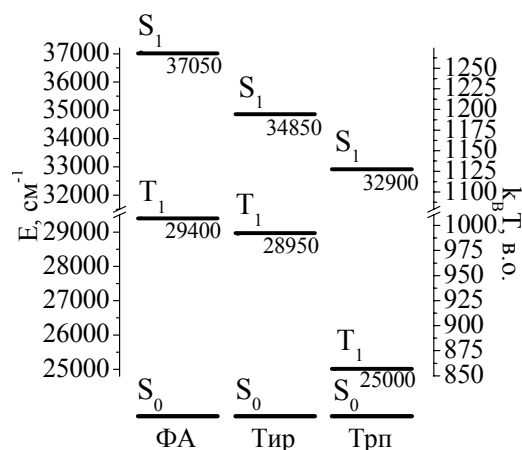


Рис.18. Схема розташування перших збуджених електронних рівнів π -електрон-містких амінокислот при $T=4,2$ К

2.1.3. Модифіковані нуклеотиди

В ДНК деяких вірусів та клітин пухлин одна зі звичайних піримідинових основ може бути заміщена іншою, незвичайною піримідиною основою [12,27]. Наприклад, часто в ДНК клітин ракових пухлин тимін заміщений 5-бромурацилом (рис.19,а). Цей нуклеотид є набагато чутливішим стосовно іонізуючого випромінювання, при цьому така заміна не викликає зміни генетичного коду. В роботі [27] проводились експерименти з опромінення тиміну та 5-бромурацилу пучком електронів. Встановлено, що електрон фактично "вибиває" з молекули тиміну вільний нейтральний радикал водню. На відміну від цього з молекули 5-бромурацилу "вибивається" іон (або атом) бром, який стає легко детектувати оптичними методами. Таким чином, 5-бромурацил можна використовувати як сенсор наявності онкологічних пухлин.

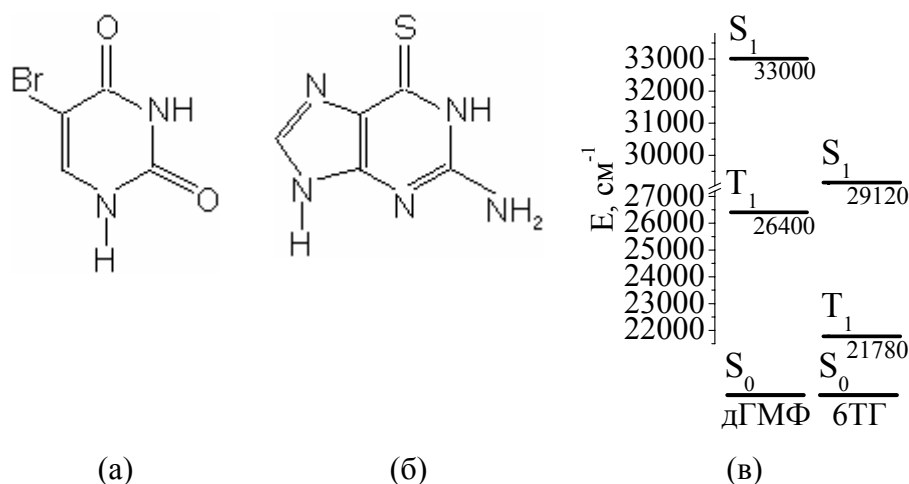


Рис.19. Хімічні формули: (а) бромурацилу, (б) 6ТГ, (в) схема розташування перших збуджених електронних рівнів 6ТГ та дГМФ

Для отримання результуючої довжини вільного пробігу мобільних синглетних або триплетних збуджень вздовж ланцюга макромолекули ДНК часто використовуються модифіковані нуклеотиди. Прикладом такої сполуки може бути нуклеотид на основі 6-тіогуаніну (6ТГ) (рис.19,б), який, за даними роботи [28,29], в основному стані має розподіл зарядів ідентичний гуанінові. Ґрунтуючись на тому, що 6ТГ має значення енергії рівнів S_1 та T_1 значно менші за відповідні значення для дГМФ (рис.19,в), в [28,29] показано, що при відносній молярній концентрації 1 6ТГ до 600 "звичайних" ланок ДНК переважна більшість мобільних триплетних збуджень переноситься до 6ТГ-ланок.

Іншим прикладом сполук вищенаведеного типу є дезокситієногуанозин (дТГ) (рис.20). За даними робіт [30,31], як і у випадку 6ТГ, дТГ має значення енергії рівнів S_1 та T_1 менші за відповідні значення для дГМФ. Це надало можливості авторам використовувати дТГ як флуоресцентну мітку в ДНК вірусу

імунодефіциту людини, а також дослідити зміни спектральної чутливості різних таутомерів дТГ при приєднанні вірусної ДНК до макромолекул деяких білків.

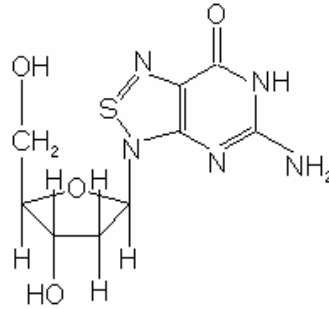


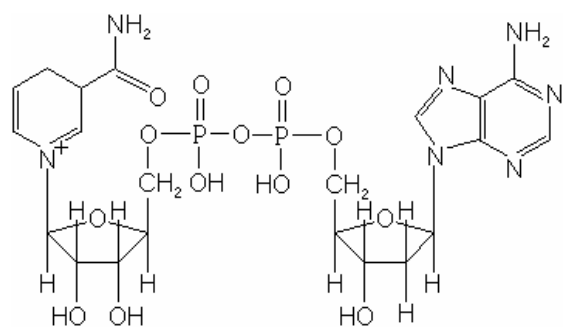
Рис.20. Хімічна формула дТГ

2.1.4. Компоненти ферментів

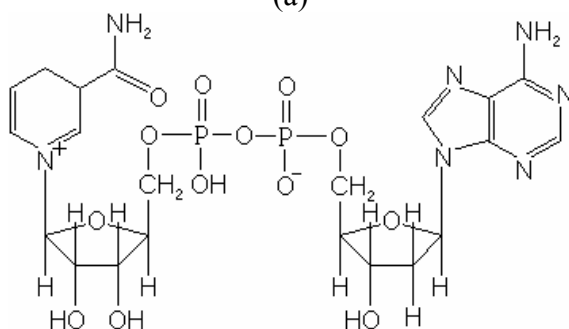
Відомо, що окисно-відновлювальні хімічні реакції є найбільш розповсюдженими реакціями, що відбуваються у будь-якому живому організмі. Основними речовинами, що приймають участь у цих реакціях є оксиредуктази – ферменти, що каталізують реакції окислення та відновлення, тобто перенесення електронів від донора до акцептора. У біологічних об'єктах знайдено біля 500 різних оксиредуктаз [32].

2.1.4.1. Нікотинамідаденіндинуклеотид

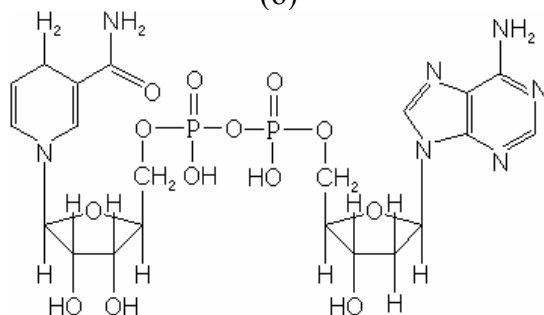
Найбільш розповсюдженими є π -електрон-місткі оксиредуктази, що містять у своєму складі димер нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) (можливими є дві форми – рис.21,а [32] та рис.21,б [33]) та його відновлену форму НАДХ (рис.21,в).



(а)



(б)



(в)

Рис.21. Хімічні формули (а) НАД та двох форм НАДХ (б,в)

НАД/НАДХ – це невелика небілкова (неамінокислотна) молекула, що вільно зв'язується з ферментом, та важлива для його каталітичної активності; за участю коферменту НАДХ каталізуються оборотні реакції окиснення, що відбуваються при

енергетичному обміні та в процесі дихання усіх без винятку живих клітин. Спектри оптичного поглинання другої форми НАД та НАДХ (рис.22) наведені за роботою [33]. Згідно цих даних смуга з максимумом $\lambda=260$ нм в обох сполуках "належить" аденіновій π -електронній групі, смуга з максимумом $\lambda=220$ нм у спектрі НАД "належить" протонованій π -електронній групі нікотинаміду, а широка смуга з максимумом $\lambda=340$ нм у спектрі НАДХ "належить" відновленій π -електронній групі нікотинаміду. Максимум смуги збудження флюоресценції $\lambda_{зб}=360$ нм, максимум смуги випромінювання флюоресценції $\lambda_{фл}=470$ нм.

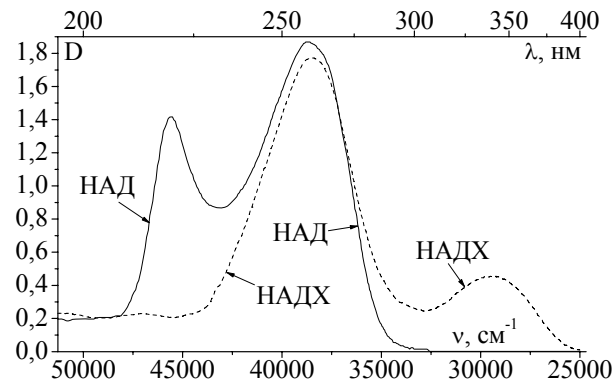


Рис.22. Спектри оптичного поглинання НАД та НАДХ

2.1.4.2. Флавінаденіндинуклеотид

Цей кофермент бере участь у багатьох окисно-відновних біохімічних процесах (максимум смуги збудження флюоресценції $\lambda_{зб}=450$ нм, максимум смуги флюоресценції $\lambda_{фл}=520$ нм).

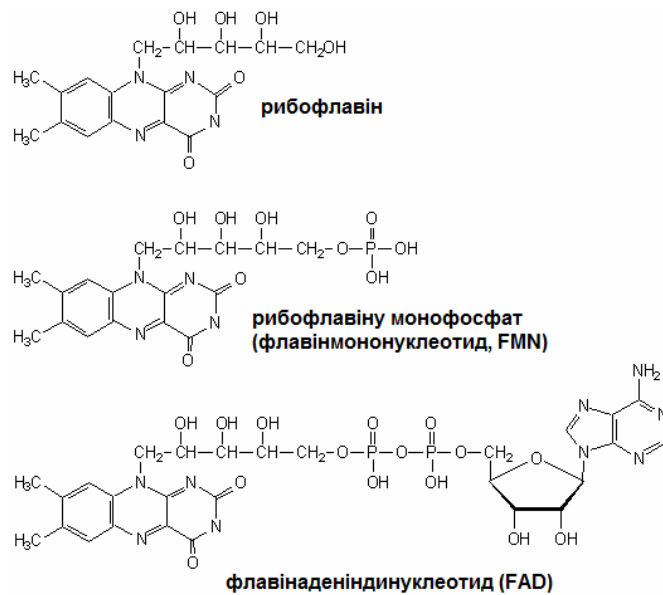


Рис.23. Хімічна формула ФАД та його складових

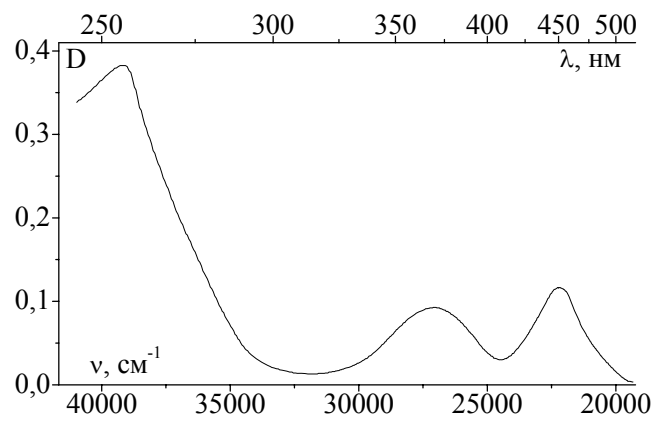


Рис.24. Спектр оптичного поглинання ФАД

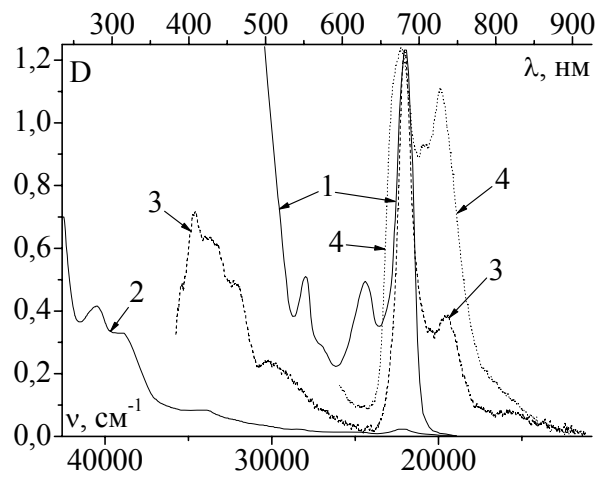


Рис.26. Спектри поглинання (1,2), флюоресценції (3,4) при $T=77\text{K}$ суміші хлорофілів а та b, виділеної з валіснерії (для поглинання концентрації: $C_2=C_1/50$, для флюоресценції довжини хвиль збудження: 3- $\lambda_{36}=337\text{ нм}$ та 4- $\lambda_{36}=448\text{ нм}$)

2. Гем. Гем – ферропротопорфірин – порфіриновий комплекс двовалентного йону заліза, він є небілковою частиною гемоглобіну. Гемоглобін – це комплекс гему з білковим ланцюгом (глобіном), що міститься у крові та м’язах хребетних тварин і бере участь у багатьох процесах, зокрема, переносі вуглекислого газу від тканин назад до легень [34].

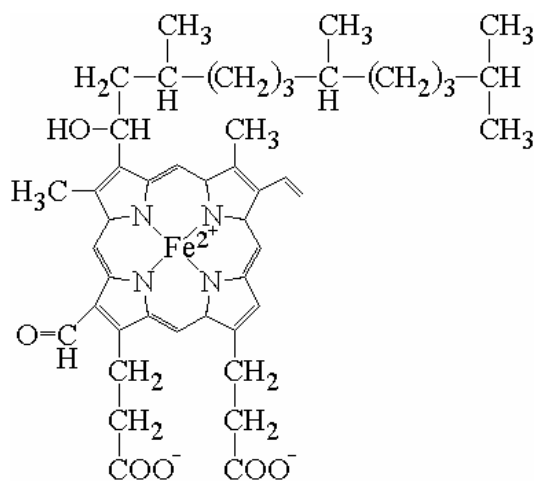


Рис.27. Хімічна формула гему

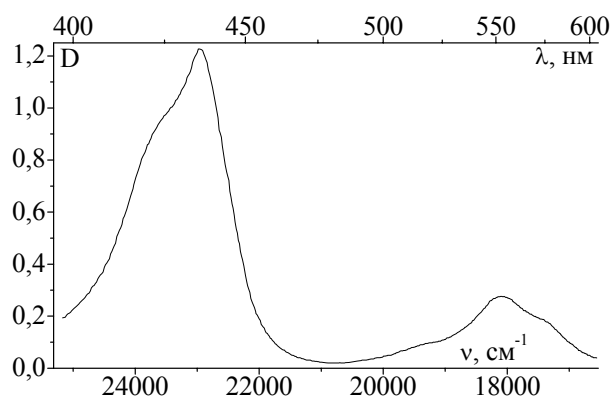


Рис.28. Спектр поглинання гемоглобіну

2.2. Біополімери

До біологічних π -електрон-містких полімерів належать макромолекули нуклеїнових кислот (ДНК та РНК), високомолекулярних білків (людський альбумін, інтерферон, імуноглобулін) та меланін (спектральні властивості цього білка

буде подано у підрозділі 3.5). Саме завдяки наявності у складі цих біополімерів π -електронних груп, спектральні властивості яких наведено у попередніх параграфах, існує можливість дослідження електронно-коливальних процесів у цих макромолекулах із застосуванням методів оптичної спектроскопії.

2.2.1. ДНК

Спектральні характеристики макромолекули ДНК досліджені авторами посібника в роботах [14-20,35].

1. Поглинання ДНК. Спектри оптичного поглинання макромолекули ДНК та блок-кополімерного олігонуклеотида д(ЦЦЦГГГТТТААА) (спеціально синтезованого для дослідження природи поглинаючих та випромінюючих центрів та динаміки електронних збуджень у ДНК) представлені на рис.29. Показано, що поглинаючими центрами в цих сполуках є базові групи: крива спектру оптичного поглинання ДНК близька до адитивної суми основних груп (дГМФ, дЦМФ, дТМФ та дАМФ). Це означає, що нуклеотиди є практично незалежними поглинаючими центрами в макромолекулі ДНК (що, як показано в [8,9,36-38], є типовим для неспряжених π -електрон-містких макромолекул) і, отже, електронні процеси в цій важливій макромолекулі починаються з окремих початково збуджених базових груп [14]. Існує думка, що невеличке уширення смуги спектру поглинання біомакромолекул пов'язане зі змішуванням $S_0 \rightarrow S_1$ та $S_0 \rightarrow S_2$ переходів аденінової бази з $S_0 \rightarrow S_1$ переходом тимінової бази при дипольній взаємодії аденінової та тимінової хромофор із різних ланцюгів ДНК [39].

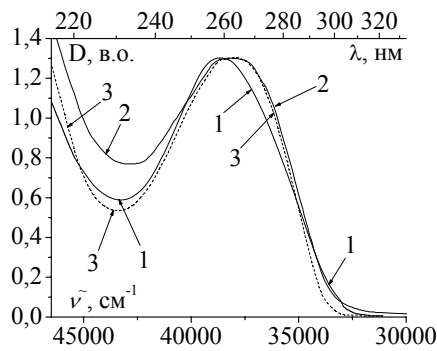


Рис.29. Спектр поглинання ДНК (1), д(ЦЦЦГГГТТТААА) (2) та проноормована сума (у еквімолярних концентраціях) спектрів поглинання модельних сполук дГМФ, дЦМФ, дТМФ та дАМФ (3)

2. Флюоресценція ДНК. У чистій ДНК або РНК гуанінові (Г) ланки, що мають найменшу енергію синглетного рівня, можуть бути пастками синглетних збуджень. Відповідне значення енергії цитидінових (Ц) ланок дуже близьке до гуанінових (в межах $k_B T$). За нашими даними, переважна більшість синглетних збуджень в чистій ДНК дезактивується з окремих Г- та Ц-ланок. Дійсно, спектр флюоресценції ДНК (а також д(ЦЦЦГГГТТТААА)) в межах експериментальних похибок близький до лінійної комбінації (з урахуванням закону розподілу Больцмана) спектрів флюоресценції дГМФ та дЦМФ (рис.30). Однак, існує версія [40], що між Г- та Ц-ланками може формуватися ексіплекс. Проте, наші дослідження не підтверджують цю версію. Форми спектрів флюоресценції ДНК, отриманих при 77К та 4,2К, дуже близькі між собою (а також в межах ± 10 нм до таких, що отримані в [41] при температурі навколишнього середовища), що не є типовим для ексіплексоутворення. Не спостерігалось також жодних істотних змін (в межах похибки експерименту) спектральних позицій і форм спектрів флюоресценції при варіюванні довжини хвилі збудження, що також свідчить про відсутність ексіплексів.

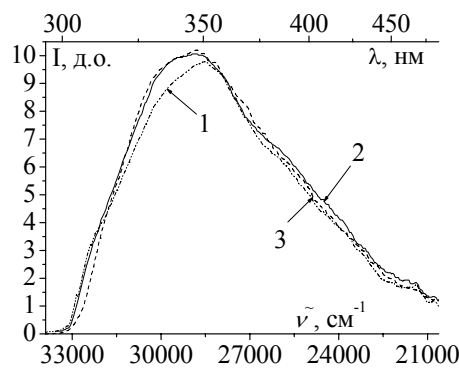


Рис.30. Спектр флюоресценції ДНК (1), д(ЦЦЦГГГТТТААА) (2) та комбінація спектрів флюоресценції модельних сполук дГМФ та дЦМФ (3) при $T=4,2$ К при збудженні $\lambda=260$ нм

3. Фосфоресценція ДНК. Як впливає зі схеми розташування енергетичних рівнів (рис.9), мобільні триплетні збудження в макромлекулі ДНК повинні локалізуватися на аденінових ланках, що, у свою чергу, повинно результуватися у аденіновій фосфоресценції з чітко структурованим спектром. Але насправді це не так. "Чиста" ДНК демонструє спектр фосфоресценції із широкою безструктурною смугою з максимумом біля 450 нм. Використовуючи низку синтетичних оліго- та полінуклеотидів (димер д(АТ), тример д(АТЦ), блок-кополімерний додекамер д(ЦЦЦГГГТТТТААА) та дволанцюговий полімер полі(дАдТ)₂, (подібні сполуки досліджувалися у роботі [42]) встановлено, що за фосфоресценцію ДНК відповідає "ексиплексо-подібний" комплекс, що утворюється між сусідніми аденіновими (А) та тиміновими (Т) ланками, оскільки криві спектрів фосфоресценції ДНК та цих сполук у межах експериментальних похибок практично співпадають (рис.31). Наші подальші дослідження [35,43,44] засвідчили, що цей комплекс, сформований між сусідніми

аденіною (А) та тиміною (Т) хромофорами з одного і того ж ланцюга (але не між відповідними комплементарними хромофорами різних ланцюгів). Крім того, цей комплекс не є точно ексіплексом, оскільки при переході в температурі досліджень від 77К до 4,2К не відбувається істотних змін у спектрі фосфоресценції ДНК, що не є типовим для ексимеро- або ексіплексо-утворення [45].

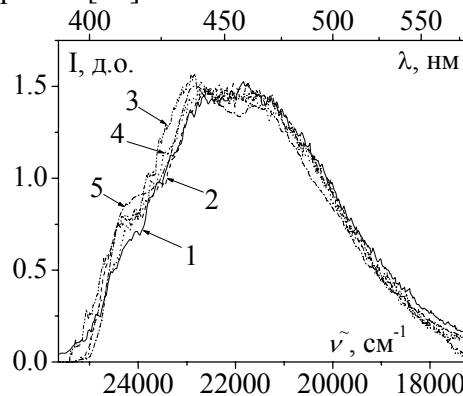


Рис.31. Спектри фосфоресценції ДНК (1), д(ЦЦЦГГГТТТААА) (2), полі(дАдТ)₂ (3), д(АТЦ) (4) та д(АТ) (5) при збудженні $\lambda=300$ нм при $T=4,2$ К

Таким чином, фотофізичні процеси в макромолекулі ДНК відбуваються за схемою, зображеною на рис.32.



Рис.32. Схема фотофізичних процесів в макромолекулі ДНК

4. Перенесення синглетних збуджень в макромолекулі ДНК. Оцінити відстань між точками генерації мобільних синглетних збуджень в ланцюгу ДНК та точкою їх захоплення можна, детектуючи захоплення цих збуджень додатковими пастками за допомогою люмінесцентних вимірювань [35]. Для цього було використано барвник S-01 (рис.33), що має велику ймовірність інтерналізації та слабе поглинання (у порівнянні з ДНК) в області 260 нм (рис.34) [46]. При варіюванні концентрації барвника потрібно було знайти таке значення, при якому середня відстань між інтерналізованими барвниками дорівнювала б середній довжині результуючого пробігу синглетних збуджень l_s в макромолекулі ДНК. Отримано, що значення l_s не повинно перевищувати довжину послідовності 10 пар баз уздовж ланцюга ДНК [46]. Цей результат узгоджується з отриманим в [47,48] для синтетичних олігонуклеотидів.

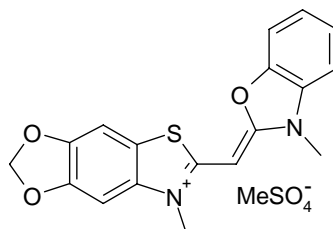


Рис.33. The chemical structure of S-01

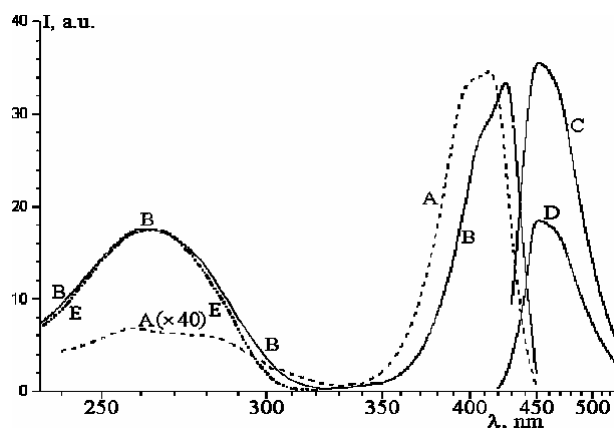


Рис.34. Спектри збудження флюоресценції: А – вільного S-01, В – S-01 у присутності ДНК (для обох випромінювання – 460 нм); С та D – Спектри випромінювання флюоресценції S-01 у присутності ДНК (збудження 425 нм та 260 нм, відповідно); Е – спектр поглинання ДНК

5. Перенесення триплетних збуджень в макромолекулі ДНК. Оцінка середньої довжини результуючого пробігу триплетних збуджень в ДНК та РНК була зроблена з використанням «малої» молекули (інтеркалюючого барвника) з потрібним розташуванням синглетних та триплетних рівнів. У випадку ДНК – це барвник DBos-30 (формулу якого буде наведено у підрозділі 4.2) [49-51].

Основними проявами перенесення триплетних збуджень в ДНК є:

- 1) фосфоресценція ДНК гаситься інтеркальованими барвниками;
- 2) поява фосфоресценції барвників при збудженні у смугу поглинання ДНК;
- 3) поява затриманої флюоресценції барвника (як результат

триплет-триплетної анігіляції).

Одна із «прямих» методик знаходження довжини результуючого пробігу триплетних збуджень (яка була підтверджена в [8,9,16,37,49,52] та іншими відомими експертами у галузі фотоніки органічних середовищ, див., наприклад, [4]) полягає в отриманні критичної концентрації екситонних пасток, коли інтенсивність їхнього випромінювання надалі не зростатиме при збільшенні концентрації цих пасток. Це означає, що середня відстань між двома сусідніми екситонними пастками (молекулярними домішками) стає порівняною з результуючим переміщенням мобільних збуджень.

Домінування випромінювання АТ- пастки в ДНК (а також низці оліго- та полінуклеотидів) [14-20,35,43,44] означає, що всі триплетні збудження захоплюються саме цими пастками. З іншого боку, це означає, що середня результуюча довжина пробігу мобільних збуджень в макромолекулі ДНК більша або рівна відстані між сусідніми АТ-послідовностями. Для ДНК курчати (яка досліджувалась в [16]) ця довжина становить приблизно 16 довжин пар послідовностей. Таким чином, середнє зміщення триплетних збуджень в цьому типі ДНК близьке до даної довжині. В роботі [49] ми оцінюємо це значення, використовуючи спеціально розроблені інтеркалюючі молекули DBos-30 (рис.35).

Цей барвник був обраний через його дуже слабе поглинання в області поглинання ДНК (260 нм), високу ефективність інтеркаляції [49] і відповідні місця розташування енергетичних рівнів для передачі енергії від ДНК до цього барвника. Оптичне поглинання, флюоресценція, фосфоресценція і затримана флюоресценція (в результаті триплет-триплетної анігіляції) з

DBos-30 наведені в рис.35-36 [49].

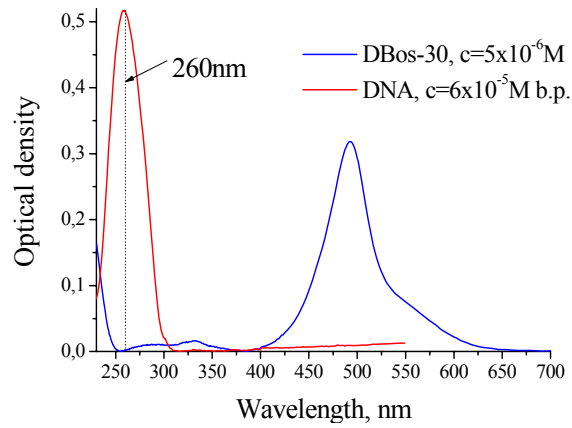


Рис.35. Спектр поглинання розчину барвника Dbos-30 та ДНК у дистильованій воді (b.p. – пари баз)

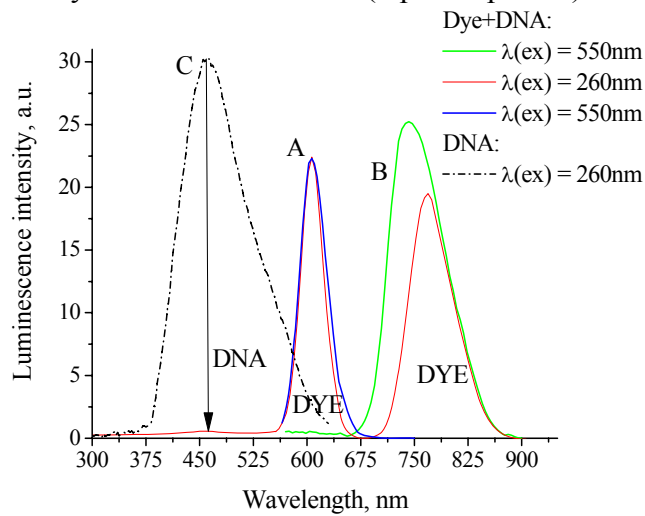


Рис.36. Спектр люмінесценції розчину барвника Dbos-30 в присутності ДНК при $T=77\text{K}$. Червона крива: А – смуга, пов'язана із затриманою флюоресценцією барвника, В – смуга фосфоресценції барвника. Синя крива: нормований спектр флюоресценції розчину барвник-ДНК зі збудженням на довжині хвилі, де поглинає барвник. Зелена крива: фосфоресценція барвника з тією самою довжиною хвилі збудження. Чорна крива: С – фосфоресценція ДНК без барвника

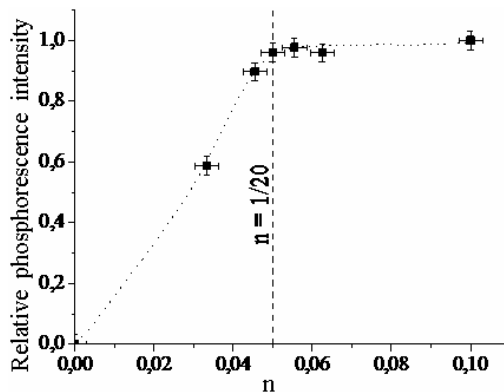


Рис.37. Залежність відносної інтенсивності фосфоресценції барвника Dbos-30 в комплексі з ДНК від співвідношення кількості хромофорів барвника до числа пар основ ДНК n (довжина хвилі збудження 260 нм; $T=77K$)

Із залежності інтенсивності фосфоресценції від відносної концентрації інтеркальованих DBos-30 молекул, було отримане результуюче середнє зміщення триплетних збуджень в ДНК (рис.37). Це $l_t \approx 20$ BPSL. Насичення даної залежності відбувається при співвідношенні $n=1/20$. Це означає, що в даному випадку, середня відстань між двома сусідніми пастками (молекулами інтеркальованого барвника) стає порівняною із середньою результуючою довжиною шляху міграції триплетних збуджень у макромолекулі ДНК. Отже, значення $l_t \approx 20$ для ДНК, що узгоджується з нашими попередніми результатами 16 BPSL [17] і отриманими в [53].

Слід зазначити, що в [49] спостерігалась триплет-триплетна (t-t) анігіляція всередині ДНК, яка призводить до затриманої флюоресценції (рис.36) інтеркальованих барвників. Додаткове підтвердження походження цієї затриманої флюоресценції є

квадратична залежність інтенсивності затриманої флюоресценції від інтенсивності збудження (рис.38), що характерно для t-t-анігіляційних процесів в органічних полімерах [9]. Слід зазначити, що ці результати були отримані вперше.

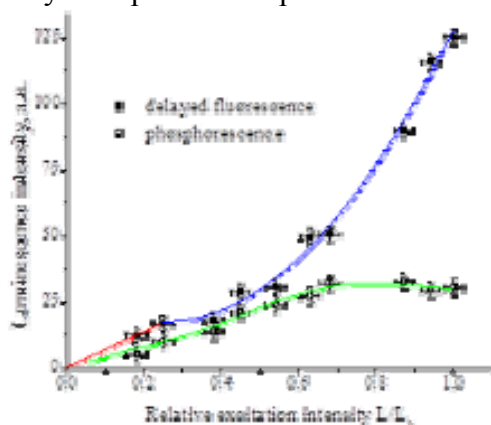


Рис.38. Залежність інтенсивності люмінесценції комплексу барвник-ДНК від інтенсивності збудження: замальовані квадрати – затримана флюоресценція, пусті квадрати – фосфоресценція (довжина хвилі збудження 260 нм; відношення кількості молекул барвника до пар основ ДНК 1:10)

2.2.2. РНК

Спектральні характеристики макромолекули РНК досліджені авторами посібника в роботах [19,20,24,35,54].

1. Поглинання РНК. Спектри оптичного поглинання макромолекули РНК представлені на рис.39. Так само, як і для ДНК крива спектру оптичного поглинання макромолекули РНК близька до адитивної суми основних груп (рГМФ, рЦМФ, рУМФ та рАМФ). Це означає, що нуклеотиди є практично незалежними поглинаючими центрами в макромолекулі РНК.

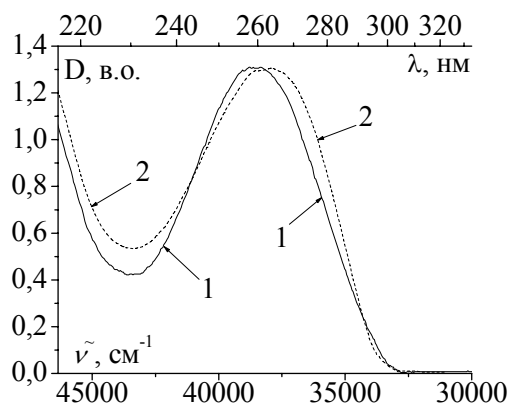


Рис.39. Спектр поглинання РНК (1) та пронормована сума (у еквімолярних концентраціях) спектрів поглинання модельних сполук рГМФ, рЦМФ, рУМФ та рАМФ (2)

2.Флюоресценція РНК. Як і в ДНК, за нашими даними, переважна більшість синглетних збуджень в РНК дезактивується з окремих Г- та Ц-ланок. Дійсно, спектр флюоресценції РНК в межах експериментальних похибок близький до лінійної комбінації (з урахуванням закону розподілу Больцмана) спектрів флюоресценції рГМФ та рЦМФ (рис.40).

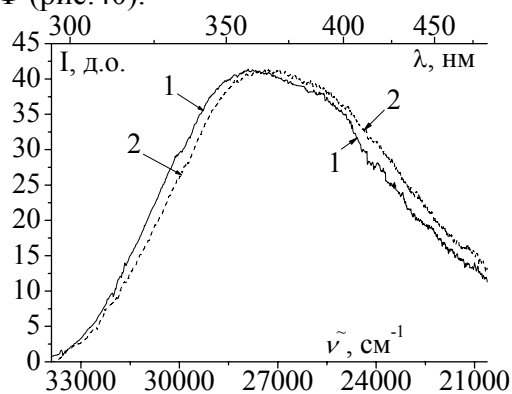


Рис.40. Спектр флюоресценції РНК (1) та комбінація спектрів флюоресценції модельних сполук рГМФ та рЦМФ (2) при $T=4,2$ К при збудженні $\lambda=260$ нм

3.Фосфоресценція РНК. На підставі наведених вище міркувань, можна припустити, що в макромолекулі РНК (що за хімічною і частково енергетичною структурою схожа з ДНК) повинні утворюватися комплекси, схожі на АТ. З метою перевірки цієї версії були досліджені спектри фосфоресценції макромолекул РНК різного походження (т-РНК та оліго-РНК, що містить 25 ланок), тримера 2'5'А₃ (в якому нуклеотиди аденозину пов'язані "неприродним" способом в позиції 5' і 2' та який є "основою" низки противірусних ліків), додекануклеотиду д(АААААААААААА), одноланцюгового полімеру полі(рАрУ) (рис.41) та окремих рибонуклеотидів. Невелика відмінність (в межах 5 нм – в межах експериментальних похибок) основних максимумів електронно-коливальної структури спектрів низькомолекулярних сполук по відношенню до оліго- / полімерів може бути пов'язане із жорсткою фіксацією ланок з боку сусідів і, отже, із зміною числа ступенів вільності. Порівняння спектрів фосфоресценції усіх цих сполук (рис.42) вказує, що основними пастками триплетних збуджень є аденінові групи. У деяких випадках (наприклад, т-РНК) проявляються центри невідомої природи з безструктурною довгохвильовою фосфоресценцією (~ 470 нм). Природа цієї смуги наразі ще досліджується.

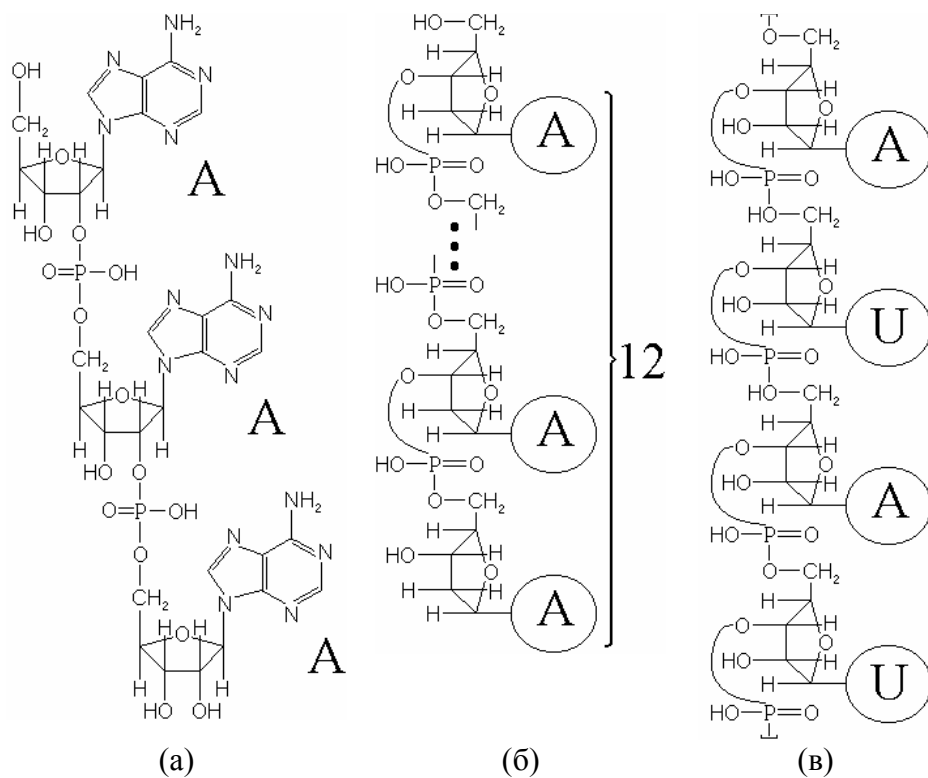


Рис.41. Структурні хімічні формули 2'5'A₃ (а),
д(AAAAAAAAAA) (б) полі(рАрУ) (в)

Таким чином, локалізація триплетних збуджень в макромолекулі РНК відбувається за схемою, наведеною на рис.14, з подальшою дезактивацією з аденінових ланок (на відміну від ДНК).

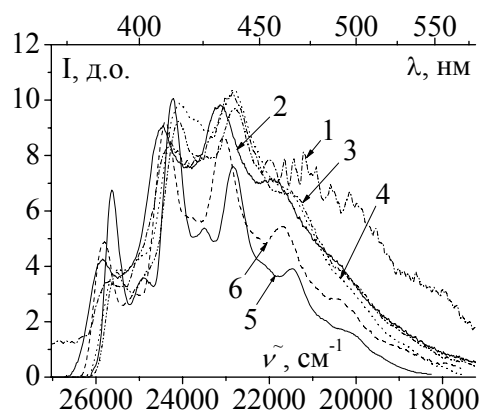


Рис.42. Спектри фосфоресценції тРНК (1), оліго-РНК (2), 2'5'A₃ (3), рАМФ (4), д(AAAAAAAAAAAAAA) (5) та полі(рАрУ) (6) при збудженні $\lambda=300$ нм при $T=4,2$ К

4. Перенесення синглетних збуджень в макромолекулі РНК. Для РНК ми також спостерігали синглетне перенесення енергії електронного збудження і оцінили отриману довжину поширення синглетних збуджень з використанням інтеркалюючих молекул Суап-40 (рис.43) як пасток для синглетних екситонів [52]. Зверніть увагу, що раніше [55] ми використовували цей барвник для флюоресцентної візуалізації РНК в ядрах живих клітин.

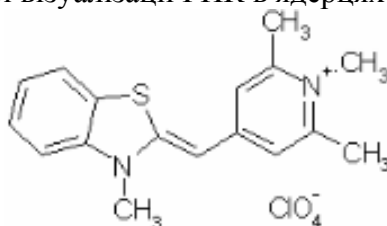


Рис.43. Структурна формула Суап-40

На рис.44 зображені спектри оптичного поглинання та флюоресценції РНК та РНК з інтеркальованим барвником Суап-40. Основні підтвердження перенесення синглетних збуджень у РНК:

- а) Гасіння флюоресценції РНК при додаванні пасток-

барвників у співвідношенні n (кількість РНК баз на одну молекулу Суан-40) $n=5:1$, $10:1$, $15:1$ (збудження в максимум поглинання РНК). Коли $n=30:1$ ефект гасіння значно зменшується, і власна флюоресценція РНК знов з'являється. З цих даних випливає, що переміщення синглетних мобільних збуджень менше, ніж довжина послідовності 30 баз РНК.

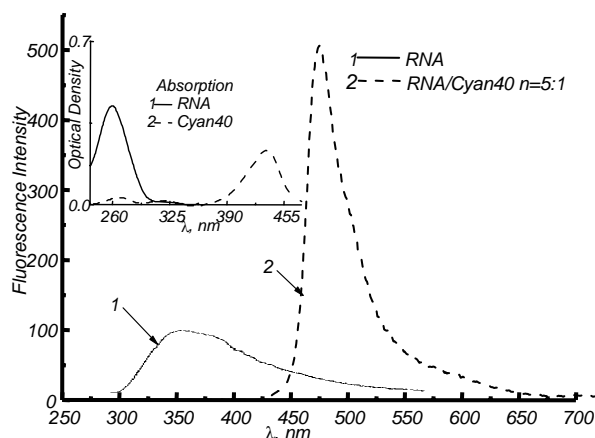


Рис.44. Спектр флюоресценції РНК (1) та РНК/Суан-40 ($n=5:1$) (2) при $T=78\text{K}$, $\lambda_{36}=260\text{nm}$. Примітка: спектри поглинання водних розчинів РНК ($6 \cdot 10^{-5}\text{M}$) та Суан-40 ($1,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$)

б) Деполяризація флюоресценції домішки (Суан-40) при збудженні в смугу поглинання РНК. При збудженні на довжині хвилі 435 нм (максимум поглинання Суан-40), де РНК не поглинає (для поглинання дивись вставку на рис.44), значення анізотропії флюоресценції близько 0.2 для $n=5:1$, $10:1$, $15:1$, $30:1$. При збудженні у максимум поглинання РНК спостерігалось зменшення значення анізотропії флюоресценції барвника до 0.05 ($n=5:1$, $10:1$, $15:1$) та 0.15 ($n=30:1$), що доводить існування внутрішньомолекулярного синглетного перенесення енергії електронних збуджень в РНК.

Таким чином, ці дані (a,b) дають можливість оцінити середнє зміщення (в одиницях довжини послідовностей баз - base sequence length – BSL) синглетних мобільних збуджень вздовж РНК в такому діапазоні : $15 \text{ BSL} < l_s < 30 \text{ BSL}$.

5. Перенесення триплетних збуджень в макромолекулі РНК. Для вивчення перенесення триплетних збуджень в РНК також був використаний барвник Cyan-40 (рис.43) з відповідним триплетним енергетичним рівнем та інтеркалюючими властивостями [52]. Доказами внутрішньомолекулярного триплетного перенесення енергії в РНК є:

a) гасіння фосфоресценції РНК в присутності молекул Cyan-40;

b) поява інтенсивної затриманої флюоресценції Cyan-40 інтеркальованого в РНК та збудженні при 260 нм, відсутністю затриманої флюоресценції Cyan-40 при збудженні на 435 нм.

Останній факт підтверджує, що в макромолекулі РНК відбувається не тільки процес перенесення триплетних збуджень, але і їх ефективна анігіляція при зустрічі на пастці. Явище t-t-анігіляції, описаної вище, спостерігалось, по-перше, для РНК і мало місце навіть тоді, коли відношення $n = 30: 1$ (рис.45). Тому можна зробити висновок про те, що середнє зміщення мобільного триплетного збудження в РНК перевищує довжину 30 BSL (100Å).

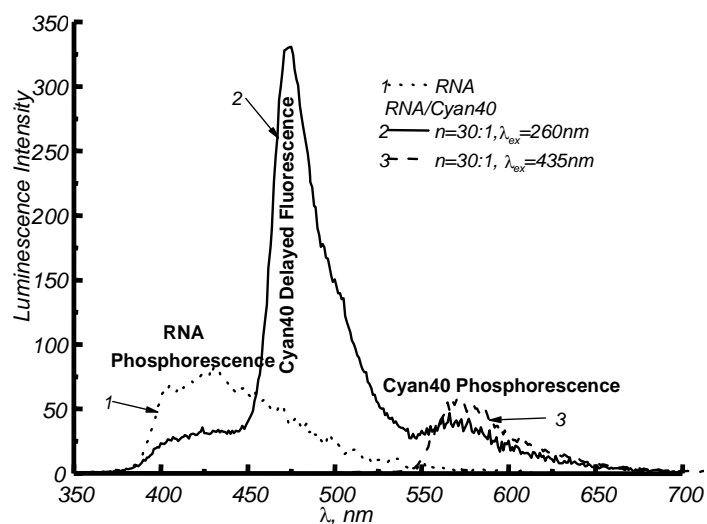


Рис.45. Спектри затриманого випромінювання РНК та суміш РНК і Суан-40 при $T=78K$. Криві: 1- фосфоресценція РНК; 2- затримане випромінювання РНК/Суан-40 (затримана флюоресценція та фосфоресценція), $\lambda_{zb}=260nm$, 3-затримане випромінювання РНК/Суан-40, $\lambda_{zb}=435nm$.

2.2.3. Білки

Спектральні характеристики макромолекул деяких π -електрон-містких білків, а також спектральні прояви їхньої взаємодії з оліго- та полінуклеотидами досліджені авторами посібника в роботах [25,26,56]. В даному підрозділі наведено спектральні характеристики найбільш розповсюджених білків, що входять до клітин людського організму: Людський Альбумін (ЛА), Інтерферон (Інф), Інсулін (Інс). Хімічно-структурні характеристики макромолекул цих білків наведено в табл.1.

Таблиця 1. Хімічно-структурні характеристики π -електрон-містких білків

Білок	Кількість амінокислот (на мономер)	Форма існування*	Молекулярна вага (на мономер, кДа)	Кількість та типи π -амінокислот (на мономер)
Інсулін (Інс)	51	Димер	5	ФА – 3 Тир – 4 Трп – 0 } =7
Інтерферон (Інф)	166	Мономер	20	ФА – 10 Тир – 5 Трп – 2 } =17
Людський Альбумін (ЛА)	585	Мономер	67	ФА – 31 Тир – 18 Трп – 1 } =10

1. Людський Альбумін (ЛА). Унікальність послідовності амінокислот визначає тип білка та його функції в організмі. ЛА є основним білком, що міститься у крові людини, і складається з 585 амінокислот. Причому, до складу кожної макромолекули ЛА входять π -електрон-місткі амінокислоти (табл.1): 1 триптофан (Трп), 31 фенілаланін (ФА) та 18 тирозинів (Тир) [57]. Незважаючи на те, що з усіх π -електрон-містких амінокислот Трп міститься в білках у найменшій кількості, саме він повинен бути відповідальним за локалізацію (з наступною дезактивацією) синглетних і триплетних збуджень у макромолекулах білків (див. схему на Рис.18). Згідно наших даних, енергія, яка поглинається Тир чи ФА, повинна переноситися до Трп. Спектри люмінесценції

* Тут маються на увазі не димер або мономер, що утворюються між окремими π -електронними системами, а подвійний або одинарний полі- або олігомерний ланцюг. Подвійний ланцюг утворюється за рахунок зв'язків, аналогічних зв'язкам у димері між окремими π -електронними системами.

Трп (рис.17) дуже чутливі до зміни його оточуючого середовища. Це дає можливість, слідкуючи за змінами в спектрах люмінесценції, досліджувати зв'язування білків безпосередньо з ДНК/РНК та їх короткими фрагментами [58].

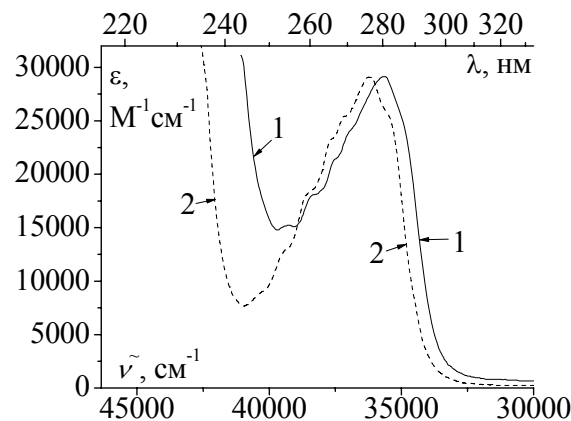


Рис.46. Спектр поглинання ЛА (1) та пронормована лінійна комбінація (у еквімолярних концентраціях та з урахуванням відносної кількості на мономер) спектрів поглинання амінокислот ФА, Тир та Трп (2) (у співвідношенні 1:18:31=Трп:Тир:ФА)

Крива спектру оптичного поглинання макромолекули ЛА (рис.46) є дуже близькою до відповідної кривої лінійної комбінації спектрів поглинання амінокислот (у співвідношенні, в якому вони містяться у складі макромолекули ЛА). Це означає, що (як нуклеотиди в ДНК і РНК) π -електрон-місткі амінокислоти в білках є (майже) незалежними поглинаючими центрами. Невеликий зсув пояснюється можливим існуванням перенесення збуджень у вигляді екситонів.

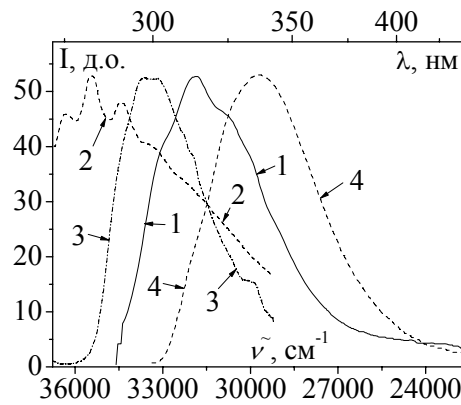


Рис.47. Спектри флюоресценції: ЛА (1), ФА (2), Тир (3) та Трп (4) при $T=4,2$ К (1,2 – при збудженні $\lambda_{36}=260$ нм, 3,4 – $\lambda_{36}=280$ нм)

Спектр флюоресценції ЛА (рис.47) є близьким до лінійної комбінації спектрів випромінювання Трп та Тир (у співвідношенні $\sim 3:2=\text{Трп:Тир}$). Це означає, що, відповідно до схеми рівнів (рис.18), синглетні збудження у макромолекулі ЛА дезактивуються, в основному, з Трп- та Тир-ланок.

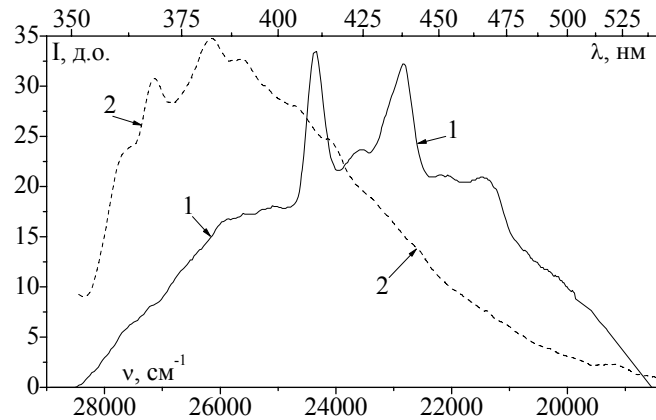


Рис.48. Спектри фосфоресценції ЛА (1) та лінійна комбінація (у еквімолярних концентраціях та з урахуванням відносної кількості на мономер) спектрів фосфоресценції амінокислот ФА, Тир та Трп (2) (у співвідношенні $1:18:31=\text{Трп:Тир:ФА}$) при $T=4,2$ К

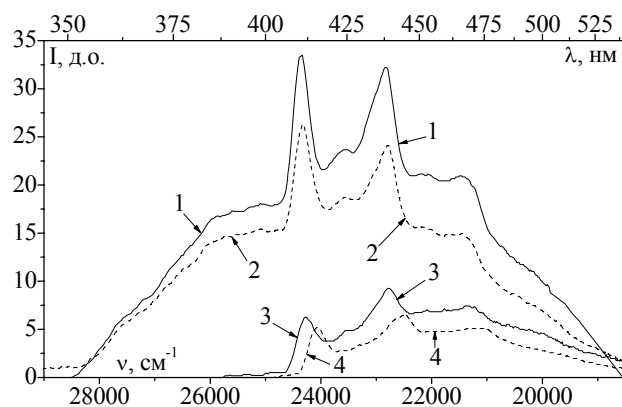


Рис.49. Спектри фосфоресценції: ЛА при збудженні: $\lambda_{36}=260$ нм (1), $\lambda_{36}=280$ нм (2), $\lambda_{36}=300$ нм (2) та Трп при $\lambda_{36}=300$ нм (4) при $T=4,2$ К

Спектр фосфоресценції ЛА (рис.48 та рис.49) не співпадає з лінійною комбінацією спектрів фосфоресценції амінокислот (у співвідношенні $1:18:31=\text{Трп:Тир:ФА}$) (рис.48) і є, практично, випромінюванням Трп-ланки (рис.49) з незначним внеском випромінювання Тир-ланки. Таким чином, в макромолекулі ЛА триплетні збудження локалізуються (та дезактивуються), в основному, з триптофанових груп.

2. Інтерферон (Інф). Інф – білок, що виділяється клітинами організму у відповідь на вторгнення вірусів, деяких паразитів та ракових білків, і відповідно має противірусну, антибластомну, протипухлинну та імуностимулюючу дію. До складу макромолекули Інф входять π -електрон-місткі амінокислоти (табл.1) у такому співвідношенні: $2:5:10=\text{Трп:Тир:ФА}$. Як і у випадку ЛА, крива спектру оптичного поглинання макромолекули Інф є дуже близькою до відповідної кривої лінійної комбінації спектрів поглинання амінокислот (у наведеному співвідношенні).

Це означає, що (як і в ЛА) π -електрон-місткі амінокислоти в Інф є (майже) незалежними поглинаючими центрами. Флюоресценція Інф також пов'язана із комбінацією випромінювання Трп- та Тир-ланок, а фосфоресценція (як і в ЛА) визначається, в основному, випромінюванням Трп-ланки.

3. Інсулін (Інс). Інс – білок, що утворюється у підшлунковій залозі і впливає на обмін речовин практично у всіх тканинах. Недостатність інсуліну є ключовою ланкою до розвитку цукрового діабету. До складу макромолекули Інс входять π -електрон-місткі амінокислоти (табл.1) у такому співвідношенні: 4:3=Тир:ФА. Як і у попередніх випадках в макромолекулі Інс Тир та ФА є (майже) незалежними поглинаючими центрами. На відміну від попередніх досліджених білків, Інс не містить триптофанових ланок. Тому, флюоресценція і фосфоресценція Інс визначається, в основному, випромінюванням тирозинової ланки. Крім Тир у фосфоресценції проявляються центри невідомої природи з безструктурною довгохвильовою фосфоресценцією (~ 430 нм). Оскільки макромолекула Інс має два ланцюги (димер, див. табл.1), цими центрами можуть бути певні комплекси між π -електронними системами з різних ланцюгів. Природа даної смуги наразі ще досліджується.

Розділ 3

Фотохімічні процеси в біологічних об'єктах. Особливості спектральних характеристик

3.1. Вступ

Одним із каналів дезактивації електронно-коливальних збуджень в біологічній системі є ініціювання хімічних реакцій, виникнення і протікання яких вимагає наявності певної енергії активації. Такі реакції називають фотохімічними або фотобіохімічними (рис.50).

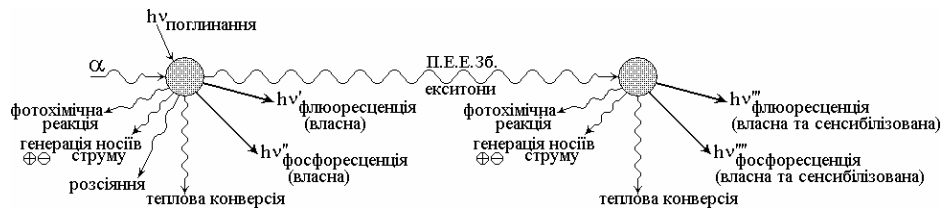


Рис.50. Фотохімічні реакції

Назва "фотохімічна реакція" зумовлена тим, що спочатку цим терміном користувалися для позначення реакцій, що відбуваються під дією світла. На даний час цей термін має більш широкий зміст, оскільки під ним розуміють різновид реакцій, що спричиняється електронно-коливальним збудженням, що може виникнути в околі певної точки за рахунок не лише поглинання фотону, а і, наприклад дії проникаючої радіації, або локалізації екситону.

3.2. Типи фотохімічних реакцій

3.2.1. Фотохімічне розщеплення

Прикладом такого типу реакцій може слугувати фотохімічне розщеплення кетонів і альдегідів, що відносяться до класу

карбонільних (тобто таких, що містять карбонільну $\text{C}=\text{O}$ групу) органічних сполук загальної формули $\text{R}-\text{CO}-\text{H}$ та $\text{R}_1-\text{CO}-\text{R}_2$ відповідно [1]. Кетони і альдегіди поглинають в області близько 300 нм. Це поглинання пов'язане з $\text{n} \rightarrow \pi^*$ переходом, ймовірність якого незначна ($\epsilon \approx 10$). При збудженні світлом один електрон неподіленої р-пари кисню переходить на більш високу розривляючу орбіталь π -електронної системи карбонільної ($\text{C}=\text{O}$) групи, яка перетворюється на бірадикал (рис.51).

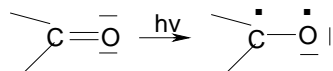


Рис.51. Утворення бірадикалу

Бірадикал, що утворився, може далі реагувати по-різному, наприклад, може розщепитися сусідній з карбонільною групою $\text{C}-\text{C}$ зв'язок (розщеплення типу I за Норишем, рис.52).

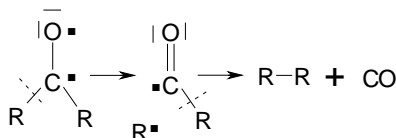


Рис.52. Розщеплення типу II за Норишем

Можуть відбутися і інші реакції: одна із них – внутрішньомолекулярний відрив атома водню (розщеплення типу II за Норишем) [1].

Як приклад фотодеструктивних хімічних реакцій можна вказати також на розриви ниток ДНК та РНК при опроміненні їх в області 200 нм або ж більш високоенергетичними фотонами.

3.2.2. Реакції фотосинтезу

Реакції фотосинтезу – це реакції, в яких під дією світла відбувається синтез складних сполук з більш простих. До таких реакцій належать фотополімеризація, фотоконденсація та більш складні фотохімічні перетворення. В якості елементарних прикладів можна навести процеси фотосинтезу полістиролу, полівінілкарбазолу та подібних вінілових полімерів (рис.53),

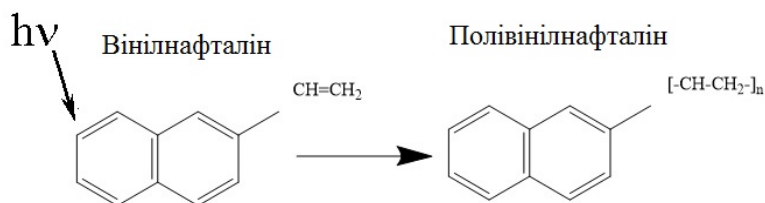


Рис.53. Фотосинтез полімеру

або фотополімеризацію іншого типу мономерів, що застосовується в стоматології.

Як приклад процесу фотодимеризації в біологічних об'єктах можна вказати на утворення димерів тиміну всередині макромолекули ДНК (рис.54) під дією світла в області поглинання тиміну (300 нм).

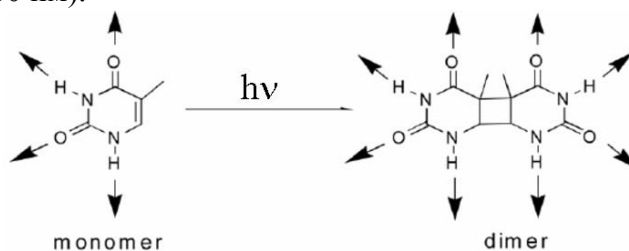


Рис.54. Фотодимеризація тиміну

Зауважимо, що серед продуктів фотохімічного руйнування ДНК відносний кількісний вклад фотодимерів тиміну є найбільш істотний, в той же час вклад фотопродуктів деструкції аденіну є

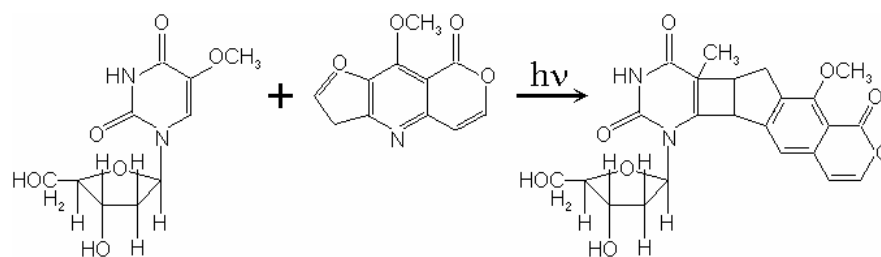
найменшим серед фотопродуктів інших основ ДНК. Подібна властивість фотохімічних перетворень властива і для РНК (лише роль тиміну в цій макромолекулі відіграє урідін).

Процеси фотополімеризації мають місце і в фотосинтезі високомолекулярної фракції досить складного біополімеру меланіну (детальний розгляд утворення меланіну буде подано нижче). Саме фотосинтез високомолекулярних фракцій меланіну спричинює появу еритеми (загару) в білошкірих людей під дією сонячного світла.

Найяскравішим проявом реакцій фотосинтезу є фотосинтез в рослинах – складний комплекс фотофізичних та фотохімічних процесів, результатом яких є створення багатьох типів життєво важливих молекул (розгляд цих процесів буде представлено нижче).

3.2.3. Реакції фотоприсєднання

Фотосенсибілізатор, збуджений поглинутим квантом світла, приєднується ковалентним зв'язком до молекули, що є складовою клітини. Прикладом є реакція між 8-метоксипсораленом (що є фотосенсибілізатором) та тимідіном, що входить до складу ДНК клітини (рис.55) [59]. Така реакція є можливою завдяки тому, що 8-метоксипсорален та тимідін мають близькі часи життя збудженого синглетного стану (у наносекундному діапазоні). Негативним наслідком цієї реакції для людського організму є фототоксичний вплив 8-метоксипсоралену на шкіру людини [60].

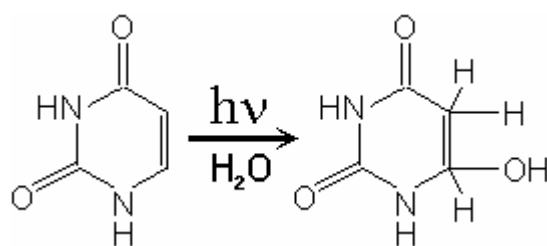


Тимідін в ДНК 8-Метоксипсорален Циклоаддукт

Рис.55. Приклад фотохімічної реакції фотоприєднання

3.2.4. Реакції фотогідратації

Цей тип реакцій (рис.56) є відповідальним за пошкодження ДНК. В цій реакції збуджена молекула (наприклад, урацил) додає молекулу води для створення нового фотопродукту.



Урацил 6-Гідрокси-5-Гідроурацил

Рис.56. Приклад фотохімічної реакції фотогідратації

3.2.5. Реакції фотоізомеризації

В реакціях фотоізомеризації під дією світла відбувається перегрупування атомів в молекулі або ж зміна конформації молекули без зміни складу молекули. Наприклад, молекула антрацену під дією світла може (з певною ймовірністю) трансформуватися в молекулу фенантрена (рис.57).

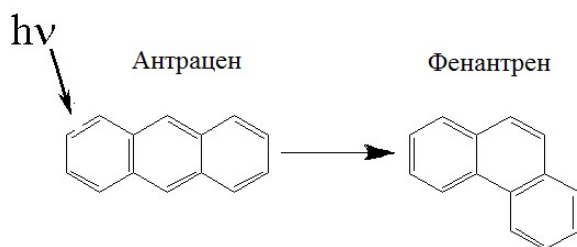


Рис.57. Фотоізомеризація

Цікавим тут є той факт, що таке перегрупування істотно не впливає на положення синглетного рівня молекули (нема значних змін в спектрах поглинання та флюоресценції молекули) в той же час положення триплетного рівня драматично змінюється (положення триплетного рівня антрацену знаходиться в інфрачервоній області, а фенатрену в зеленій області спектру).

Процеси фотоізомеризації спостерігаються також в азосполуках. Для азосполук характерним є низькоенергетичний перехід $n \rightarrow \pi^*$, якому відповідає смуга поглинання близько 350 нм ($\lg \epsilon \approx 1 \div 2$), а у ароматичних близько 450 нм ($\lg \epsilon \approx 3$). Опромінення азосполуки може призвести або до *цис-транс* ізомеризації (рис.58), або до розриву зв'язку C-N.

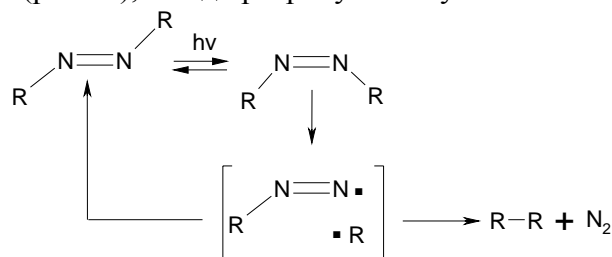


Рис.58. Цис-транс ізомеризація

В живих організмах процеси фото-цис-транс ізомеризації є первинними в реалізації механізму зору. В високоорганізованих істот така реверсивна фотохімічна реакція відбувається в молекулах ретиналю.

3.2.6. Фотоокислення

Істотну роль в життєво важливих процесах, що відбуваються в природі грають реакції фотоокислення. Проміжними у фотоокисленні можуть бути електронні збуджені стани органічних молекул або ж електронні збуджені стани кисню [1, 61-65]. Молекула O_2 має парамагнітний триплетний основний стан. Її збуджені стани $^1\Delta_g$ та $^1\Sigma_g$ мають енергію 7882 см^{-1} та 13121 см^{-1} відповідно [61]. Це дає можливість перенесення енергії триплетного збудження від молекул органічної речовини (з відповідним розташуванням триплетного рівня) до молекули O_2 . Виникнення синглетних молекул кисню, що мають підвищену реакційну здатність, призводить до значного прискорення фотореакцій.

Прикладом реакції фотоокислення є фотоокислення антрацена. Продуктом фотоокислення антраценової групи є антрахінон (рис.59,а); окислення карбазольної групи відбувається за схемою, наведеною на рис.59,б (процес 1). При великих інтенсивностях світла та/або високому тиску повітря, що контактує з органічною речовиною (в даному випадку - карбазолом), можуть окислюватися обидва бензольні кільця (рис.59,б, процес 2). На рис.60 наведено приклад реакції фотоокислення однієї з ланок макромолекули ДНК – дГМФ окислюється і перетворюється на 8-оксо-дГМФ.

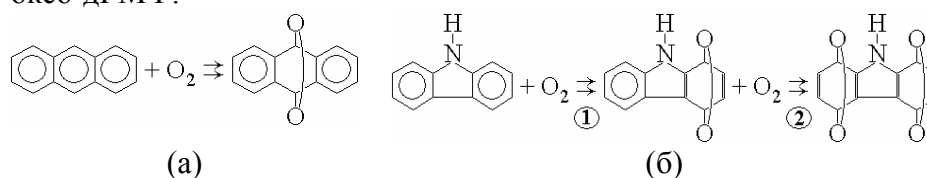


Рис.59. Схема реакції фотоокислення молекул: (а) антрацену та (б) карбазолу



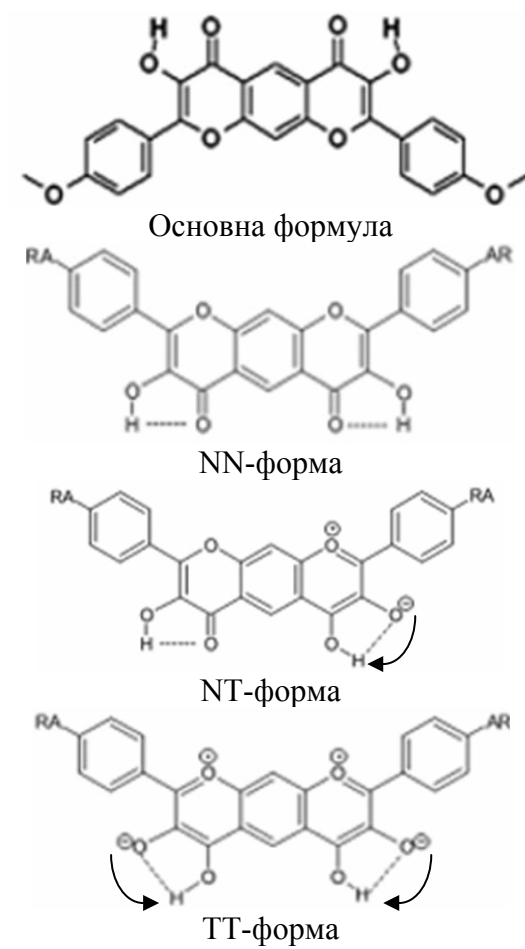


Рис.61. Різні форми сполуки DFOM (клас флавонолів)

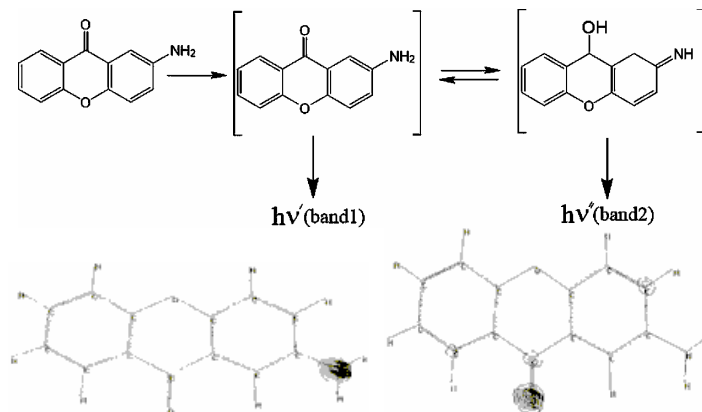


Рис.62. Запропонована схема фотоіндукованого перенесення протону в аміноксантах (вгорі) та перерозподіл електронної густини, що при цьому процесі відбувається (внизу)

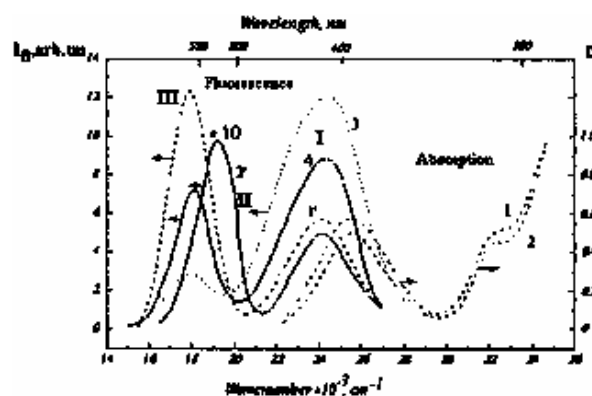


Рис.63. Спектри поглинання (1,2) та флюоресценції (1',2',3,4) 2-аміноксантону. Розчини в діоксані (2,2') та етанолі (1',1',3,4). Концентрації: 1,2,1' – 10^{-4} М; 3 – 10^{-6} М; 4 – 10^{-5} М. T=293K

Інший приклад – фотоіндуковане перенесення електрону від аденінової ланки до сусідньої тимінової в макромолекулах ДНК (рис.64).

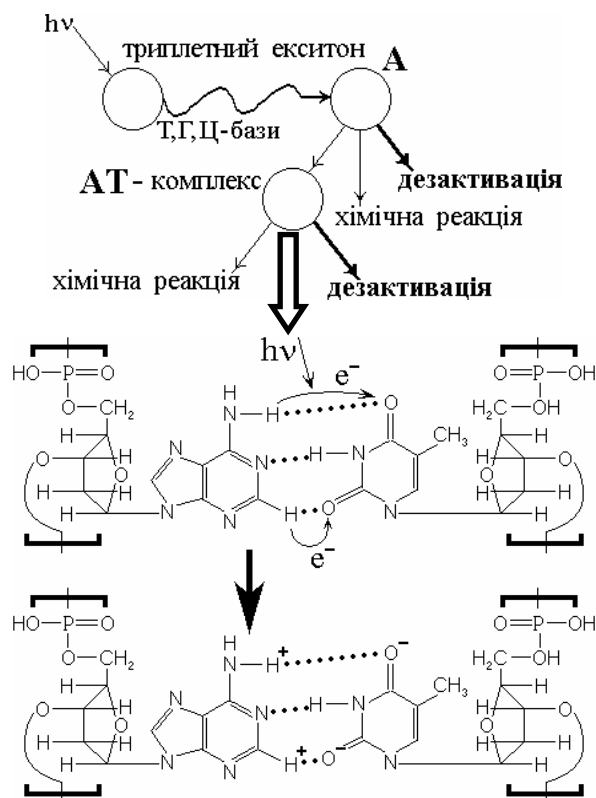


Рис.64. Фотоіндуковане перенесення електрону від А- до Т-ланки ДНК при утворенні АТ-комплексу

Варто зазначити, що таке перенесення в макромолекулі ДНК реально швидше за все спричинюється локалізацією триплетного екситону в ланці ДНК [14-20,35]. Однак, оскільки триплетні екситони виникають в ДНК за рахунок поглинання світла – збудження синглетного стану ланок та подальшої часткової конверсії цього збудження в триплетний стан, даного типу процес називають також фотохімічним.

3.3. Основні параметри та закономірності фотохімічних реакцій. Методи опису та досліджень

3.3.1. Параметри, що характеризують фотохімічні реакції

1. Квантовий вихід фотохімічної реакції. Співвідношення між кількістю молекул фотопродуктів, що утворилися, та кількістю поглинутих квантів визначає *квантовий вихід* γ фотохімічної реакції:

$$\gamma = \frac{\text{Кількість продуктів фотохімічної реакції}}{\text{Кількість поглинутих фотонів}}$$

Обидві величини можна отримати спектральними методами (див., наприклад [1]). Величина квантового виходу ф.х.р дає значення абсолютної імовірності здійснення фотохімічної реакції.

Якщо $\gamma = 1$, то кожен квант, що поглинувся, призводить до здійснення одного акту хімічної реакції.

Якщо $\gamma < 1$, то з основною фотохімічною реакцією конкурують інші хімічні реакції або фізичні процеси.

Якщо $\gamma > 1$, то в системі відбувається ланцюгова реакція.

Квантовий вихід первинного фотохімічного процесу може відрізнятися від повного, вимірюваного, квантового виходу. Необхідно також розуміти різницю між хімічним виходом та квантовим виходом.

2. Хімічний вихід показує внесок бічних реакцій та кінцеву ефективність перетворення початкової речовини у продукт незалежно від кількості поглинутих квантів.

3. До найбільш важливих параметрів фотохімічних реакцій належать також **швидкість протікання** фотохімічних реакцій (кількість фотохімічних продуктів за одиницю часу) та **енергія** (довжина хвилі збудження) **ініціації** фотохімічної реакції.

3.3.2. Закони фотохімії

1. *Для проходження хімічної реакції необхідно, щоб молекула поглинула квант світла достатньої енергії (закон Гротгуса-Дрепера).*

Енергію, необхідну для збудження молекули, можна знайти із спектрів поглинання або випромінювання цієї молекули. Область ультрафіолетового випромінювання прийнято розділяти на ближній (300÷400 нм), далекий (200÷300 нм) та шуманівський (вакуумний) (120÷200 нм) ультрафіолет. Для органічної фотохімії найбільш цікавим є діапазон хвиль від 200 нм до 700 нм, де починається інфрачервона область [1].

2. *Кожний фотон (квант) світла у первинному акті здатен активувати тільки одну молекулу (закон Ейнштейна).*

У фотохімії використовується одиниця вимірювання поглинутої системою енергії – 1 Ейнштейн. Кількість енергії, еквівалентна 1 молю фотонів ($6.02 \cdot 10^{23}$ фотонів) при даній довжині хвилі, приймається за 1 Ейнштейн.

3. *При поглинанні кожного фотона є певна імовірність заселення в молекулі або найнижчого збудженого синглетного S_1 або триплетного T_1 стану (закон Каша, стосується в основному фотохімії органічних сполук).* Тому в більшості фотохімічних

процесів, що відбуваються в розчинах органічних речовин, приймає участь або найнижчий збуджений синглетний стан S_1 або найнижчий триплетний стан T_1 .

3.4. Застосування експериментальних методів фотоніки для дослідження фотохімічних реакцій

Оскільки швидкість протікання хімічних реакцій зумовлена перебудовою електронних систем, саме спектральний відгук є найбільш чутливим на такі зміни, експериментальні методи фотоніки є досить важливими в дослідженнях фотохімічних процесів, зокрема, в визначенні їх параметрів. Як приклад, наведемо спосіб визначення квантового виходу фотохімічної реакції окислення органічних молекул за даними робіт [66-68].

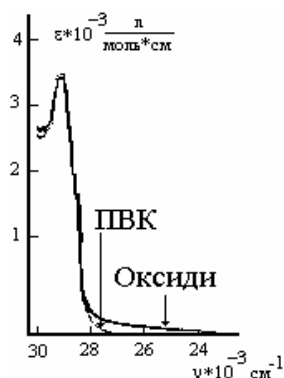


Рис.65. Прояв фотоокислених ланок в спектрах поглинання ПВК

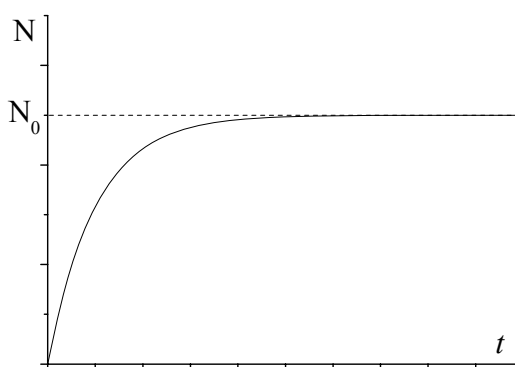


Рис.66. Залежність концентрації фотоокислених молекул N_ϕ від часу опромінення

Квантовий вихід фотохімічної реакції може бути знайдений, використовуючи спектральні методи, як це було зроблено, наприклад, в [66-68] для процесів фотоокислення вінілкарбазолу

(ВК) та полівінілкарбазолу (ПВК) (див. рис.65 та рис.66). Зміну концентрації фотоокислених молекул з часом опромінення можна подати рівнянням:

$$dN_{\phi} = \gamma \sigma N L dt = \gamma \sigma (N_0 - N_{\phi}) L dt,$$

де:

γ - квантовий вихід фотохімічної реакції;

σ - поперечний переріз поглинання фотона (із розрахунку на одну ВК-ланку);

N - концентрація неокислених молекул (яка, власне, є пропорційною оптичній густині в смузі власного поглинання та інтенсивності власної флюоресценції $I_{\phi l}$);

N_0 - загальна початкова концентрація молекул ВК у розчині;

L - інтенсивність збуджуючого світла.

Тоді

$$dN_{\phi} = \gamma \sigma N_0 L dt - \gamma \sigma N_{\phi} L dt; \quad dN_{\phi} + \gamma \sigma N_{\phi} L dt = \gamma \sigma N_0 L dt.$$

В результаті маємо:

$$\frac{dN_{\phi}}{dt} + \gamma \sigma N_{\phi} L = \gamma \sigma N_0 L.$$

Це неоднорідне диференціальне рівняння. Розв'яжемо спочатку однорідне:

$$\frac{dN_{\phi}}{dt} + \gamma \sigma N_{\phi} L = 0. \quad \text{Розв'язок } N_{\text{одн.}} = C \cdot e^{-\gamma \sigma L t}.$$

Частковий розв'язок неоднорідного рівняння в даному випадку $N_{\phi} = \text{const} = A$. Знайдемо значення цієї константи:

$$0 + \gamma \sigma A L = \gamma \sigma N_0 L. \quad A = N_0.$$

Загальний розв'язок: $N_{\phi} = C \cdot e^{-\gamma \sigma L t} + N_0$. При $t \rightarrow \infty$ $N_{\phi} = N_0$ - процес фотоокислення досягає певного насичення (рис.66), а в початковий момент $t = 0$ оскільки збудження було відсутнє, $N_{\phi} = 0$, а отже $C = -N_0$. Таким чином, загальний розв'язок:

$$N_{\Phi} = N_0 \cdot (1 - e^{-\gamma \sigma L}).$$

Оскільки на початкових стадіях фотоокислення N_{Φ} змінюється майже лінійно (див. рис.66) і $N_{\Phi} \ll N_0$, рівняння в цьому випадку може бути спрощено:

$$dN_{\Phi} \approx \gamma \sigma N_0 L dt, \quad \text{звідки} \quad \gamma \approx \frac{dN_{\Phi}}{dt} \cdot \frac{1}{N_0 \sigma L}$$

Використовуючи експериментальні дані для σ , L та розраховуючи величину $\frac{dN_{\Phi}}{dt} \cdot \frac{1}{N_0}$ за швидкістю зміни оптичної

густини $\frac{dD}{dt}$ (в діапазоні смуги поглинання) (або за швидкістю зменшення $I_{\text{фл}}$, враховуючи, що $I_{\text{фл}} \sim N$) отримаємо величину квантового виходу реакції фотоокислення молекул даного типу: $\gamma \approx 2 \cdot 10^{-3}$.

Отримана величина означає, що 2000 фотонів, поглинутих речовиною, призводять до створення однієї молекули фотооксиду.

3.5. Приклади фотохімічних процесів в біологічних об'єктах

3.5.1. Фотосинтез вітаміну Д

Одним з найбільш важливих фото-біохімічних перетворень є процес створення вітамінів групи Д, що може бути лише за рахунок фотоініціації. На рис.67 представлено ланцюжок фото-термохімічних реакцій, в результаті якого, врешті-решт, синтезується вітамін Д. Старт процесу реалізується за рахунок:

- 1) поглинання фотону наявною в організмі молекулою провітаміну Д (про);
- 2) енергія збудженої молекули витрачається на її перетворення в молекулу превітаміну Д (пре).

Далі процес розгалужується наступним чином: молекула превітаміну Д, в свою чергу, поглинувши фотон, може перетворитися в – (а) молекулу люмістиролу, (б) в молекулу тахістиролу.

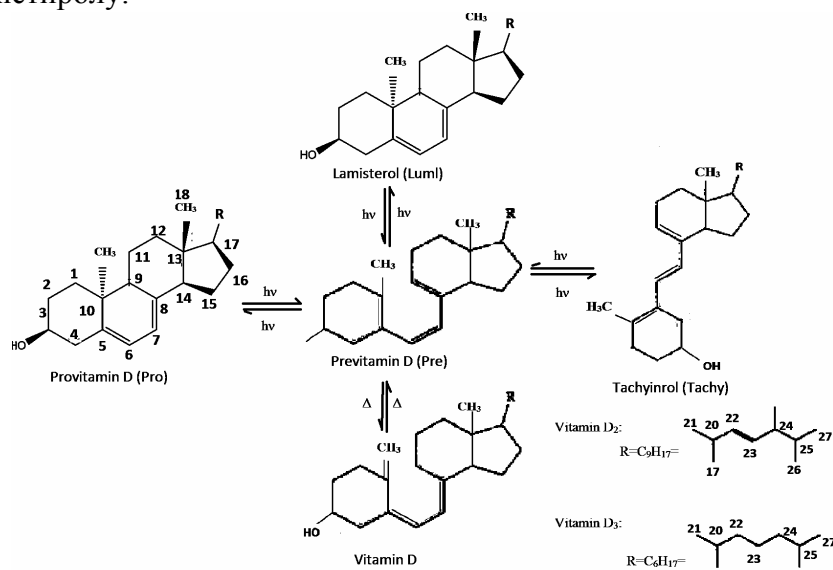


Рис.67. Ланцюжок фото-термохімічних реакцій для синтезу вітаміну Д

В той же час молекула превітаміну Д за рахунок поглинання певної порції теплової енергії трансформується в вітамін Д 2 або ж вітамін Д 3. Спектри поглинання вище зазначених сполук подано також на рис.68.

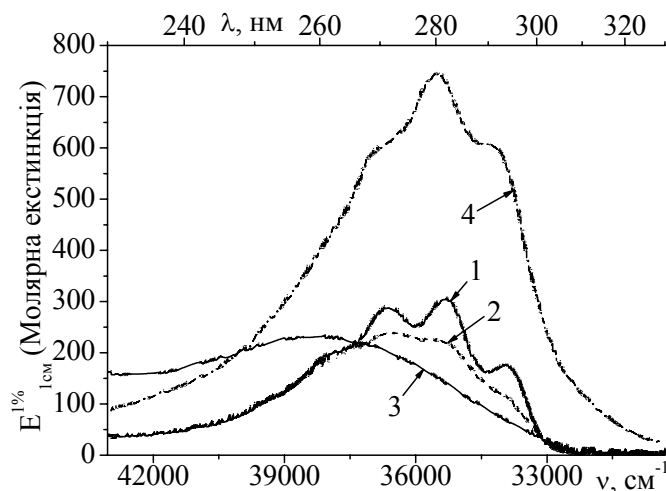


Рис.68. Спектри оптичного поглинання сполук, що приймають участь у синтезі вітаміну Д: 1-провітамін Д, 2-люмістирол, 3-превітамін Д, 4-тахістирол

3.5.2. Фотосинтез меланіну

Меланін – біополімер, в склад елементарних ланок якого входять сполуки – еумеланін (eumelanin) та феомеланін (pheomelanin). Дані сполуки утворюються в організмі з тирозину та дигідрооксифенілаланіна (ДОФА, DOPA) ферментативним шляхом за схемами, наведеними на рис.69.

Є у меланінові структури, що визначають чорний та темно-коричневий колір волосся та ретини очей. Цей матеріал є нерозчинним. Феомеланінові пігменти дають забарвлення від жовтого до червоного (руде волосся, руда пігментація шкіри). Феомеланіни можуть розчинятися в спиртах.

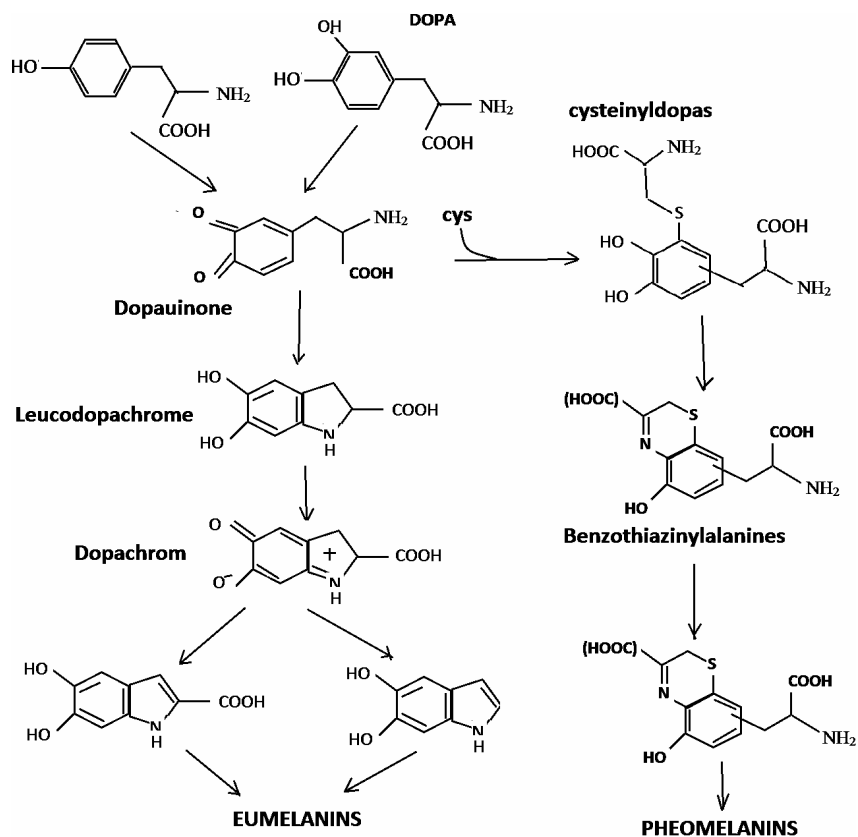


Рис.69. Схеми хімічних реакцій утворення складових меланіну

Пігменти, що містять меланінові гетерополімери проявляються в шкірі та змінюють свій колір під дією світла в ближній ультрафіолетовій області (280÷300 нм). З'являється пігментація («загар»), колір якої змінюється від жовтого до темно-коричневого залежно від дози опромінення. Спектр поглинання при цьому зсувається в довгохвильовий бік. Причому, «хвіст» спектру поглинання може сягати ближньої інфрачервоної області (800÷900 нм), перекриваючи так зване вікно прозорості біологічних тканин (рис.70).

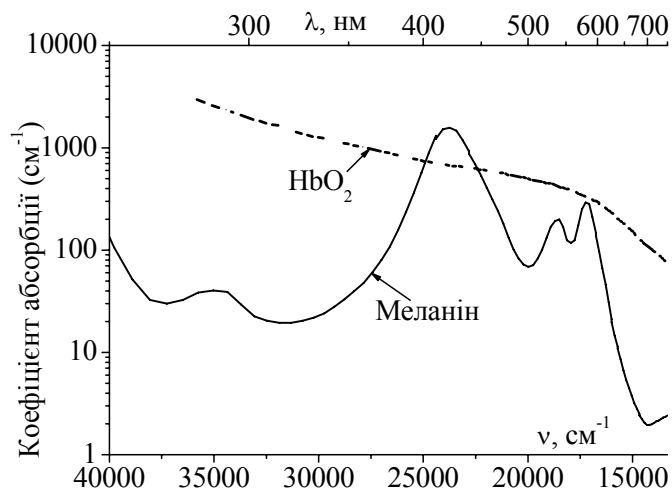


Рис.70. Спектри поглинання деяких важливих клітинних складових

Цей довгохвильовий зсув корелює зі зростанням молекулярної маси макромолекул меланіну (рис.71).

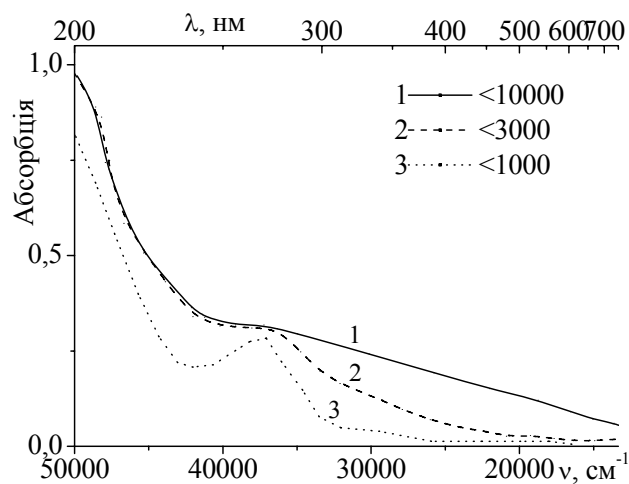


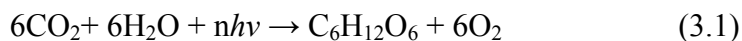
Рис.71. Спектри поглинання для різних за розміром частинок меланіну. Розчин натурального меланіну відокремили з використанням розміру селективних фільтрів. Номери, які вказані на правому боці графіку є діапазон молекулярних мас частинок меланіну, асоційованих зі спектрами поглинання

Така поведінка оптичних властивостей меланінових структур може бути пов'язана з утворенням агрегатів між ланками макромолекул під дією світла. Ймовірність цього процесу можливо зростає зі зростанням молекулярної маси макромолекул. В той же час відомо [8], щодо подібні спектральні ефекти може спричинити і фотоокислення.

3.6. Фотосинтез у природі

Одним з найважливіших фотобіологічних процесів, який забезпечує життя на Землі, є фотосинтез. Цей процес полягає у перетворенні енергії світлового випромінювання Сонця в енергію хімічних зв'язків вуглеводів (напр., сахарози чи крохмалю) в бактеріях та хлоропластах рослинних клітин. Важливими складовими механізму фотосинтезу є фотофізичні процеси поглинання світла та безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження.

Найпоширенішим є кисневий (кисневий) фотосинтез, коли окислюється атом кисню (а не, скажімо, сульфур (сірки), що також має місце у випадку деяких бактерій), причому первинним донором електронів є молекула води, а побічним (і надзвичайно важливим для нас) продуктом є молекула кисню O_2 . Загальне рівняння кисневого фотосинтезу, яке містить лише вихідні субстрати процесу (вуглекислий газ CO_2 , воду H_2O та кванти $h\nu$ видимого світла Сонця) та його кінцеві продукти (вуглевод $C_6H_{12}O_6$ та кисень O_2), виглядає наступним чином:



Отримані таким чином з вуглекислого газу вуглеводи є не лише джерелом енергії для подальшого функціонування клітин, а й карбон-вмісним будівельним матеріалом для синтезу необхідних біологічних молекул – як безпосередньо для рослин, так і для тварин, що їх споживають.

Проте, хоча рівняння (3.1) виглядає просто, механізм фотосинтезу є складним і містить цілу низку процесів та реакцій. Щоб зрозуміти цей механізм, розглянемо спершу будову хлоропласта рослини (рис.72).

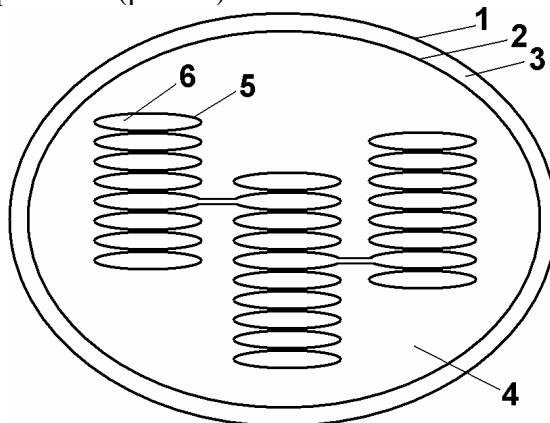
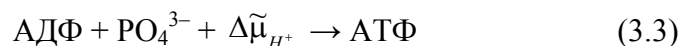


Рис.72. Схематичне зображення хлоропласта: 1 – зовнішня мембрана хлоропласта, 2 – внутрішня мембрана хлоропласта, 3 – міжмембранний простір, 4 – строма, 5 – мембрана тілакоїда, 6 – люмен

Хлоропласт – це органела, що міститься всередині рослинної клітини і оточена подвійною мембраною, що складається з зовнішньої (1) та внутрішньої (2) мембран, між якими знаходиться міжмембранний простір (3); простір всередині хлоропласта зветься стромою (4). В стромі знаходяться тілакоїди – оточені власною мембраною (5) плоскі замкнені структури, простір всередині тілакоїда зветься тілакоїдний простір або люмен (6). Тілакоїди

організовані в стопки – грани, окремі грани сполучені між собою. Фотосинтез значною мірою відбувається саме в мембранах тілакоїдів. Цікаво, що значення рН (що визначається як $-\log_{10}C(H^+)$ і відображає таким чином концентрацію $C(H^+)$ іонів гідрогену – протонів) в стромі та люмені суттєво відрізняються і становлять близько 8 та 5 відповідно (тобто, концентрація протонів в люмені на три порядки вища, ніж у стромі). Така різниця не випадкова, а навпаки є необхідним елементом фотосинтезу.

Процес фотосинтезу можна поділити на світлозалежну та темнову стадії. Під час *світлозалежної стадії* за рахунок енергії поглинутих квантів відбувається перенесення протонів зі стромі в люмен (що спричиняє згадану вище різницю електрохімічних потенціалів протонів H^+ , яка, в свою чергу, є джерелом енергії для фосфорилування аденозиндифосфату АДФ, тобто синтезу аденозинтрифосфату АТФ з АДФ та фосфату PO_4^{3-}) а також відновлення нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату $НАДФ^+$ до $НАДФН$. Загальні рівняння світлозалежної стадії фотосинтезу виглядають так:



де $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ – різниця електрохімічних потенціалів протона в люмені та в стромі, яка є рушієм пасивного транспорту протонів з люмена в строму (електрохімічний потенціал – це потенціал Гіббса одного моля іонів у розчині; мінімум цієї величини визначає рівноважний стан іонів за сталих тиску та температури; вона залежить від концентрації іонів у розчині C та електричного потенціалу ϕ і визначається формулою

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + RT \ln C + zF\phi,$$

де:

μ_0 – стандартний хімічний потенціал (залежить від розчинника);

R – газова стала;

T – температура;

z – заряд іона в одиницях елементарного заряду;

F – стала Фарадея, що рівна 96500 Кл/моль і є по суті зарядом одного моля елементарних зарядів).

Саме $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ є джерелом енергії для фосфорилування АДФ під час фотохімічного етапу світлозалежної стадії фотосинтезу.

Далі, під час *темнової стадії* фотосинтезу за рахунок енергії фосфатного зв'язку АТФ та відновленого НАДФН, з CO_2 внаслідок ряду реакцій (цикл Кальвіна-Бенсона) синтезується гріцеральдегід-3-фосфат. З двох молекул гліцеральдегід-3-фосфату синтезується молекула фруктозо-6-фосфату або глюкозо-1-фосфату. Далі, з фруктозо-6-фосфату та глюкозо-1-фосфату внаслідок ряду реакцій отримується дисахарид сахароза, а з багатьох молекул глюкозо-1-фосфату – полісахарид крохмал.

Ми не будемо заглиблюватися в подробиці темної стадії, яка є суто біохімічною, натомість розглянемо детальніше світлозалежну стадію, яка поділяється, в свою чергу, на фотофізичний та фотохімічний етапи.

Фотофізичний етап включає в себе поглинання квантів світла хромофорами антенної системи та безвипромінювальну передачу збуджень до реакційного центру, в той час як протягом *фотохімічного етапу* відбувається передача електрона в ланцюжку

донорів та акцепторів у напрямку зростання окисно-відновного потенціалу, що супроводжується перенесенням протонів зі стріми в люмен та відновленням НАДФ⁺ до НАДФН.

Щоб зрозуміти механізми, за якими відбуваються обидва згадані етапи світлозалежної стадії фотосинтезу, розглянемо спершу будову молекулярних комплексів ціанобактерій та хлоропластів рослин (у пурпурових бактерій фотосинтез організований інакше), що беруть участь в цих процесах, і спрощену послідовність цих процесів, що схематично зображені на рис.73. Молекулярними комплексами, що беруть участь в світлозалежній стадії фотосинтезу, є складні білкові структури, інтегровані в тілакоїдну мембрану – *фотосистеми I* (ФСІ, ІІІ) та *II* (ФСІІ, І), кожна з них складається з зовнішньої антенної системи (А) та центрального комплексу (Б), який містить внутрішні антени та реакційний центр, *комплекс b_6f* (Kb₆f, ІІ), ферредоксин-НАДФ-редуктаза (ФНР, ІV) та АТФ-синтетаза (АТФС, V), яка складається з інтегральної субодиниці F₀ (VА) та периферичної субодиниці F₁ (VБ). Крім них, у світлозалежній стадії фотосинтезу беруть участь невеликі рухливі переносники – молекули *пластохінону* (PQ; рухаються в мембрані), *пластоціаніну* (PC; рухаються в люмені) та невеликий білок *ферредоксин* (Fd; рухається в стрімі).

Розглянемо спрощену схему фотоелектронних та молекулярних процесів, з яких складається світлозалежна стадія фотосинтезу, що відбуваються в мембрані тілакоїда і просторі біля неї (рис.73).

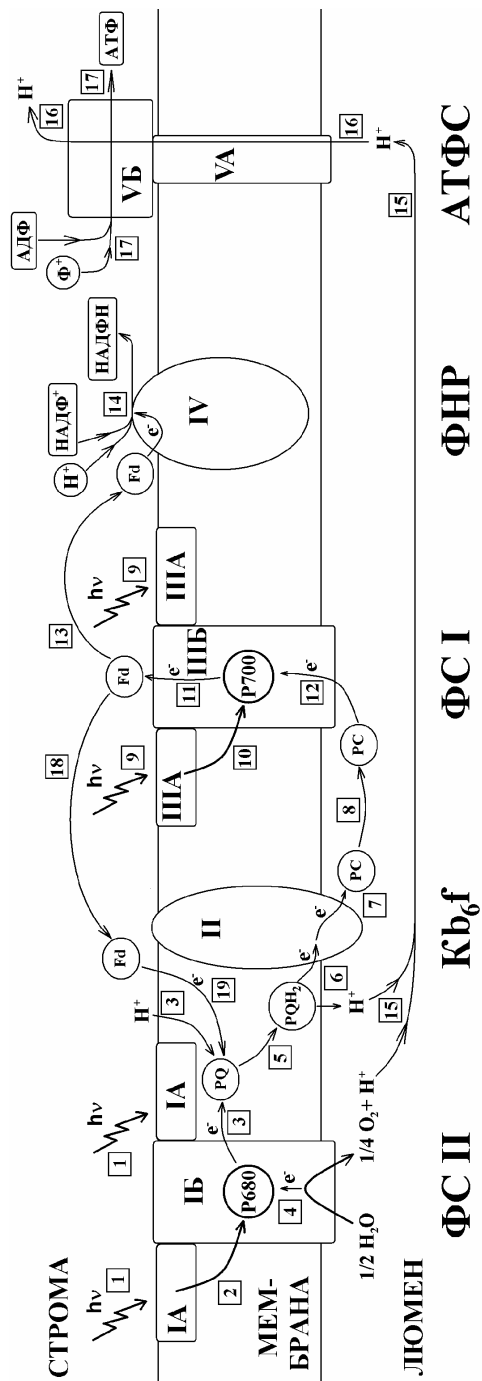


Рис. 73. Схематичне зображення молекулярної організації фотосинтезу в тілакоїдній мембрані рослин (пояснення в тексті)

Насамперед, світло поглинається хромофорами зовнішньої антенної системи фотосистеми II (рис.73, *процес 1*). Ця антенна система являє собою складну білкову структуру, яка містить значну кількість хромофорів, що й поглинають світло Сонця (будову та склад антенних систем буде детальніше розглянуто нижче). Далі збудження хромофорів антенної системи переноситься (через хромофори внутрішньої антенної системи як проміжні центри) на молекули реакційного центру (*процес 2*), так званий пігмент 680 (P680), як традиційно називають димер молекул хлорофілу *a* (детальніше процеси в реакційному центрі будуть розглянуті нижче; слід лише зауважити, що це питання не розв'язане досі в усіх подробицях).

Далі збуджений електрон реакційного центру переноситься (через кілька проміжних молекул в складі ФСII – феофітин та хінони Q_A та Q_B; на рис.73 не представлені) на молекулу пластохінону (*процес 3*) – переносника, що рухається в мембрані (слід наголосити, що тут ми маємо вже не перенесення енергії збудження, коли електрон молекули донора хоч і втрачає збудження, але залишається в складі донора, а саме перенесення електрона – зарядженої частинки – з однієї молекули на іншу). Щоб відновити пластохінон PQ до його відновленої форми PQH₂, він має приєднати два електрони з реакційного центру і два протони H⁺ зі стромы (*процес 3*). Оскільки збуджений електрон реакційного центру перенісся на PQ, реакційний центр залишився іонізованим. Відсутній таким чином на основному рівні енергії електрон приходить до реакційного центру з залишку тирозину, який в свою чергу забирає електрон з марганцевого комплексу (тирозин і марганцевий комплекс входять до складу білку ФСII; на

рис.73 не наведені). Цей комплекс здатен віддати чотири електрони, після чого отримує всі їх назад, окислюючи дві молекули води до молекули кисню та чотирьох протонів. Молекула кисню є побічним продуктом фотосинтезу (хоч і необхідним для життя на Землі), а чотири протони значно важливіші – вони роблять внесок у створення градієнту електрохімічного потенціалу H^+ . Підсумовуючи, на основний електронний рівень реакційного центру, де утворилася вакансія внаслідок збудження електрона і його подальшого перенесення на інші молекули, надходить електрон, який походить з окисленої молекули води (*процес 4*).

Повернемося до відновленої внаслідок *процесу 3* молекули пластохінону PQH_2 . Відновившись у мембрані з боку стромы, PQH_2 дифундує в бік люмена (*процес 5*), де окислюється, віддаючи два отримані зі стромы протони в люмен (що також робить внесок у створення градієнту електрохімічного потенціалу H^+), два електрони ж переходять на комплекс b_6f (*процес 6*), звідки передаються (*процес 7*) на пластоціанін – переносник, що дифундує (*процес 8*) в люмені до ФСІ.

У фотосистемі І відбуваються процеси, схожі на ті, що мають місце у ФСІІ. Так, світло Сонця поглинається антенним комплексом ФСІ (*процес 9*), і збудження переноситься (*процес 10*) до реакційного центру на пігмент 700 (P700). Збуджений електрон P700 через каскад проміжних молекул у складі ФСІ переходить (*процес 11*) на переносник ферредоксин. Вакансія, що утворилася внаслідок описаних процесів на основному рівні енергії реакційного центру ФСІ, заповнюється внаслідок передачі (*процес 12*) електрона з пластоціаніна, що дифундує від комплексу b_6f (див. вище).

Окислені молекули ферредоксину віддають електрони двома шляхами, залежно від ряду факторів, зокрема концентрації НАДФ⁺. За високої концентрації НАДФ⁺ (коли, отже, є необхідність в його відновленні), ферредоксин, дифундуючи в стромі (*процес 13*), віддає електрон на ферредоксин-НАДФ-редуктазу. Використовуючи отриманий від ферредоксина електрон та протон зі стромі, ФНР каталізує відновлення молекули НАДФ⁺ до НАДФН (*процес 14*). Зникнення зі стромі одного протона, використаного в *процесі 14*, теж робить внесок у створення градієнту електрохімічного потенціалу Н⁺.

Таким чином, внаслідок описаних процесів, крім відновлення НАДФ⁺ до НАДФН, створюється також градієнт електрохімічного потенціалу Н⁺ – концентрація Н⁺ в люмені значно вища, ніж у стромі. В результаті протони намагаються потрапити до стромі, що їм вдається, коли внаслідок дифузії (*процес 15*) вони потрапляють до АТФ-синтетази. Проходження протонів крізь АТФ-синтетазу (*процес 16*) надає останній енергію для фосфорилування АДФ, внаслідок чого синтезується АТФ.

Весь описаний ланцюжок синтезу АТФ (починаючи з *процесу 1* – поглинання світла ФСII) носить назву нециклічного фосфорилування. Внаслідок нециклічного фосфорилування відбувається відновлення НАДФ⁺ до НАДФН та синтез АТФ, причому поряд з відновленням однієї молекули НАДФН синтезується в середньому трохи більше за одну молекулу АТФ. Але клітині треба значно більше АТФ, ніж НАДФН. Тому за деяких умов (наприклад, низької концентрації НАДФ⁺) відбувається так зване циклічне фосфорилування, в якому задіяна лише одна фотосистема – ФСI. Її збуджений електрон переходить

на ферредоксин (*процес 11*; див. вище), який дифундує (*процес 18*) і передає електрон на пластохінон (*процес 19*). Перенос на пластохінон двох таких електронів супроводжується приєднанням пластохіноном також двох протонів зі строми (*процес 3*), далі відновлений PQH_2 дифундує до комплексу b_6f (*процес 5*), після чого відбуваються описані вище *процеси 6, 7, 8 і 12* (останній процес замикає цикл, як видно з рис.73). Внаслідок такого циклу НАДФ^+ не відновлюється, але відбувається перенесення протонів зі строми в люмен, що робить можливим синтез АТФ, як вже описано раніше (*процеси 15, 16 і 17*).

Щоб зрозуміти, навіщо потрібні дві фотосистеми (ФСІ та ФСІІ), треба розглянути енергетичну схему описаних вище процесів – так звану Z-схему (рис.74), на якій зображені енергії окисно-відновного потенціалу головних ланок електронно-транспортного ланцюга (цей потенціал, по суті, визначається енергією Гіббса приєднання електрона даною ланкою, при цьому електрон переноситься в напрямку зростання окисно-відновного потенціалу) на шляху нециклічного та циклічного фосфорилування. З рис.74 видно, що енергії одного кванту (якщо врахувати ще дисипацію енергії електрона при його перенесенні в межах ФСІІ) недостатньо для перенесення електрона з окисленого оксигену в складі води на НАДФ^+ для відновлення останнього; тому використовуються послідовно збудження двох фотосистем – ФСІІ та ФСІ.

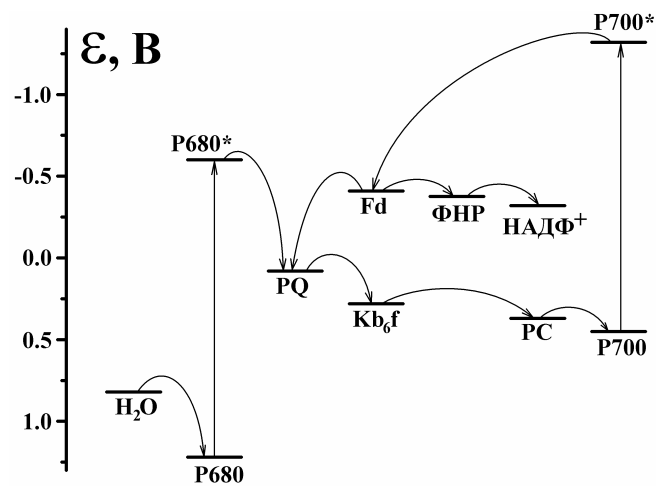


Рис.74. Зміна окисно-відновного потенціалу ϵ при перенесенні електрона протягом світлозалежної стадії фотосинтезу, за [69-75]. Прямі стрілки – поглинання фотона; криві стрілки – перенесення електрона. P680* та P700* – збуджений стан пігментів 680 та 700 відповідно, решта підписів такі ж, що й на рис.73 (пояснення в тексті)

Тепер розглянемо детальніше на прикладі ФСII фотофізичний етап світлозалежної стадії фотосинтезу. Поглинання квантів світла в хлоропластах здійснюється молекулами *хлорофілу a* та *хлорофілу b* (що належать до класу споріднених з порфірінами хлоринів), а також молекулами ряду сполук класу каротеноїдів – ксантофілів *лютеїну*, *віолаксантину* та *неоксантину* (рис.75).

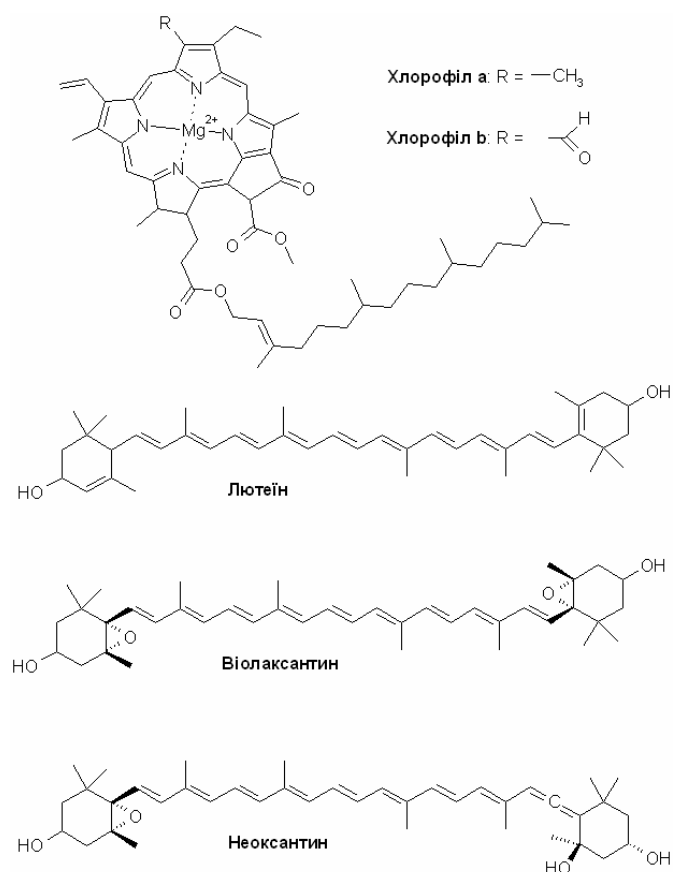


Рис.75. Структури хромофорів, що входять до складу антенних систем ФСII

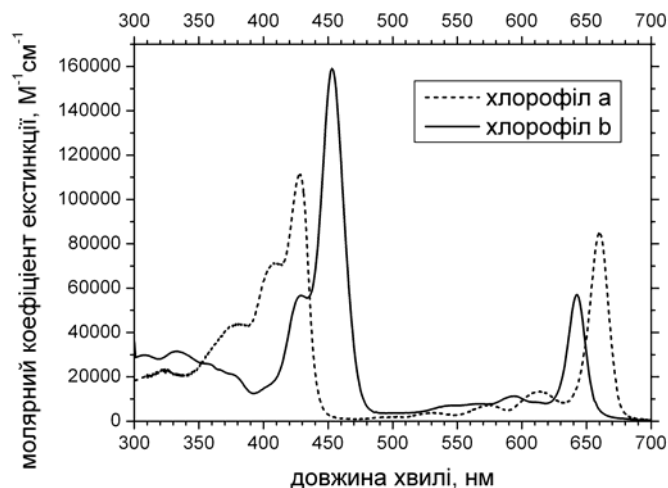


Рис.76. Спектри поглинання хлорофілу а та хлорофілу b в діетиловому ефірі, з [76]

Зі спектрів поглинання хлорофілів (рис.26 та рис.76) видно, що вони забезпечують поглинання в основному фіолетового та червоного світла, що й пояснює зелений колір рослин. Зі спектрів видно також (враховуючи, що каротеноїди поглинають в області 400-500 нм), що ієрархія синглетних станів згаданих молекул така, що енергія збудження спадає в ряду *каротеноїди* > *хлорофіл b* > *хлорофіл а*, що й визначає напрямок перенесення енергії збудження. Проте, ієрархія триплетних рівнів дещо інша, оскільки каротеноїди, крім поглинання світла, відіграють роль і як перехоплювачі триплетних збуджень хлорофілів у випадку, коли антенна система поглинає забагато квантів – більше, ніж здатний пропустити реакційний центр. В цьому випадку молекули *хлорофілу а*, яким немає куди передати синглетне збудження, можуть перейти у триплетний стан, що може спричинити хімічну реакцію і отже пошкодження молекули. Каротеноїди, що знаходяться поруч з молекулами *хлорофілу а* зовнішнього

антенного комплексу (між ними Ван-дер-Ваальсові взаємодії), перехоплюють до 95% таких триплетних збуджень [77].

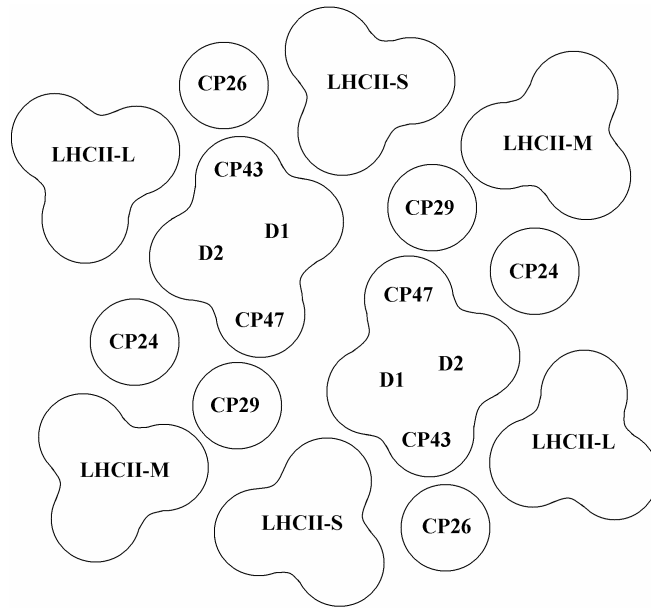


Рис.77. Загальна схема антенної системи та реакційного центру ФСII згідно з [78]. Пояснення позначень в тексті

Розглянемо для прикладу будову фотосистеми II (рис.77), яка являє собою димер. Кожен з мономерів цього димеру містить центральний комплекс (до якого входять внутрішні антени CP43 і CP47, а також білкові комплекси D1 і D2, які містять реакційний центр), та зовнішній антенний комплекс. Зовнішній антенний комплекс, де в основному здійснюється поглинання світла, складається з ряду світлозбиральних комплексів (light harvesting complex – Lhc) – білкових молекул, що містять хромофори. Так звані другорядні (minor) світлозбиральні комплекси CP24, CP26 та CP29 – це вбудовані в мембрану мономерні білки, кожен з яких має в своєму складі 8-10 молекул хлорофілу та 2 каротеноїди [79]. В

той же час головні (major) світлозбиральні комплекси ЛНСII являють собою тримерні білкові структури, причому кожен з мономерів (близький за структурою до мономерних білків другорядних світлозбиральних комплексів) такого тримеру містить 14 молекул хлорофілу (8 *хлорофілу a* та 6 *хлорофілу b*), а також чотири молекули ксантофілів – 1 неоксантин, 2 лютеїни та 1 віолаксантин [77]. Кожен мономер ФСП може містити до трьох таких тримерів ЛНСII, які, залежно від локалізації в ФСП, розрізняються як сильно-зв'язаний (strongly bound) ЛНСII-S, посередньо-зв'язаний (moderately bound) ЛНСII-M та слабо зв'язаний (loosely bound) ЛНСII-L. При цьому в складі кожної конкретної ФСП всі три тримерні комплекси ЛНСII зустрічаються рідко – ЛНСII-S входить до складу майже всіх ФСП, ЛНСII-M (на додачу до ЛНСII-S) зустрічається рідше, а ЛНСII-L (на додачу до попередніх двох) – ще рідше. Середня відстань між молекулами хлорофілу в світлозбиральних комплексах становить близько 10Å, що передбачає взаємодію, достатньо сильну для реалізації механізму безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження [77]. Дослідження також показали, що перенесення енергії з каротеноїдів на хлорофіли та з *хлорофілу b* на *хлорофіл a* відбувається ефективно в субпікосекундному часовому інтервалі, тоді як перенесення енергії між молекулами *хлорофілу a* (як в межах одного світлозбирального комплексу, так і між сусідніми) відбувається дещо повільніше, за часи порядку кількох пікосекунд [77].

Таким чином, збудження зовнішньої антенної системи, після ряду стрибків, переносяться на внутрішню антенну систему, яку складають білкові комплекси CP43 і CP47 центрального

комплексу. Ці комплекси містять лише молекули *хлорофілу a*, 13 та 16 молекул відповідно [80]. Отримавши збудження з зовнішньої антенної системи, хлорофіли внутрішньої антенної системи передають їх на реакційний центр, а саме на димер з двох молекул *хлорофілу a*, одна з яких входить до складу білку D1, а друга – білку D2; цей димер традиційно носить назву пігмент 680 (P680). Збуджений електрон пігменту 680 переходить на сусідню молекулу феофітину, формуючи комплекси з переносом заряду, потім переноситься далі на хінон Q_A, з нього на хінон Q_B, після чого залишає ФСII, беручи участь у відновленні пластохінону. Усе, описане вище, – спрощена традиційна схема; проте детальне вивчення та побудова моделей процесів перенесення збуджень та електронів у центральному комплексі ФСII досі триває [80].

Розділ 4
Прикладні аспекти біофотоніки. Біосенсори з оптичним
відгуком

4.1. Аутолюмінесцентні біосенсори

Існують два типи спектроскопічних методик, які можуть бути застосовані для детекції деяких об'єктів або подій у неживому (синтетичному) або біологічному середовищі. Першим варіантом є використання оптичних властивостей хромофорних груп, які є структурними одиницями об'єктів детекції (аутофлюоресценція та аутофосфоресценція), а також зміни цих властивостей при певних змінах навколишнього середовища. Головною перевагою аутолюмінесцентної сенсорної методики є відсутність розподілу сенсорних систем, зокрема, біологічних об'єктів. Наприклад, наявність макромолекул ДНК/РНК у певному біологічному середовищі (наприклад, крові) може бути продетектована завдяки наявності у спектрі фосфоресценції ДНК характерної смуги, пов'язаної з АТ-комплексом (рис.31 та рис.32), а у РНК – з аденіновою ланкою (рис.42).

У свою чергу, аденін є чутливим до певних змін в оточуючому середовищі (наприклад, зміна температури або наявність спільно розчинених компонентів у розчині – макромолекул білків, – з якими аденін може взаємодіяти). Аденіну притаманний спектр фосфоресценції (точніше – аутофосфоресценції) із чіткою електронно-коливальною структурою (з характерним першим максимумом $\lambda \approx 390$ нм), що поступово зникає при збільшенні температури в діапазоні від $T=4,2$ К до $T=120$ К (рис.78) [15]. Це пов'язано з замороженням/появою певних коливальних ступенів вільності у

π -електронної системи аденіну зі зменшенням/збільшенням температури оточення відповідно.

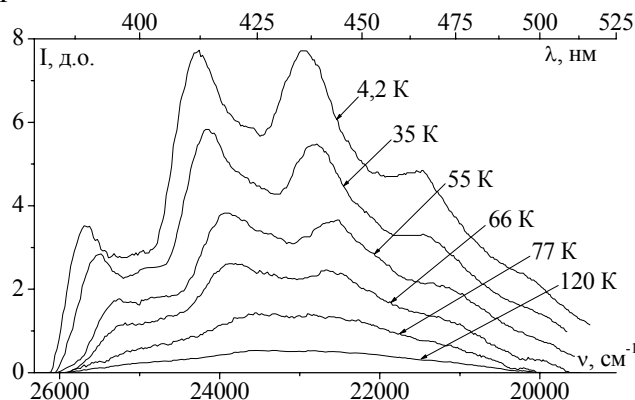


Рис.78. Спектри фосфоресценції дАМФ в діапазоні $T=4,2 \div 120$ К

Наявність у аденіна (що входить до складу тримера 2'5'A₃, хімічна формула якого подана на рис.41) чіткої електронно-коливальної структури в спектрі аутофосфоресценції при $T=4,2$ К та її зникнення може бути використана при створенні сенсора на наявність макромолекул білків, з якими 2'5'A₃ може взаємодіяти. При додаванні у розчин ЛА молекул 2'5'A₃ у спектрі фосфоресценції суміші при $T=77$ К (при збудженні $\lambda \approx 260$ нм) з'являється структура з першим максимумом $\lambda \approx 390$ нм, що є відсутнім у спектрі фосфоресценції Трп (рис.79,а) [25,26,56]. Це пов'язано з тим, що молекула 2'5'A₃ проникає глибоко всередину макромолекули ЛА і "жорстко" фіксується на ній, в результаті чого (як у випадку переходу від $T=77$ К до $T=4,2$ К, рис.79,б) відбувається вимерзання певних коливальних ступенів вільності у π -електронної системи аденіну. Таким чином, 2'5'A₃ можна використовувати як аутолюмінесцентний біосенсор на наявність макромолекул білків.

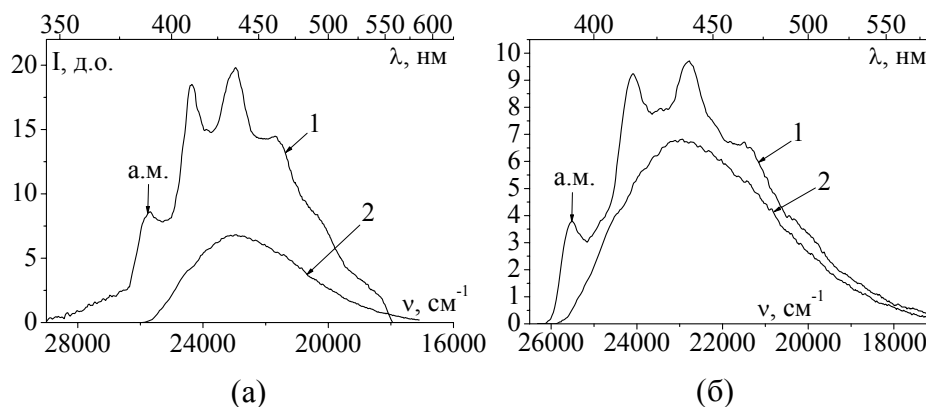


Рис.79. Спектри фосфоресценції 2'5'A₃: (а) з ЛА (1), та у "вільному" стані (2) при T=77 K; (б) у "вільному" стані при T=4,2 K (1) та T=77 K (2) (а.м. – перший максимум аденіну $\lambda \approx 390$ nm)

4.2. Біосенсори на основі молекулярних зондів

Інший варіант сенсорної методики пов'язаний з використанням так званих спеціальних молекулярних зондів з оптичним відгуком. Як правило, ці зонди є спеціально розробленими та синтезованими молекулярними системами, спектральні властивості яких (оптичне поглинання, флюоресценція та фосфоресценція, їх спектри, інтенсивності, часи затухання випромінювання, поляризація і т.д.) істотно змінюються при їх взаємодії з об'єктом детекції (наприклад, інтенсивність флюоресценції молекулярного зонда збільшується в ~ 900 разів в результаті його зв'язування з макромолекулою ДНК [49,51]). Люмінесцентна детекція біологічних систем може здійснюватися як при однофотонному так і при двофотонному або багатоступінчатому (up conversion) збудженні. Саме двофотонне чи багатоступінчате збудження дає можливість глибшого проникнення в біологічний об'єкт, оскільки в цьому випадку

молекулярні флюоресцентні зонди, що однофотонно збуджуються в області 400÷500 нм, можуть бути збуджені в області 800÷1000 нм (вікні прозорості біологічних тканин). Варто зазначити, що проблема глибокого проникнення в біологічні об'єкти останнім часом починає вирішуватися за рахунок створення барвників, що поглинають і випромінюють в області прозорості біологічних тканин.

Зупинимося на особливостях застосування молекулярних зондів для флуоресцентної детекції полінуклеотидів та отримання за їх допомогою флюоресцентного зображення місць їх локалізації в клітині.

Флюоресцентний зонд повинен мати:

1. Високе значення квантового виходу флюоресценції при зв'язуванні з певною біологічною молекулою (наприклад, ДНК).
2. Низьке значення квантового виходу флюоресценції у водному розчині (у незв'язаному стані).
3. Високе значення перерізу двофотонного поглинання (TPACS). (при двофотонній детекції ДНК).

Цей зонд повинен також:

1. Проникати в клітини.
2. Бути фотохімічно стабільним.
3. Бути безпечним для досліджуваного біологічного об'єкта (не проявляти токсичність та фототоксичність) [51].

4.2.1. Однофотонна детекція ДНК

Детекція ДНК є важливою проблемою в молекулярній біології та медицині. В ряді випадків ця проблема вирішується застосуванням малих молекул, що взаємодіють з ДНК.

Загалом такі молекули-зонди зв'язуються нековалентно (не виникають хімічні зв'язки) з макромолекулою ДНК, фіксуючись між основами ДНК (інтеркаляція; при цьому утворюються специфічні Ван-дер-Ваальсівські зв'язки з площинами основ ДНК, рис.80,а), або ж у цукрово-фосфатних ланцюгах (зв'язування в боріздку, рис.80,б). Крім того, можливо так зване зовнішнє (чисто електростатичне Кулонівське) зв'язування.

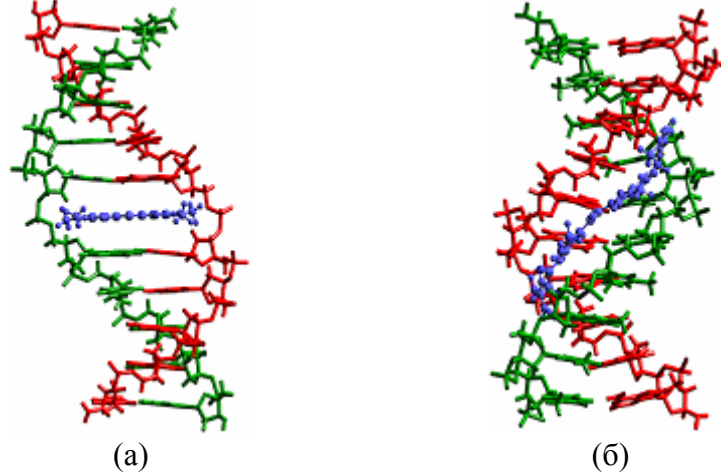


Рис.80. Типи зв'язування молекул-зондів з ДНК: (а) інтеркаляція, (б) зв'язування в боріздку

Основний принцип здійснення флюоресцентної детекції ДНК (як і РНК та протеїнів) полягає в наступному: Підбираються або ж спеціально синтезуються молекули, що мають значну кількість внутрішніх ступеней вільності. В таких молекулах ймовірність безвипромінювального переходу зі збудженого стану в основний, як правило, досить висока. Тому квантовий вихід флюоресценції, спричиненої поглинанням фотонів таких молекул, дуже низький (в ідеальному випадку близький до нуля). Розчини таких молекул фактично не проявляють флюоресценцію при збудженні світлом в смуги їх поглинання. Якщо ж дані молекули фіксуються (чи

зв'язуються) з іншими молекулами чи макромолекулами так, що можливі рухи їх атомів не можуть здійснюватись із-за стеричних затруднень (внутрішньо-молекулярні механічні ступені вільності стають «замороженими»), інтенсивність їх флюоресценції різко зростає. Як кажуть, в такій ситуації молекула зі збудженого стану в основний може перейти лише за рахунок випромінювання фотону флюоресценції. У випадку інтеркаляції інтенсивність флюоресценції молекул-зондів може зростати в тисячу раз; у випадку зв'язування в боріздку – в десятки (до сотні) раз. На рис.81

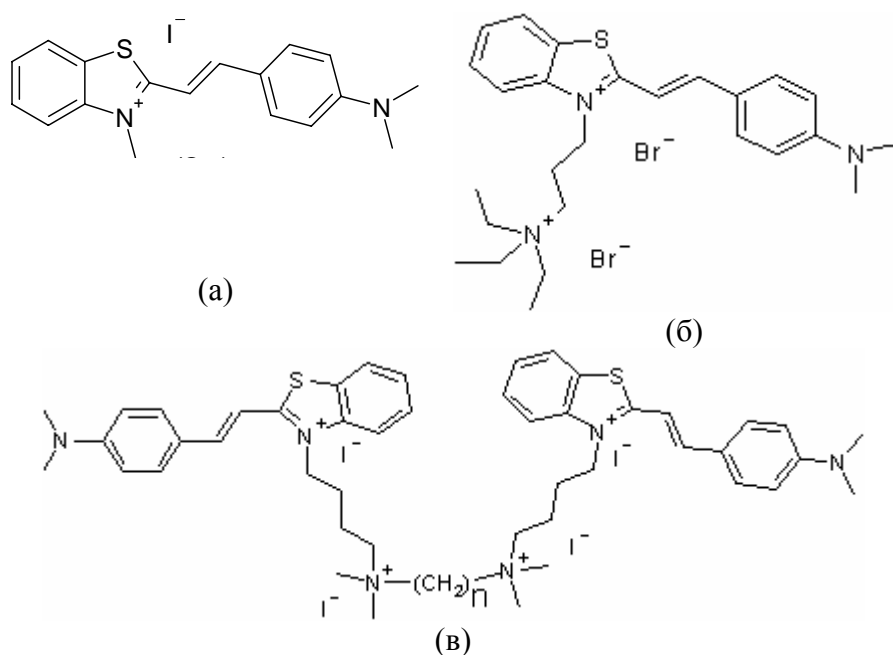


Рис.81. Хімічні формули барвників-зондів: (а) Sbt, (б) Bos-1, (в) DBos-25 (n=2), DBos-28 (n=3) та DBos-30 (n=6)

подано формули спеціально сконструйованих та синтезованих флюоресцентних молекул – зондів. Як приклад, наведемо флюоресцентні прояви інтеркаляційного зв'язування новітніх спеціально синтезованих барвників Sbt, Bos-1, DBos-25, DBos-28 та

DBos-30 (мова про останній вже йшла в підрозділі 2.2.1 пункт 5) з ДНК, представлених в роботі [49,51].

Як видно з рис.82 та рис.83, інтенсивність флюоресценції новітніх барвників (при однофотонному збудженні) зростає у декілька сотень разів у присутності ДНК.

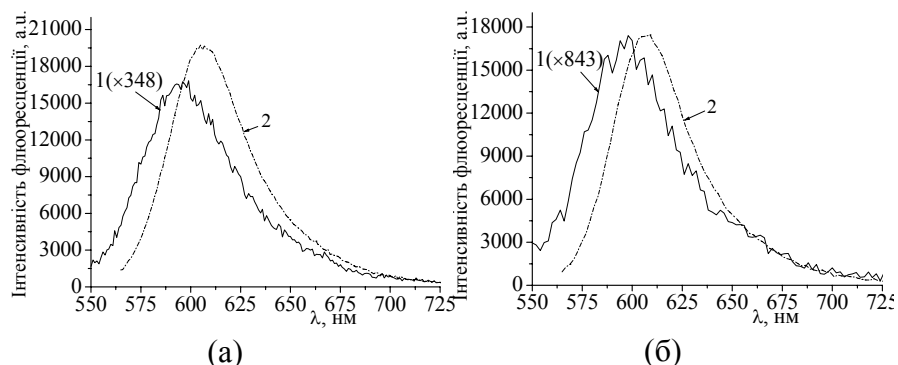


Рис.82. Спектри флюоресценції стирилових барвників: (а) DBos-25, (б) DBos-30 (концентрація 5×10^{-6} М) у водно-сольових розчинах без (1) та у присутності (2) ДНК (6×10^{-5} М п.о.)

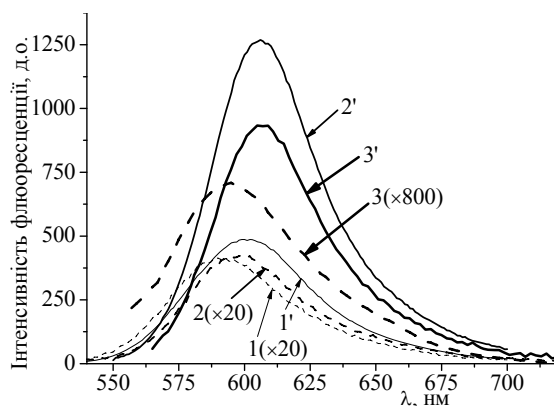


Рис.83. Спектри флюоресценції стирилових барвників: (1,1') Sbt, (2,2') Vos-1 та (3,3') DBos-28 (концентрація 5×10^{-6} М) у водно-сольових розчинах без (1, 2, 3) та у присутності (1',2',3') ДНК (6×10^{-5} М п.о.)

Отримані дані доводять передбачення стосовно зв'язування

барвника з макромолекулою ДНК. Таким чином, дані стирилові барвники можуть бути використані як флюоресцентні зонди для детекції ДНК. Барвники із сперминоподібною приєднаною групою мають більш високу чутливість до ДНК, ніж ті самі хромофори без відповідної групи.

4.2.2. Двофотонна флюоресцентна детекція ДНК

Двофотонна флюоресцентна детекція ДНК спрямована на застосування випромінювання, довжина хвилі якого припадає на діапазон довжин хвиль так званого вікна прозорості біологічних тканин (перше «вікно» відповідає діапазону 750÷1100 нм). Застосовуються барвники з високим квантовим виходом, що поглинають в видимому діапазоні. Якщо біля молекули такого барвника, за короткий проміжок часу 10^{-15} с, що відповідає характерному часу акту поглинання фотону молекулою, з'явиться «рій» інфрачервоних фотонів, згенерованих, наприклад, фемтосекундним потужним лазером, то два, чи більше фотонів може одночасно поглинутися (якщо їх сумарна енергія відповідає смузі поглинання молекули). Очевидно, що ймовірність двофотонного поглинання значно вища, ніж ймовірність одночасного поглинання трьох, чи більше фотонів. Таким чином можна збудити молекули-зонди, що знаходяться в глибині біологічних об'єктів. Рис.84 є ілюстрацією двофотонної детекції ДНК, рис.85 демонструє схему можливих фотофізичних процесів при двофотонному поглинанні.

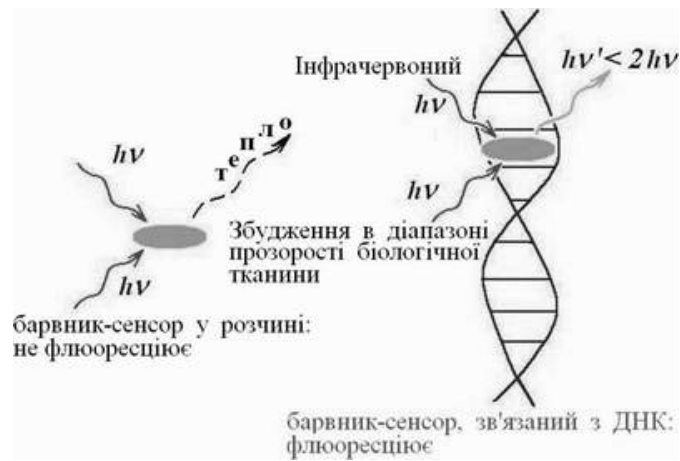


Рис.84. Принцип двофотонної детекції ДНК за допомогою молекули-зонда



Рис.85. Енергетична діаграма при двофотонному поглинанні молекулою-зондом ($2h\nu_{\text{поглин.}} \geq h\nu'_{\text{флюор.}}$)

Нижче наведено результати по двофотонному збудженні низки піридинових барвників (рис.86), синтезованих в Інституті Молекулярної Біології та Генетики НАН України (в порівнянні з класичним двофотонно-поглинаючим барвником Родамін В). При збудженні випромінюванням титан-сапфірового лазера з довжиною хвилі $\lambda \approx 840$ нм та тривалістю імпульса 90 фс спостерігається двофотонно збуджена флюоресценція барвників S33, Dst6 та D184 у присутності ДНК (рис.87). У табл.2 наведені значення перерізу двофотонного поглинання піридинових барвників, визначені на основі відомого значення для Родаміну В у спиртовому розчині.

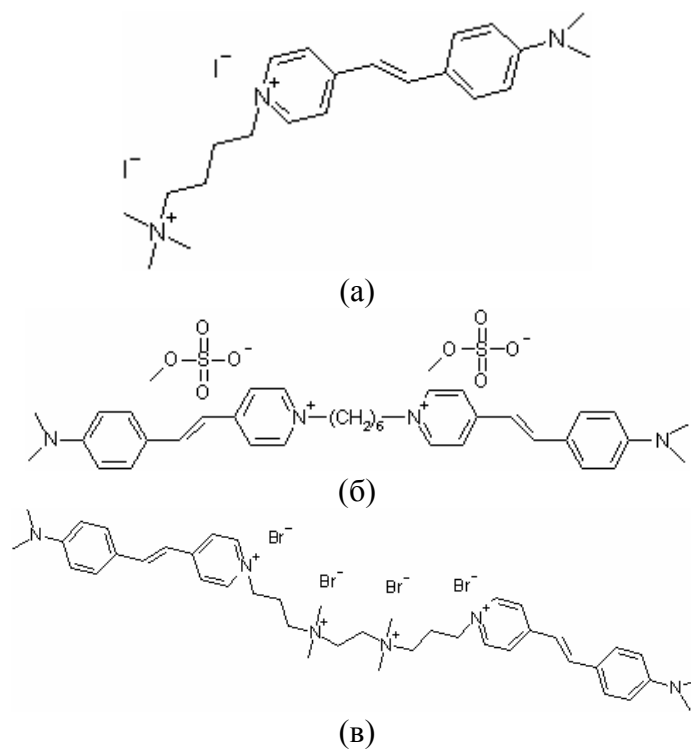


Рис.86. Хімічні формули двофотонно-поглинаючих барвників-зондів: (а) S33, (б) Dst6 та (в) D184

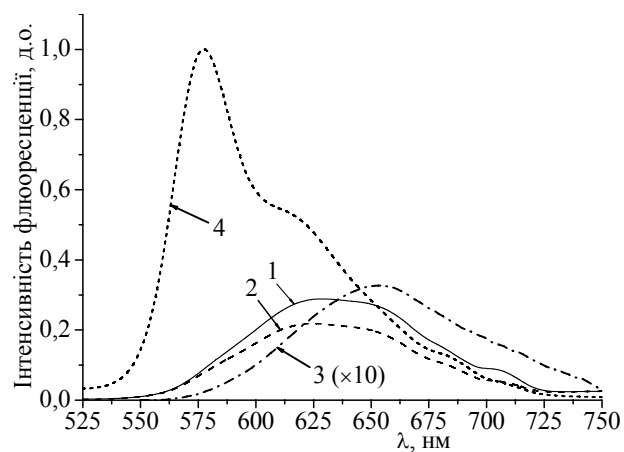


Рис.87. Двофотонно збуджена флюоресценція барвників-зондів: (1) S33, (2) Dst6, (3) D184 (у водно-сольових розчинах у присутності ДНК) та (4) Родаміну В (у спирті)

Таблиця 2. Значення перерізу двофотонного поглинання (δ)
піридинових барвників та Родаміну В

Барвник	$\delta, 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$
S33	318
Dst6	322
D184	51
Родамін В	210

Значення перерізу двофотонного поглинання для досліджених систем ДНК-барвник мають той же порядок або на порядок менші за відповідні значення для Родаміну 6G (у випадку наносекундного збудження) та Родаміну В (у випадку фемтосекундного збудження).

Нагадаємо [1], як описується процес двофотонного поглинання, і як вводяться параметри, що його характеризують.

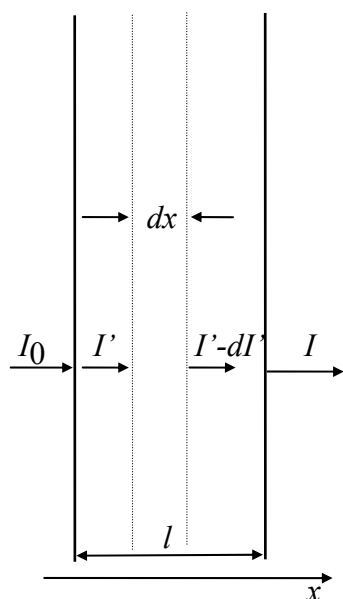


Рис.88. Схема процесів двофотонного поглинання

Як і у випадку однофотонного поглинання розглянемо однорідне середовище, на яке падає потік фотонів (рис.88). I_0 - інтенсивність світлового потоку, що падає на речовину, I - після проходження шару речовини товщиною l . Виділимо нескінченно тонкий шар речовини товщиною dx . Припустимо, що на цей шар падає потік фотонів інтенсивністю I' . На відміну від однофотонного при двофотонному поглинанні інтенсивність світла після проходження шару зменшується на величину

$$dI' = -\beta I'^2 dx. \quad (4.1)$$

Пропорційність $dI' \sim I'^2$ пов'язана з тим, що ймовірність «приходу» одного фотону в місце знаходження поглиначи $\sim I'$. Іншого фотону - $\sim I'$. Ймовірність складної події – приходу двох фотонів одночасно в окіл поглиначи дорівнює добутку ймовірностей цих двох незалежних подій, тобто ця ймовірність повинна бути пропорційна I'^2 .

$$\int_{I_0}^I \frac{dI'}{I'^2} = -\beta \int_0^l dx,$$

$$-\frac{1}{I'} \Big|_{I_0}^I = -\beta x \Big|_0^l, \quad \frac{1}{I} - \frac{1}{I_0} = \beta l, \quad \frac{1}{I} = \beta l + \frac{1}{I_0},$$

$$I = \frac{1}{\beta l + \frac{1}{I_0}} = \frac{I_0}{\beta I_0 l + 1}, \quad T = \frac{I(l)}{I_0} = \frac{1}{1 + \beta I_0 l}. \quad (4.2)$$

Таким чином, при $\beta, x = \text{const}$, якщо $I_0 \rightarrow \infty$, то $T \rightarrow 0$ – T зменшується зі збільшенням I_0 (на відміну від однофотонного поглинання, де $I = I_0 e^{-k l}$, а величина пропускання $T = \frac{I}{I_0} = e^{-k l}$ – не залежить від I_0). Величину β називають коефіцієнтом двофотонного поглинання. Його розмірність може бути отримана з тих міркувань, що в формулі 4.2 величина пропускання має бути безрозмірною. Якщо для розчинів ввести величину перерізу поглинання як величину коефіцієнта двофотонного поглинання, що припадає на одиничну концентрацію, то у випадку, коли концентрація подана в моль/см³, розмірність перерізу двофотонного поглинання буде см⁴·с/моль. В тому випадку, коли концентрація поглинаючих центрів дорівнює їх кількості в см³, маємо розмірність см⁴·с. Для зручності (у випадку подання

концентрації поглинаючих центрів в моль/л) величина перерізу ДФП вимірюється у Гьопперт-Майерах, ГМ ($1\text{ГМ}=10^{-50}\text{ см}^4\cdot\text{с/моль}$). Ефект двофотонного поглинання (ДФП) світла середовищем теоретично передбачено у 1931 р. лауреатом Нобелівської премії Марією Гьопперт-Майєр [81]. Саме в честь Марії Гьопперт-Майєр і введено назву одиниці вимірювання перерізу двофотонного поглинання 1 ГМ.

4.2.3. Деякі вимоги до флюоресцентних зондів

1. Фотостабільність. Очевидно, флюоресцентні зонди мають бути фотостабільними, тобто не руйнуватися під дією збуджучого світла. Індикаторами фотодеградації флюоресцентних зондів є падіння інтенсивності їх флюоресценції або ж оптичної густини в області їх власного поглинання (кажуть, оптичні центра даного типу «виходять з гри»). Нижче наведено деякі приклади дослідження фотостабільності молекулярних зондів [50, 51].

Оптична густина стирилового барвника DBos-30 (хімічна формула якого наведена на рис.81) з часом опромінення УФ-світлом ртутної лампи зменшується набагато швидше коли барвник знаходиться у «вільному» стані, ніж коли він знаходиться у присутності ДНК (рис.89) (тут і далі, на рис.89-93, оптична густина подана у % по відношенню до початкового значення незруйнованого зразка). З цього можна зробити висновок, що DBos-30 стає більш фотостабільним саме у присутності макромолекули ДНК.

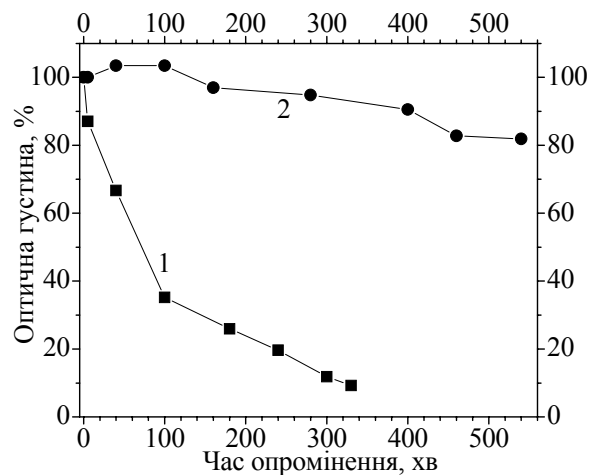


Рис.89. Вплив опромінення ртутною лампою (ДРТ-1000) на значення оптичної густини максимуму смуги поглинання барвника DBos-30 у «вільному» стані (1) та у присутності ДНК (2)

Порівняння таких залежностей (рис.90) для DBos-30 та відомого Тіазолового Оранжевого (ТО) барвника (у присутності ДНК) надає можливість зробити висновок, що DBos-30 є більш фотостабільним, ніж ТО у присутності макромолекули ДНК.

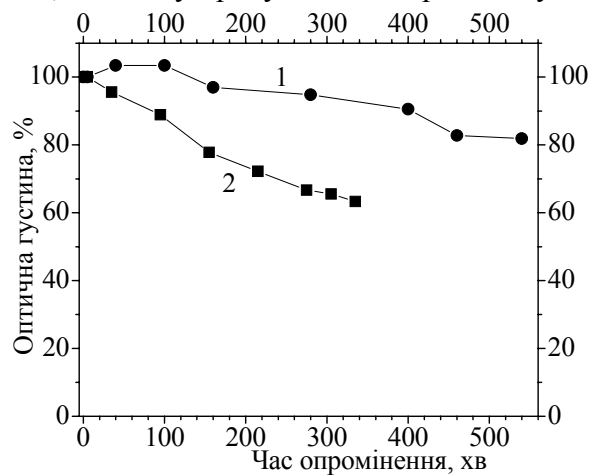


Рис.90. Вплив опромінення ртутною лампою (ДРТ-1000) на значення оптичної густини максимуму смуги поглинання барвників DBos-30 (1) та ТО (2) у присутності ДНК

2. Фототоксичність. Важливо, щоб люмінесцентні зонди, які застосовуються для вивчення живих клітин (наприклад, флюоресцентна мікроскопія), не були токсичними або фототоксичними.

Відомо, що пошкодження біологічного об'єкта може бути викликане пошкодженням люмінесцентного зонда, який контактує з цим об'єктом. Фототоксичний вплив молекули-барвника на ДНК може відбуватись або безпосередньо за допомогою передачі енергії збудження від барвника до нуклеїнових основ ДНК, або побічно через третю молекулу (наприклад, шляхом передачі енергії триплетного збудження до молекули кисню в результаті генерації токсичного синглетного кисню [82,83]). Смуги поглинання (пов'язані з першим електронним переходом) ДНК, РНК і нуклеотидів розташовані у ближній УФ-області спектра з максимумами поблизу 260 нм. У той же час, відповідні смуги поглинання більшості барвників, які використовуються в якості люмінесцентних зондів, розташовані у видимій області спектру (більше 400 нм) [23]. Справа в тому, що перші збуджені синглетні та триплетні енергетичні рівні барвників розташовані істотно нижче, ніж відповідні рівні будь-яких нуклеотидів (ланок ДНК). Це не дозволяє існувати передачі енергії збудження від барвника з ДНК, що унеможлиблює безпосередній вплив барвника на ДНК. Проте, малі молекули (в основному порфірини), які руйнують ДНК опосередковано шляхом генерації синглетного кисню, добре відомі і використовуються в фотодинамічній терапії. Нещодавно нами було показано [49-51,84], що інтенсивність флюоресценції бензотіазолових стирілових барвників збільшується на 2-3 порядки, коли вони зв'язані з ДНК. Крім того, ці барвники

демонструють достатню ефективність двофотонного поглинання [49,51,84]. Нижче наведено приклади досліджень фототоксичності молекулярних флюоресцентних зондів.

Барвник DBos-30, мова про який вже йшла вище, не чинить фототоксичного впливу на ДНК, оскільки значення оптичної густини максимуму смуги поглинання ДНК у присутності барвника DBos-30 при УФ-опроміненні практично не змінюється на протязі тривалого часу опромінення (рис.91). Опромінення більшості барвників такого типу (зв'язаних з ДНК) також не змінюють значення оптичної густини максимуму смуги поглинання ДНК. Це свідчить про їх безпечність для ДНК.

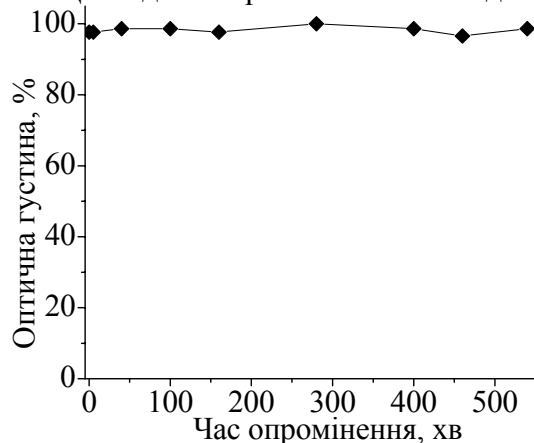


Рис.91. Вплив опромінення ртутною лампою (ДРТ-1000) на значення оптичної густини максимуму смуги поглинання ДНК у присутності барвника DBos30

На відміну від попередніх барвників, опромінення барвника DstMdo (рис.92) (що за хімічним складом близький до Sbt), зв'язаного з ДНК, демонструє зменшення (в межах 10%) оптичної густини максимуму смуги поглинання ДНК (рис.93). Це означає, що на відміну від стиролових барвників DstMdo чинить фототоксичну дію на макромолекулу ДНК.

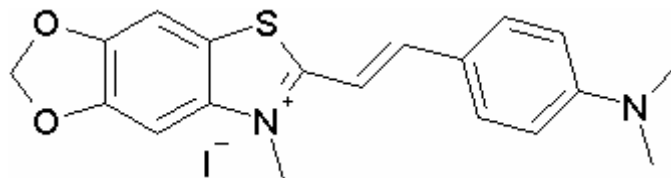


Рис.92. Хімічна формула барвника DstMdo

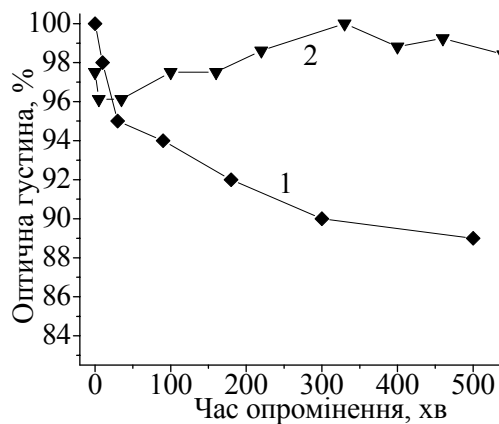


Рис.93. Вплив опромінення ртутною лампою (ДРТ-1000) на значення оптичної густини максимуму смуги поглинання ДНК у присутності барвників:
(1) DstMdo та (2) Sbt

4.2.4. Отримання внутрішньоклітинних флюоресцентних зображень за допомогою молекулярних зондів

У випадку проникнення флюоресцентних молекулярних зондів в клітину останні можуть зв'язуватися з внутрішньоклітинними біологічними молекулами. При освітленні таких клітин світлом з довжиною хвилі, що відповідає смугам поглинання молекул-зондів, збуджується їх флюоресценція. Це світіння разом з випромінюванням інших молекул-зондів, що специфічно зв'язуються з іншими біологічними внутрішньоклітинними об'єктами, дає флюоресцентну картину клітини. Таким чином, створюється флюоресцентне зображення

клітини, що дозволяє визначення положення внутрішньоклітинних об'єктів. Нижче наведено приклади створення флюоресцентного зображення клітини за рахунок зв'язування молекул-зондів (стиролових барвників Bos-3 та Dbos-21, рис.94) з макромолекулами ДНК в клітині. Ці барвники проникають глибоко в живу клітину і за допомогою ОФП та ДФП забарвлюють її.

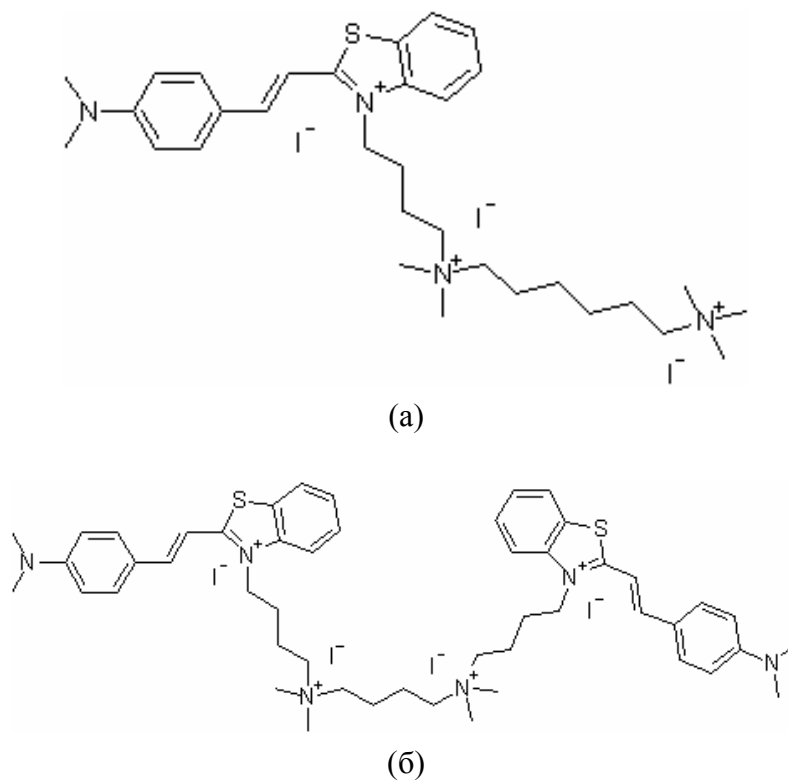


Рис.94. Хімічні формули барвників-зондів: (а) Bos-3, (в) Dbos-21

На рисунках 95-98 представлені (зліва-направо) пропускання, флюоресценція і комбіноване зображення.

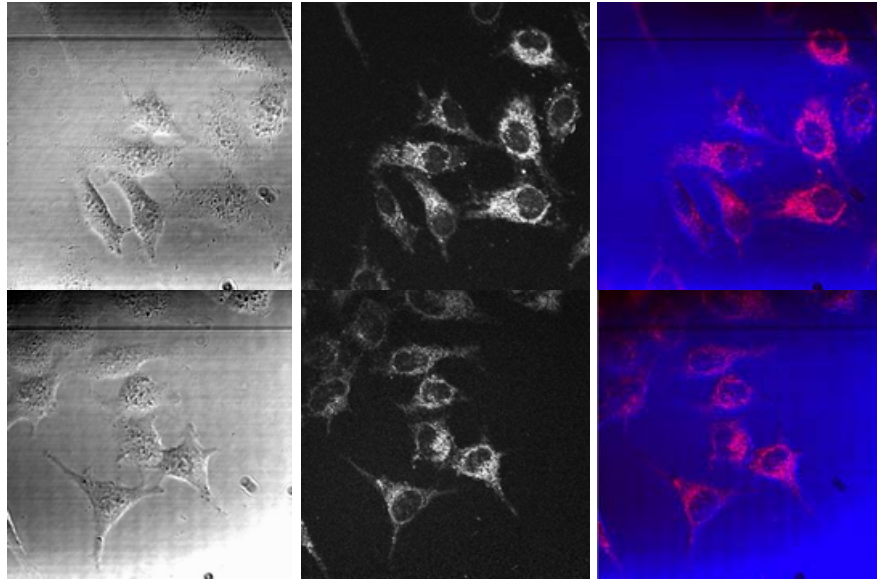


Рис.95. Клітини HeLa, витримані протягом 1 год з Dbos-21 (5 мкМ) і візуалізовані за допомогою двофотонного збудження $\lambda=880$ нм з фемтосекундного імпульсного титан-сапфірового лазера (Tsunami, Spectra Physics)

Bos-3 (рис.97) демонструє аналогічну картину забарвлення, але зі значно меншим клітинним поглинанням, ніж DBos-21 (рис.96).

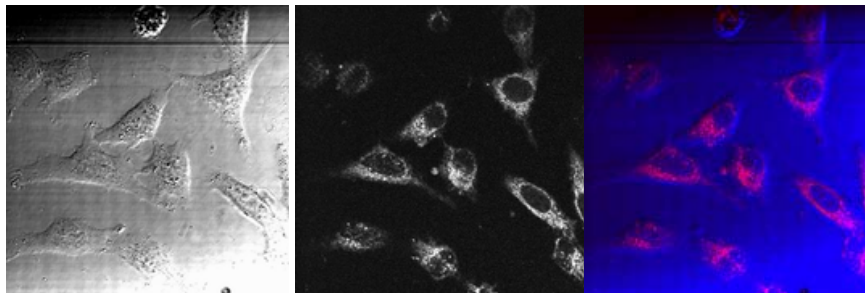


Рис.96. Клітини HeLa, витримані протягом 1 год з Dbos-21 (5 мкМ)

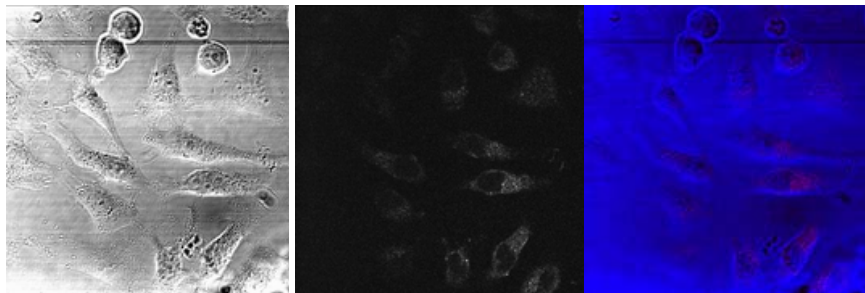


Рис.97. Клітини HeLa, витримані протягом 1 год з Bos-3 (5 мкМ)
Dbos-21 демонструє специфічну картину забарвлення мітохондрії.

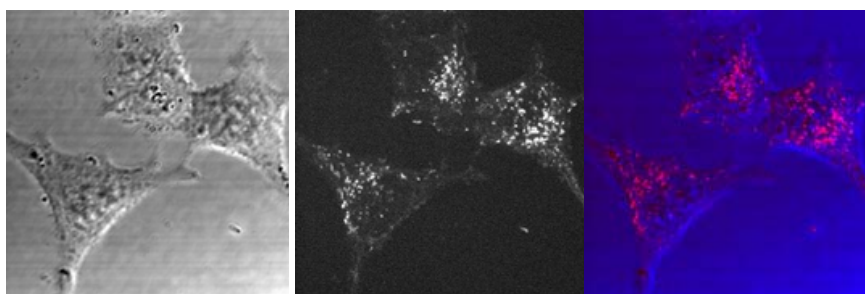
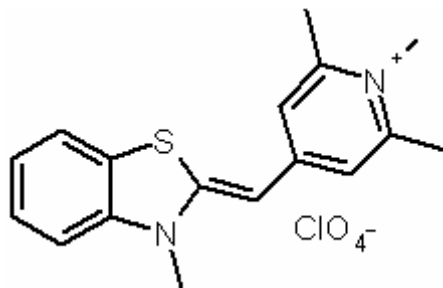


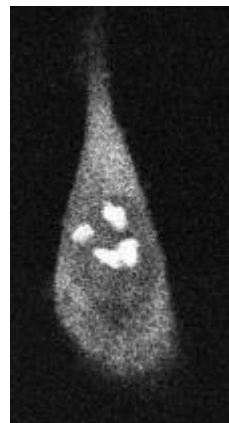
Рис.98. Мітохондрії, витримані протягом 1 год з Dbos-21 (5 мкМ)

4.2.5. Двофотонна флюоресцентна детекція РНК

На відміну від ДНК, зв'язування молекулярних зондів відбувається неінтеркаляційним шляхом (залягання в боріздку або зовнішнє зв'язування). Тому зростання інтенсивності флюоресценції зондів в цьому випадку, як правило, відбувається в десятки (а не сотні, як при інтеркаляції) раз. Однак, цього досить для флюоресцентної детекції РНК та отримання відповідних внутрішньоклітинних флюоресцентних зображень при використанні флюоресцентного мікроскопу. Нижче наведено деякі приклади флюоресцентної детекції РНК та отримання внутрішньоклітинних зображень.



(а)



(б)

Рис.99. Хімічна формула (а) та ракова клітина (б), забарвлена барвником Суан 40

Спільною українсько-американською групою вчених було застосовано барвник Суан40 для збудження 2-фотонної флюоресцентної детекції РНК і відображення живої клітини [85]. На рис.99 зображено клітину раку порожнини рота (клітини фарбували ціаніновим барвником Суан40). Барвник

концентрується в ядрі клітини і флюоресціює синьо-зеленим кольором. Проте, значення перерізу ДФП Cyan40 в присутності ДНК, збудженого на 860 нм, було оцінено як ~ 10 ГМ (нагадуємо, $1 \text{ ГМ} = 10^{-50} \text{ см}^4 \text{с}$). Таким чином, на основі отриманих даних можуть бути розроблені зонди з більш високими значеннями ефективності 2-фотонного збудження флюоресценції і при різній довжині хвилі збудження.

Ще раз зазначимо, що оптичну детекцію біологічних об'єктів та отримання внутрішньоклітинних зображень можна здійснювати не лише використовуючи зміни інтенсивності флюоресценції молекулярних зондів, а і використовуючи зміни часів затухання флюоресценції при зв'язуванні (що в ряді випадків є більш чутливим методом, як це показано групами дослідників в м.Баффало (США) [85-87] та м.Страсбурзі (Франція) [88]); поляризацію випромінювання; ефекти, пов'язані з перенесенням енергії електронного збудження (ЕЕЕТ), агрегатами барвників [46, 84,89]. Досить наглядним, наприклад, є різке зростання ступеню поляризації флюоресценції малої молекули-зонду при її зв'язуванні з порівняно масивним біологічним об'єктом (ДНК, РНК чи білком).

4.2.6. Флюоресцентна детекція білків

Просторова структура білків, які часто зазвичай мають глобулярну конформацію, є унікальною. Деякі барвники здатні зв'язуватися з окремими білками і підвищувати при цьому інтенсивність флюоресценції. Особливо багато барвників зв'язуються з сироватковими альбумінами, тому що ці білки виконують в організмі транспортну функцію і містять сайти, які

зв'язують різноманітні малі молекули. Разом з тим, підібрати зонд, який відчував би білки незалежно від виду білку (неспецифічна детекція) – непросте завдання. Тому для неспецифічного визначення білків їх зазвичай вносять в середовище, що містить додецилсульфат натрію (ДСН). ДСН є поверхнево-активною речовиною, що денатурує білок і утворює міцели навколо його неполярних амінокислотних залишків. А оскільки такі міцели мають однакову структуру незалежно від денатурованого білку, можна підібрати барвник, що зв'язувався б з такою міцелою (наприклад, на рис.100). Ряд барвників, чутливих до ДСН-денатурованого білку, є комерційно доступними, наприклад, продукти SYPRO Orange та SYPRO Red фірми Thermo Fisher Scientific [90].

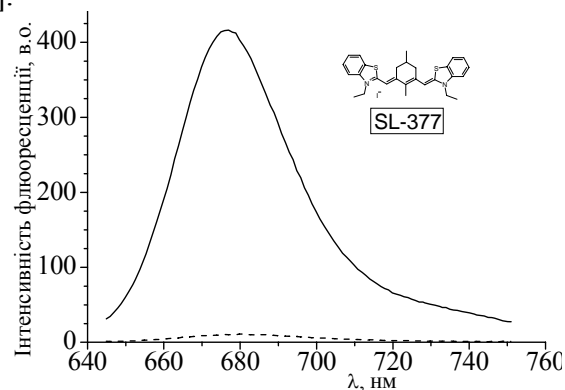


Рис.100. Спектри флюоресценції барвника SL-377 за відсутності (пунктир) та в присутності (суцільний) бичачого сироваткового альбуміну, денатурованого додецилсульфатом натрію, а також структура барвника [90,91,92]

Розділ 5

Прикладні аспекти біофотоніки. Аутофлюоресцентна діагностика ракових захворювань

Останні десятиліття інтенсивно розвиваються люмінесцентні методи діагностики захворювань внутрішніх органів людини в медицині, коли за допомогою світловодів збуджувальне випромінювання вводиться всередину досліджуваного органу, а через іншу або ту ж саму групу світловодів люмінесцентне випромінювання виводиться назовні, реєструється й аналізується. В медичній літературі є відомості про те, що таким чином можна виявляти онкологічні захворювання внутрішніх органів на ранніх стадіях їх розвитку [93-95].

Рак – це злоякісна пухлина незалежно від її тканинного походження. У свою чергу, злоякісна пухлина – це надмірне розростання тканин, що складаються зі змінених клітин живого організму, які втратили свої звичні форму та функції; злоякісна пухлина проростає в оточуючі тканини та руйнує їх [96].

Рання діагностика ракових захворювань має три життєво важливих аспекти:

- 1) дозволяє виявити ракову пухлину тоді, коли та має ще невеликі розміри і локалізована, що спрощує її лікування чи видалення;
- 2) збільшує шанси хворого на видужання;
- 3) забезпечує хворому більше років життя.

5.1. Взаємодія оптичного випромінювання з біологічними тканинами

Люмінесцентна діагностика злоякісних пухлин ґрунтується відмінності в інтенсивності і в спектральному складі *власної флюоресценції* (або *аутофлюоресценції (АФ)*) здорової та ураженої пухлиною тканини у видимому або ближньому ІЧ діапазоні спектра при збудженні її випромінюванням УФ або видимого вибіркової накопичення *фотосенсибілізатора* в тканині злоякісного новоутворення та можливості його виявлення за його характерною флюоресценцією при лазерному збудженні [93]. Перевагою першого методу є те, що пацієнту не потрібно приймати або йому внутрішньо жодних хімічних препаратів.

З точки зору оптики, біологічна тканина являє собою неоднорідне розсіювальне середовище, що досить швидко змінюється з часом, переміщується у просторі і погано пропускає світло. При цьому будь-який орган має багат шарову структуру і шарам можуть бути притаманні абсолютно різні оптичні властивості, які змінюються від людини до людини, залежать від часу, виду і стадії захворювання тощо [94].

Випромінювання, що падає на тканину, може нею поглинатися, відбиватися, розсіюватися або збуджувати її флюоресценцію (якщо це випромінювання має потрібну довжину хвилі). Можливість використання флюоресценції тканин для діагностики захворювань викликає інтерес у науковців і медиків з того часу, як було помічено, що спектральні властивості ураженої тканини відрізняються від властивостей здорової [97].

При утворенні злоякісної пухлини змінюється структура самої тканини та відбуваються зміни в її обміні речовин. В

результаті цього змінюються умови поширення світла крізь тканину та змінюються концентрації природніх флюорофорів у ній. Останнє може бути виявлене за допомогою спектральних методів, що дозволяє проводити люмінесцентну діагностику онкологічних захворювань людини, зокрема раку легенів, молочної залози, органів травної системи, ротової порожнини, шкіри тощо [93,98].

Для збудження АФ тканин використовують імпульсні (зокрема, азотний (337 нм) та ексимерний ХеСІ (308 нм)) та неперервні газові лазери (криптоновий (407 нм), гелій-кадмієвий (442 нм), аргонний (488 нм) та гелій-неоновий (633 нм)), напівпровідникові лазери (532 нм), ртутну або імпульсну ксенонову лампи з набором вузькосмугових світлофільтрів. Зауважимо, що збуджувальне випромінювання більшої довжини хвилі проникає у тканину на більшу глибину. Також слід зазначити, що більшість біологічних тканин є прозорими в інтервалі довжин хвиль 600-1000 нм [94,99].

5.2. Аутофлюоресцентна ендоскопія і бронхоскопія

Візуальне спостереження АФ тканин і внутрішніх органів (аутофлюоресцентна візуалізація) дозволяє суттєво збільшити можливості традиційних методів діагностики, таких як *ендоскопія* (обстеження внутрішніх органів людини за допомогою ендоскопа – тонкого довгого шланга з освітленням і відеокамерою на кінці) та *бронхоскопія* (обстеження трахеї і бронхів за допомогою ригідних (прямих) бронхоскопів і гнучких бронхо-фіброскопів (різновидів ендоскопа)) у білому світлі) для виявлення ракових пухлин на ранніх стадіях їх розвитку.

Для проведення аутофлюоресцентної ендоскопії

(бронхоскопії) потрібні сам ендоскоп (бронхоскоп), джерело світла для збудження флюоресценції та система реєстрації вихідного випромінювання.

Візуалізація уражень внутрішніх органів (зокрема трахеї і бронхів) традиційними методами може бути технічно складною, оскільки товщина шару ураження може складати лише кілька клітин, а діаметр поверхні може складати лише кілька міліметрів. Ефективнішим методом виявлення є використання відмінності у флюоресцентних властивостях нормальної та ураженої слизових оболонок тканин [97].

У роботі [100] було продемонстровано, що аутофлюоресцентна бронхоскопія (АФБ) являє собою дуже чутливий метод ранньої діагностики раку бронхів.

5.3. Природні флюорофори у біологічних тканинах, які можуть бути використані для діагностики раку

У біологічних тканинах центрами люмінесценції (природними *флюорофорами*) є обмежена кількість біологічно важливих молекул, які або ж входять до складу самих тканин, або ж беруть участь у їх обміні речовин. До таких природних флюорофорів належать [58,101,102] (див. також Розділ 2):

- ✓ ароматична амінокислота *триптофан* (див. підрозділ 2.1.2);
- ✓ структурний білок *колаген* (максимум смуги збудження флюоресценції $\lambda_{зб} = 330$ нм, максимум смуги флюоресценції $\lambda_{фл} = 380$ нм);
- ✓ структурний білок *еластин* (максимум смуги збудження флюоресценції $\lambda_{зб} = 350$ нм, максимум смуги флюоресценції $\lambda_{фл} = 410$ нм);

- ✓ відновлена форма коферменту *нікотинамідаденіндинуклеотиду* (*NADH*) (кофермент – це невелика небілкова (неамінокислотна) молекула, що вільно зв'язується з ферментом та важлива для його каталітичної активності; за участю коферменту *NADH* каталізуються оборотні реакції окиснення, що відбуваються при енергетичному обміні та в процесі дихання усіх без винятку живих клітин) (див. підрозділ 2.1.4.1);
- ✓ окиснена форма коферменту *флавінаденіндинуклеотиду* (*FAD*) (цей кофермент бере участь у багатьох окисно-відновних біохімічних процесах) (див. підрозділ 2.1.4.2);
- ✓ *флавіни* (пігменти жовтого кольору з інтенсивною зеленою флюоресценцією) (максимуми смуг збудження флюоресценції $\lambda_{зб} = 220, 260, 380$ та 460 нм, максимум смуги флюоресценції $\lambda_{фл} = 550$ нм);
- ✓ *порфірини* (азотовмісні пігменти, що входять до складу небілкової частини молекули гемоглобіну, хлорофілу, низки ферментів) (див. підрозділ 2.1.4.3).

У серії експериментів було продемонстровано, що спектри АФ у багатьох випадках дозволяють визначити механізм дихання біологічної тканини (дихання – це використання кисню клітинами та тканинами для окиснення органічних речовин з вивільненням енергії, необхідної для їх життєдіяльності). Так, при УФ збудженні спостерігаються компоненти дихального ланцюга клітин, здатні флюоресціювати. Ті компоненти, які відповідають кисневому (аеробному) способу дихання, флюоресціюють у синій області спектра, а безкисневому (анаеробному) – у зеленій [94].

5.4. Природа зміни АФ тканин при ракових захворюваннях

Зміна інтенсивності АФ та її кольору може бути пов'язана зі зміною товщини епітелію, підвищеним кровопостачанням злоякісного утворення внаслідок васкуляризації – новоутворення кровоносних судин (гемоглобін крові поглинає практично все випромінювання у зеленій області спектра), природнім накопиченням в пухлині ендогенних (тобто належних самому організму) порфіринів, надлишковим виробництвом молочної кислоти раковими клітинами внаслідок їх підвищеної гліколітичної активності (гліколіз – процес розпаду глюкози, який супроводжується виділенням енергії у живій клітині), а також зміною концентрації і ступеня окиснення молекул флюорофорів [102].

5.5. Спектральні прояви злоякісних новоутворень у тканинах

Сьогодні науковці виділяють наступні ознаки наявності злоякісної пухлини у певному органі або тканині тіла людини при спостереженні її АФ:

- *відмінність в інтенсивності свічення* ураженої раком та здорової тканин, що флюоресціюють [93,103];
- *відмінність у кольорі свічення (зміна форми спектра)* ураженої та здорової тканин, що флюоресціюють [97,102,104-107];
- *поява (або зникнення) у спектрі АФ ураженої тканини характерних смуг*, які відсутні (або присутні) у спектрі здорової тканини [108];

- зміна *відношення інтенсивності певної смуги флюоресценції до інтенсивності відбитого або розсіяного зразком пучка світла* [100,109,110];
- *відмінність у часі загасання певної смуги флюоресценції для ураженої та здорової тканини* [111].

5.5.1. Відмінність в інтенсивності свічення

При проведенні АФБ легенів було виявлено, що пухлина має вигляд затемненої ділянки на фоні інтенсивної зеленої АФ нормальної слизової оболонки бронха при її освітленні синім світлом (наприклад, випромінюванням He-Cd лазера з довжиною хвилі 442 нм). Це може бути наслідком зменшення інтенсивності зеленої АФ колагену підслизового шару бронха внаслідок зменшення прозорості слизу, потовщення епітелію (який екранує збуджувальне і флюоресцентне випромінювання) та заміщенням слизового шару раковими клітинами [93].

Враховуючи те, що збуджувальне випромінювання з більшою довжиною хвилі має більшу проникну здатність [99], автори роботи [103] вивчали АФ тканин і органів людини у ближній інфрачервоній (БІЧ) області спектра (700-1000 нм) при лазерному збудженні на довжинах хвиль 532 нм або 633 нм. Вони виявили, що за таких умов збудження АФ вдається одержувати контрастні зображення ракової пухлини на фоні здорової тканини, добре спостерігати границю пухлини та виявляти пухлини розміром від 1 мм.

Як відомо, з усіх природних флюорофорів поглинають світло у червоній області спектра лише порфірини, які флюоресціюють у червоній та БІЧ областях [112]. Зростання інтенсивності БІЧ АФ

ракових пухлин у печінці та грудях пов'язується авторами [103] з відомим з літератури фактом зростання вмісту порфіринів в уражених раком тканинах. У той же час ними було виявлено, що інтенсивність БЧ АФ ракових пухлин у нирках і сечовому міхурі зменшується порівняно зі здоровою тканиною. Тому ці автори висловлюють припущення, що БЧ АФ тканин може бути також зумовлена іншими біомолекулами (не порфіринами), які по-різному розподіляються між ураженими та здоровими тканинами.

5.5.2. Відмінність у кольорі свічення (зміна форми спектра)

У роботі [102] дослідження бронхів здійснювалися за допомогою метода АФБ з використанням He-Cd лазера (442 нм) малої потужності (100 мВт) для збудження АФ епітелію бронха, двох ПЗЗ-камер з підсиленням зображення із вузькосмуговими зеленим та червоним світлофільтрами відповідно, комп'ютера з блоком візуалізації та кольорового монітора. Два зображення однієї

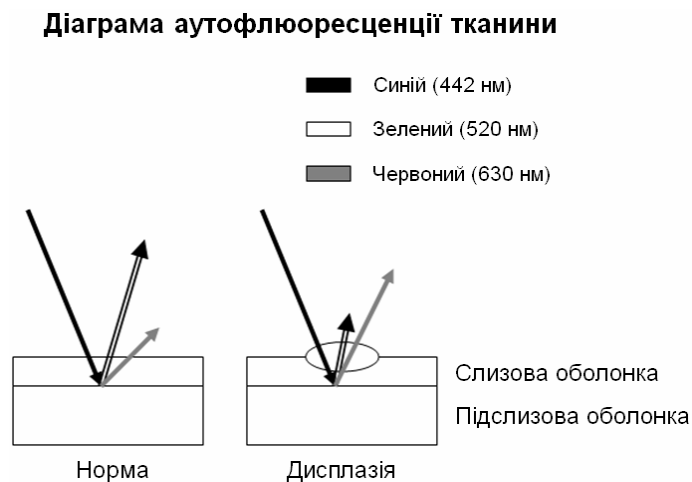


Рис.101. Аутофлюоресценція нормальної слизової оболонки

бронха та слизової оболонки з дисплазією [102] і тієї ж ділянки тканини у зеленому та червоному світлі одночасно реєструються блоком візуалізації. Коли нормальний епітелій бронха освітлюється синім випромінюванням лазера, він дає смугу АФ зеленого кольору (520 нм). Передракові зміни у тканині призводять до зміни кольору АФ на червоно-коричневий (630 нм), як показано на рис.101.

Інші дослідження легенів показали, що при дисплазії (порушення нормального розвитку тканини або органу, яке не є злоякісним) та карциномі (злоякісній пухлині, клітини якої походять від епітеліальної тканини) проявляється дещо слабша АФ у червоній області та значно слабша в зеленій у порівнянні зі здоровою тканиною при освітленні синім світлом [97].

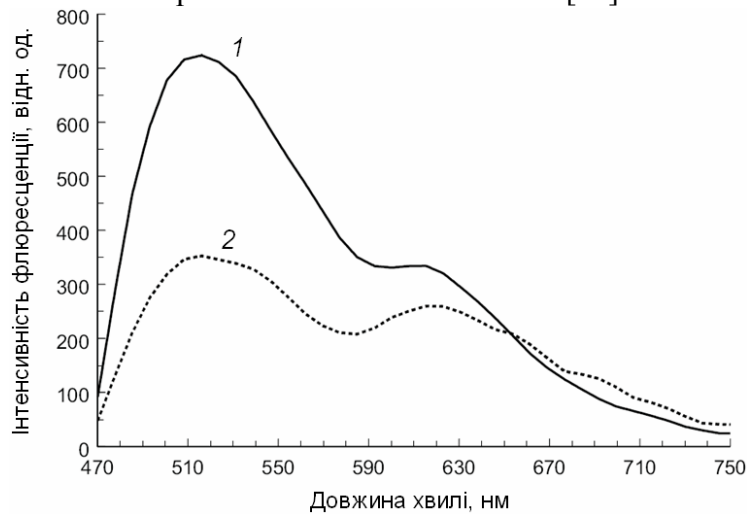


Рис.102. Спектри аутофлюоресценції нормальної тканини стравоходу (1) та тканини з дисплазією (2) [104]

Автори [104] використали спектральні характеристики аутофлюоресценції при дослідженні захворювань шлунково-кишкового тракту. Так, на рис.102 подано спектри АФ нормальної

тканини стравоходу та тканини з дисплазією. Зелена смуга флюоресценції ураженої тканини менша за інтенсивністю, ніж у здорової тканини, в той час як відношення інтенсивностей червоної та зеленої смуг більше, ніж у здорової тканини.

При збудженні нормального епітелію бронха синім світлом він флюоресціює зеленим світлом, але по мірі розвитку у ньому дисплазії, карциноми й інвазивного раку (раку, який, виникнувши в одному органі, потім поширюється на сусідні тканини й органи) відбувається поступове зменшення інтенсивності зеленої АФ внаслідок збільшення товщини епітелію та збільшення інтенсивності червоної АФ уражених ділянок тканини внаслідок її васкуляризації (новоутворення кровоносних судин) [105].

У роботі [105] в ролі кількісного критерію для відокремлення ракових тканин від нормальних було запропоновано відношення середнього потоку червоного випромінювання (АФ або відбитого від зразка) до потоку зеленого випромінювання (АФ) від певної ділянки слизової оболонки бронха, що реєструються ПЗЗ-матрицею (R/G відношення). Для збудження АФ використовувались виділені світофільтрами фіолетові та сині лінії ртутної лампи (395-445 нм). Тканина також освітлювалась червоним випромінюванням згаданої лампи (675-720 нм). АФ спостерігалась у зеленій (480-520 нм) та червоній (≥ 625 нм) областях. Було виявлено, що раковим та передраковим новоутворенням відповідає відношення $R/G > 0,54$, а нормальним – $R/G < 0,54$. Метод відношення різнокольорових флюоресцентних потоків дозволяє суттєво підвищити чутливість і надійність метода аутофлюоресцентної візуалізації злоякісних пухлин.

У роботі [106] проводився аналіз кольорових АФ зображень

слизової оболонки бронхів у колірному просторі RGB з використанням програмного пакету MATLAB. Автори виявили, що ідеальним кількісним індикатором для ранньої діагностики раку легень є відношення індексів зеленого (G) та блакитного (B) кольорів зображень тканини (G/B). Так, відношення G/B для нормальної слизової оболонки бронха є набагато більшим за відповідне відношення для ураженої тканини і суттєво зменшується по мірі розвитку злоякісних новоутворень.

У роботі [107] використовувався He-Cd лазер, що генерував випромінювання на довжинах хвиль 325 та 442 нм. Флюоресцентне зображення досліджуваної тканини зі спектральним розділенням реєструвалося ПЗЗ-матрицею, здатною працювати в умовах слабого освітлення та придатною для проведення фотометричних вимірювань.

Випромінювання АФ тканин пропускалося через інтерференційні світлофільтри з максимумами пропускання на довжинах хвиль 380, 395, 440, 470, 560 та 590 нм. Найкращу дискримінацію уражених раком тканин вдалося одержати за допомогою діагностичного параметра K , який визначався через нормовані (виміряні в однакових експериментальних умовах) інтенсивності АФ тканини на довжинах хвиль 395, 440 та 590 нм:

$$K = \frac{I_{440} - I_{395}}{I_{590}}$$

Як виявилось, тканинам з пухлинами відповідало значення $K < 1,0$. Автори підкреслюють, що таке порогове значення діагностичного параметра K відповідає лише конкретній експериментальній установці. Для інших установок воно може бути іншим.

5.5.3. Поява або зникнення характерних смуг

Автори [108] спостерігали в ракових тканинах різного походження характерні червоні смуги АФ з максимумами на довжинах хвиль 630 та 690 нм, які, як було ними показано, відповідають флюоресценції порфіринів (рис.103).

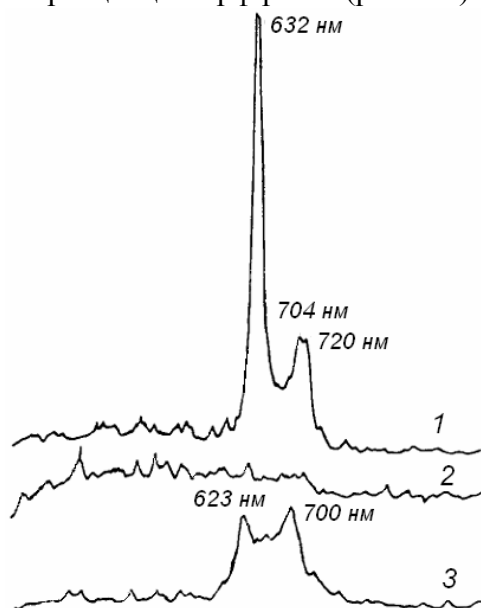


Рис.103. Спектр АФ шкіри, ураженої плоскоклітинним раком: 1 – ракова область, 2 – нормальна область, 3 – похідна гематопорфірину НрD [108]

5.5.4. Зміна відношення інтенсивності смуги флюоресценції до інтенсивності розсіяного зразком пучка

Дослідники виявили, що відношення інтенсивності флюоресценції до інтенсивності розсіяної лазерної лінії чітко корелює з типом досліджуваної біологічної тканини і залишається стабільним навіть при значній зміні експериментальних

параметрів. Нормування на розсіяну назад лазерну лінію дозволило свічення пухлин у червоному діапазоні (зумовлене природнім накопиченням у них ендогенних порфіринів) вимірювати кількісно і проводити у багатьох важливих випадках суттєво спрощену, проте ефективну флюоресцентну діагностику без введення фотосенсибілізаторів [94].

Ідентифікувати та кваліфікувати походження змін в уражених пухлинами тканинах на практиці важко, в першу чергу через спотворення, що з'являються у спектрі флюоресценції тканини внаслідок розсіювання та поглинання. Позбавитися таких спотворень можна шляхом одночасної реєстрації спектрів флюоресценції та розсіювання. Саме таким чином у роботі [109] за спектрами власної флюоресценції NADH та колагену вдалося ідентифікувати здорову та уражену тканини.

У спектрах АФ здорових і уражених раковими пухлинами тканин слизової оболонки шлунку людини, які знаходилась у фізіологічному розчині (спеціально приготовленому водному розчині хлориду натрію, близькому за своїми властивостями до плазми крові), збуджених випромінюванням азотного лазера (337 нм), автори [110] спостерігали одну смугу з максимумом 460 нм, яка відповідає АФ молекули NADH (рис.104). На рисунку подані спектри АФ здорової та ураженої слизової оболонки шлунку, нормовані на інтенсивність вузької короткохвильової лінії, яка є розсіяною зразком лінією випромінювання плазми газорозрядної трубки азотного лазера. З рисунку видно, що відносна інтенсивність смуги АФ здорової тканини як мінімум вдвічі більша за інтенсивність АФ тканини, ураженої злоякісною пухлиною, у порівнянні з розсіяною лінією випромінювання газового розряду.

Інтенсивність смуг АФ зменшувалася з часом, що пройшов після препарування досліджених тканин. Це може бути зумовлене незворотними процесами у живих клітинах, які супроводжуються зменшенням кількості центрів свічення, а у випадку молекули NADH – її переходом в окиснену форму NAD^+ , яка не дає помітної люмінесценції при збудженні випромінюванням азотного лазера (337 нм) [101].

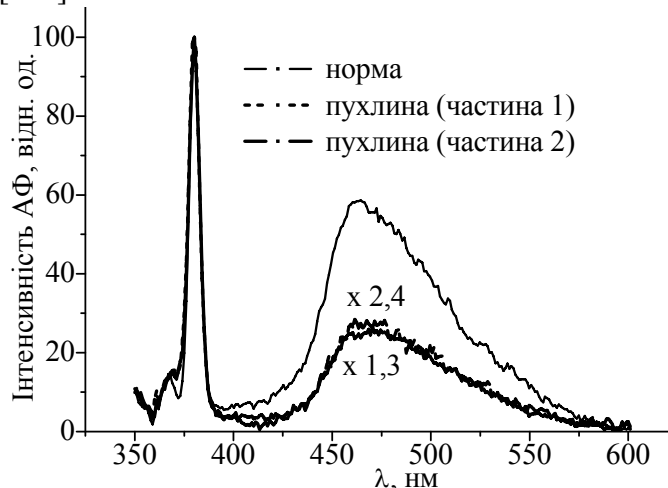


Рис.104. Нормовані спектри АФ здорової та ураженої тканин шлунку людини. Вузька лінія з максимумом 380 нм відповідає розсіяній зразком лінії випромінювання газового розряду в трубці азотного лазера [110]

У роботі [100] уражені тканини бронхів по черзі опромінювалися або лише синім випромінюванням (430 ± 30 нм), що ефективно збуджує АФ тканин, або одночасно згаданим синім та червоним (665 ± 15 нм) випромінюванням, яке просто розсіювалося тканиною. Було виявлено, що давання розсіяного червоного світла дозволяє збільшити контраст між здоровими і хворими тканинами (R/G відношення) у 2,7 разів.

5.5.5. Відмінність у часі загасання

Недоліком аутофлюоресцентної діагностики є те, що колір свічення досліджуваної ділянки тканини може бути мінливим, а інтенсивність свічення занадто малою для того, щоб її можна було виявити візуально [97]. Крім того, інтенсивність АФ залежить від багатьох експериментальних факторів, таких як інтенсивність, довжина хвилі та кут падіння на тканину збуджувального випромінювання, точності юстування тощо [111].

Мікроскопія з візуалізацією часу загасання флюоресценції (Fluorescence lifetime microscopy, FLIM) позбавлена цих недоліків, оскільки час загасання флюоресценції є внутрішнім параметром центра люмінесценції і не залежить від інтенсивності збуджувального випромінювання, інтенсивності флюоресценції та інших факторів, які впливають на точність вимірювання абсолютних значень інтенсивності. Таким чином, вимірювання часів загасання смуг АФ являє собою надійніший і менш інвазивний метод дослідження порівняно з іншими експериментальними методами виявлення злоякісних пухлин.

Автори роботи [111] виявили чіткі відмінності часів загасання смуг АФ коферментів NADH та FAD (рис.105) у нормальних клітинах фібропластів щурів (WFB) та відповідних клітинах зі злоякісними утвореннями (W31). Флюорофори NADH і FAD відіграють роль індикаторів процесів обміну речовин та енергії, що відбуваються всередині клітини, а також індикаторів загибелі клітини [113].

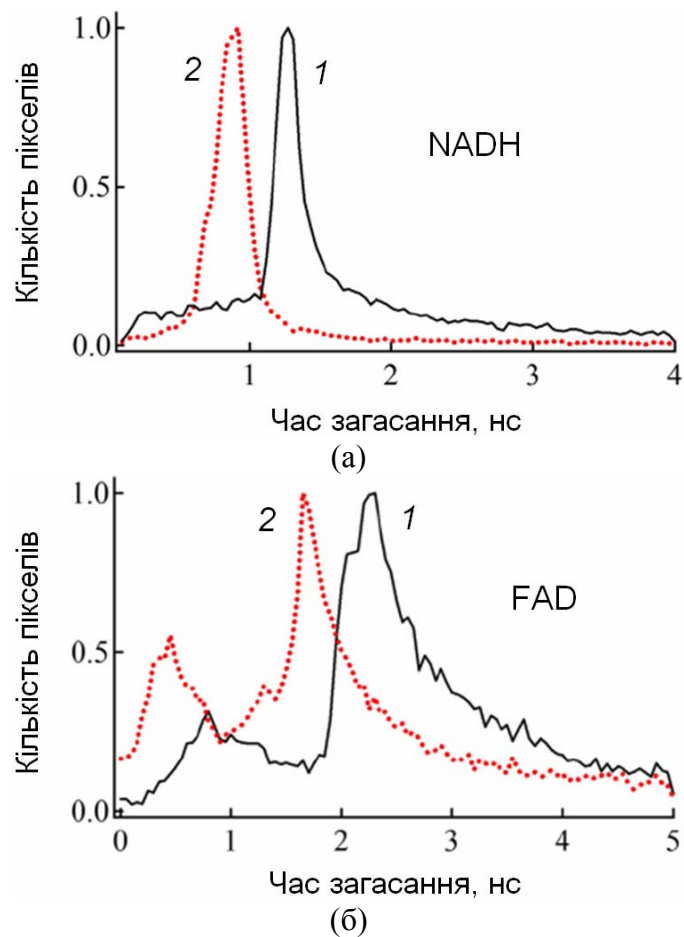


Рис.105. Гістограми часів загасання флюоресценції NADH (а) і FAD (б) для клітин WFB (1) та W31 (2) [111]

Для збудження флюоресценції NADH на довжині хвилі 450 нм та FAD на довжинах хвиль 516–560 нм використовувалася друга гармоніка титан-сапфірового лазера з синхронізацією мод з довжиною хвилі 380 нм (NADH) та 450 нм (FAD). Тривалість лазерних імпульсів складала 100 фс, частота повторення 81 МГц.

Такі відмінності часів загасання смуг АФ коферментів NADH (1,2 та 0,9 нс для здорових та уражених клітин, відповідно) і FAD

(0,9 і 2,1 (два піки) та 0,5 і 1,8 нс (два піки), відповідно) для здорових та уражених раком клітин пояснюються змінами у взаємодії цих коферментів з білковими молекулами, з якими вони зв'язуються. Зменшення часів загасання для ракових клітин може бути зумовлене зростанням імовірності безвипромінювальних процесів, які супроводжують зміни в оточенні флюорофорів.

5.6. Підсумки до розділу 5

Підсумовуючи усе вищезазначене, можна стверджувати, що сучасна аутофлюоресцентна діагностика ракових захворювань являє собою цілу низку чутливих і надійних діагностичних методів, застосування яких може наблизити людство до розв'язання такої актуальної і складної проблеми як своєчасне виявлення й ефективне лікування ракових захворювань різних органів людини.

Розділ 6. Прикладні аспекти біофотоніки.

Фотодинамічна терапія

6.1. Поняття про фотодинамічну терапію та її фотофізичні аспекти

Фотодинамічна терапія (ФДТ) – це сучасний метод лікування раку, що інтенсивно розвивається і успішно застосовується в багатьох країнах [114]. Цей метод полягає у введенні нетоксичного фотосенсибілізатора (ФС) – барвника чи наносистеми – до хворого на рак організму, після чого ФС накопичується в раковій тканині. Далі пухлину опромінюють світлом на довжині хвилі поглинання ФС, що переводить ФС у збуджений синглетний стан S_1 ; внаслідок подальшої інтеркомбінаційної конверсії ФС переходить до збудженого триплетного стану T_1 (Рис.106). Збуджена молекула ФС в триплетному стані, за рахунок одного з процесів – перенесення електрона, перенесення протона чи перенесення енергії електронного збудження – спричиняє утворення так званих активних форм кисню (вільних радикалів чи синглетного молекулярного кисню), що в кінцевому результаті призводять до пошкодження тканини чи клітини – так званої фотодинамічної дії [115]. Метод ФТД вигідно відрізняється від традиційних методів лікування раку – хіміотерапії та радіотерапії – високою специфічністю до пухлини і низьким рівнем пошкодження здорових тканин, що дозволяє повторювати лікування багато разів без суттєвої шкоди для організму та забезпечує ефективність до пухлин різних типів [116]. Разом з цим, у цього методу є ряд недоліків – насамперед, мала глибина проникнення збуджуючого променя в біологічну тканину – які обмежують його застосування і на подолання яких спрямовані зусилля дослідників. Розглянемо

детальніше процедуру ФДТ та процеси, що мають місце під час її перебігу.

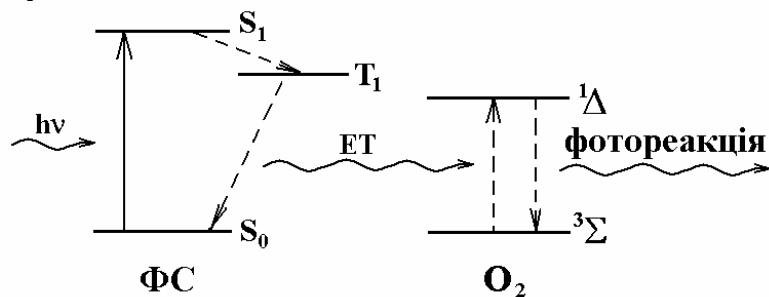


Рис.106. Принципова схема фотофізичних процесів, що лежать в основі ФДТ (механізм фотодинамічної дії II типу).

6.2. Введення ФС в організм та локалізація його в пухлині

Лікувальний препарат – ФС – вводиться в уражений раком організм зазвичай через вену (в дозах порядку міліграмів на кілограм маси тіла [117]), і, розносячись потоком крові по організму, в принципі може потрапити у всі клітини – і здорові, і ракові. Шлях молекули ФС в організмі можна схематично описати наступною послідовністю процесів [118]. Потрапивши в кров, ФС насамперед зв'язується (залежно від гідрофільності чи гідрофобності молекули ФС) з одним з білків сироватки – альбуміном (достатньо великий глобулярний білок, з яким зв'язуються гідрофільні ФС) чи ліпопротеїном (замкнена структура, що складається з подвійного ліпідного шару та інкорпорованих в нього білків, яка може містити всередині і транспортувати гідрофобні сполуки – жири, холестерин, тощо; з нею зв'язуються гідрофобні ФС), і транспортується вздовж судини. Далі в певному місці молекула ФС зв'язується (сильно чи слабо) з внутрішньою стінкою судини – ендотелієм, після чого проходить

(повільно чи швидко) крізь стінку судини і опиняється в пухлині або в тому чи іншому здоровому органі. Потім ФС проникає на більшу чи меншу глибину всередину пухлини чи здорового органу (де може проходити всередину клітин). Насамкінець, ФС виводиться з тканини, зазвичай через лімфатичну дренажну систему, після чого залишає і сам організм.

Слід сказати, що від структури, а отже властивостей молекули ФС (чи ФС-наносистеми, в яку входить така молекула), залежить ряд характеристик, що описують її поведінку в організмі, зокрема (1) швидкість транспортування ФС судинами, (2) час, за який ФС з'єднується зі стінками судини та перебуває в них, (3) час, за який ФС проникає в пухлину або в ту чи іншу здорову тканину і перебуває в ній, (4) глибина, на яку ФС проникає в пухлину чи здорову тканину, (5) селективність накопичення в пухлині та в тих чи інших здорових тканинах, (6) проникнення чи непроникнення крізь мембрану клітини (здорової та ракової), (7) час виведення ФС з тих чи інших здорових тканин та з пухлини, тощо. Від цих параметрів залежить як ефективність даної молекули в якості ФС, так і спосіб лікування, наприклад час початку (після моменту введення ФС в організм) і доза опромінення, тип пухлин, які можна лікувати цим ФС, тощо [118].

Зрозуміло, що оптимально було б знайти таку молекулу чи наносистему ФС, яка б вибірково накопичувалася лише в раковій пухлині, мінімально потрапляючи до здорових органів – в цьому, власне, і полягає один з аспектів досліджень, спрямованих на пошук нових ФС. Селективне накопичення гематопорфірину в пухлинах мишей було виявлене (за люмінесценцією гематопорфірину) ще в 1948 році [119], до початку інтенсивного

розвитку ФДТ в 1980-х роках. Пізніше було з'ясовано, що це пов'язано в основному з накопиченням цих ФС в макрофагах ракових пухлин (tumor-associated macrophages – TAM) завдяки посиленому захопленню цими макрофагами ліпопротеїнів низької густини (low density lipoprotein – LDL), які транспортують згадані ФС [120].

Треба зауважити, що злоякісні пухлини дійсно мають ряд особливостей, які сприяють проникненню та накопиченню в них ФС (залежно від характеристик конкретного ФС, та чи інша причина може мати більше чи менше значення) – це (1) більший розмір отворів (крізь які може проникати ФС) у кров'яних судинах пухлин порівняно з судинами здорових тканин; (2) менша ефективність лімфатичного дренажу (який виводить ФС) пухлини порівняно зі здоровими тканинами; (3) більша кількість рецепторів ліпопротеїнів низької густини в пухлині (ці рецептори зв'язують LDL, які транспортують ФС); (4) наявність в пухлині специфічних макрофагів ракових пухлин (TAM), які захоплюють щойно згадані LDL; (5) нижче значення рН в пухлині, ніж у здорових тканинах (що призводить до протонування деяких ФС, внаслідок чого вони змінюють заряд і краще проникають в клітини пухлини) [121].

На основі перших двох згаданих причин (більші отвори в кров'яних судинах пухлини та менш ефективний лімфатичний дренаж) виникла популярна концепція "посиленого проникнення й утримання" (Enhanced permeability and retention – EPR), згідно з якою нанорозмірні (20-200 нм) об'єкти можуть проникати в міжклітинний простір пухлини через отвори в її кров'яних судинах і затримуватися там, тоді як у здорові тканини проникати вони майже не будуть [122]. Тому було докладено багато зусиль до

розробки нанорозмірних протиракових препаратів (не лише ФС, а й – більшою мірою – препаратів для звичайної хіміотерапії) [122]. Проте, виявилось, що, хоча ця концепція справджується у випадку пухлин піддослідних гризунів, вона щонайменше не завжди (зокрема – далеко не для кожного виду раку) працює у випадку пухлин людини [122,123]. Причиною цього є те, що пухлини людини і гризунів дуже сильно відрізняються, зокрема швидкістю розвитку та масою відносно маси тіла – пухлина людини росте значно повільніше (а отже, судини теж розвиваються повільніше і мають менше отворів) і становить значно меншу частку маси тіла, ніж у гризуна (пухлина миші може складати 10% її загальної маси, і таким чином накопичує значну кількість ФС) [122]. Крім того, пухлини людини, крім перелічених вище сприятливих для проникнення і утримання ФС факторів, мають і ряд несприятливих, таких як (1) нерівномірність розташування судин в пухлині, через що в пухлині є ділянки, поблизу яких немає судин, через що в ці ділянки потрапляє мало ФС, а також мало молекул кисню, необхідних для ФДТ; (2) підвищений (порівняно зі здоровими тканинами) тиск рідини в міжклітинному просторі пухлини (Interstitial fluid pressure – IFP), що заважає проникненню ФС глибоко в пухлину; (3) більша густина і нерівномірний розподіл позаклітинного матриксу (Extracellular matrix – ECM) – фібрилярних структур з колагену та інших білків, що також сповільнює проникнення ФС вглиб пухлини, зокрема (разом з підвищеним тиском позаклітинної рідини) унеможливаючи конвекційний рух рідини, через що ФС розповсюджується значно повільнішим дифузійним шляхом [122,124]. Отже, на проникнення ФС в пухлину впливає дуже багато різних факторів. Тому розробка

нових препаратів є дуже складним завданням і, незважаючи на величезний потік наукових статей на цю тему, лише мала кількість сполук була дозволена в клінічній практиці.

Таким чином, через певний час після введення препарату, зазвичай від 24 до 72 годин (але цей час принциповим чином залежить від конкретного ФС), коли кількість препарату, накопиченого в пухлині, а також співвідношення цієї кількості до кількості ФС в здорових тканинах, досягає оптимальних значень, починають опромінення пухлини [118,125].

6.3. Збудження ФС

Збудження ФС здійснюють за допомогою як лазерів, так і тих чи інших некогерентних джерел світла (різноманітних ламп та світлодіодів) [125,126]. Опромінення здійснюється ззовні тіла (якщо пухлина на поверхні) чи за допомогою хвилевода (якщо на поверхні внутрішньої порожнини) [126], доза опромінення типово становить близько 100 Дж/см^2 [117].

Довжина хвилі, на якій збудження певного ФС є оптимально ефективним, принциповим чином залежить від двох факторів: (1) спектру поглинання конкретного ФС та (2) спектру пропускання тканини на шляху світла до ФС. Власне кажучи, останній фактор є основним недоліком та обмеженням методу ФДТ. Справа в тім, що світло видимого діапазону проникає в живу тканину на глибину порядку лише кількох мм, причому для більших довжин хвилі глибина є більшою [117]. Слід зазначити, що глибина терапії (тобто там, де діють активні форми кисню, утворені внаслідок збудження ФС), перевищує глибину проникнення світла лише в 3-5 раз [117], тобто метод ФДТ дозволяє знищувати пухлини не

глибше за декілька см від поверхні шкіри чи внутрішньої порожнини.

Причинами такої малої глибини проникнення світла є, з одного боку, поглинання світла компонентами біологічної тканини (головним чином гемоглобіном крові та водою, але також меланіном та жирами), а з іншого боку, розсіювання світла тканиною (інтенсивність розсіювання, як відомо, обернено пропорційна четвертій ступені довжини хвилі світла). В проміжку 650-950 нм, тобто при довжинах хвилі, більших за довжини хвилі поглинання, що відповідають електронним переходам у хромофорах тканини, але менших за довжини хвилі поглинання води (спричиненого обертонами коливань її молекул) і де розсіювання є суттєво меншим, ніж в області видимого світла, знаходиться так зване “вікно прозорості” біологічних тканин [127]. Відповідно, однією з вимог, які враховуються при розробці нових ФС, є та, що ФС повинен мати якнайбільше значення екстинкції в області “вікна прозорості” (або якнайближчій до неї). Власне, в цьому полягає логіка переходу від порфіринів до хлоринів, і далі до бактеріохлоринів при пошуку нових ФС (див. нижче). Слід додати, що в інтервалі між 1000 та 1350 нм знаходиться так зване “друге біологічне вікно прозорості”, і створення ФС-систем, що могли б збуджуватися в цьому діапазоні і при цьому генерувати активні форми кисню, є одним з сучасних напрямків розробки ФС [127].

6.4. Генерація активних форм кисню та пошкодження пухлини

Таким чином, опромінення пухлини на довжині хвилі поглинання ФС призводить до поглинання світла

фотосенсибілізатором, що переводить ФС у збуджений синглетний стан; внаслідок подальшої інтеркомбінаційної конверсії ФС переходить до триплетного стану (рис.106). Молекула ФС в триплетному стані може брати участь в процесах двох типів, в результаті яких утворюються так звані активні форми кисню, що в кінцевому результаті призводять до пошкодження тканини чи клітини – так званої фотодинамічної дії [115].

По-перше, молекула ФС в триплетному стані може взаємодіяти з молекулою певного субстрату шляхом (1) приєднання від'єданого від субстрату протона, (2) приєднання від'єданого від субстрату електрона, або, навпаки, (3) передачі електрона з ФС на молекулу субстрату. В останньому випадку субстратом може бути і безпосередньо молекула кисню; приєднуючи електрон, вона стає супероксидним радикалом, який, протонуючись, перетворюється на гідропероксильний радикал, а два таких радикали, в свою чергу, утворюють молекулу кисню та пероксид гідрогену (перекис водню, H_2O_2), який є токсичним. Утворені внаслідок одного з трьох описаних механізмів радикали далі призводять до пошкодження пухлини, наприклад пероксидації ліпідів, яка руйнує мембрану клітини [115]. Такі пошкодження пухлини, спричинені перенесенням електрона чи протона між ФС і субстратом, носять назву *фотодинамічної дії I типу*.

З іншого боку, одним з можливих каналів деактивації триплетного збудження ФС є безвипромінювальне перенесення збудження на молекулу кисню O_2 в разі її присутності на достатньо близькій відстані. Перенесення енергії збудження з ФС в триплетному стані переводить молекулу кисню в збуджений синглетний стан (рис.106). Така форма молекулярного кисню є

токсичною і знищує клітини пухлини (*фотодинамічна дія II типу*) [128]. Щоб зрозуміти, чому може відбуватися таке перенесення, розглянемо структуру електронних рівнів енергії молекули кисню (рис.107).

Молекула кисню складається з двох атомів оксигену, кожен з яких містить по вісім електронів – в першому електронному шарі (головне квантове число $n = 1$) знаходяться два 1s-електрони (орбітальне квантове число $l = 0$), а в другому шарі ($n = 2$) – два 2s-електрони ($l = 0$) і чотири 2p-електрони ($l = 1$). Зрозуміти, на яких рівнях розташовані ці електрони в молекулі кисню, можна з допомогою наближення ЛКАО-МО (лінійна комбінація атомних орбіталей – молекулярні орбіталі), згідно з яким молекулярні орбіталі (тобто власні хвильові функції молекули) можна знайти як лінійні комбінації атомних орбіталей (тобто власних хвильових функцій окремих атомів).

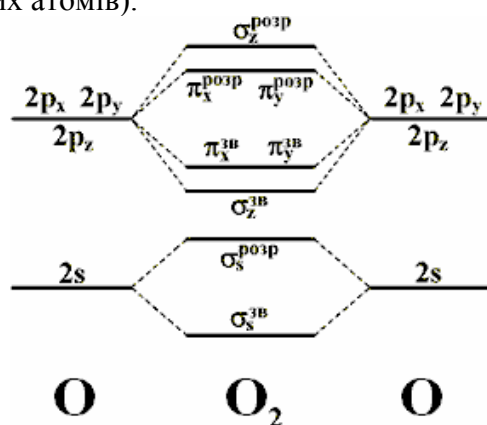


Рис.107. Схематичне зображення взаємного розташування рівнів енергії атомних орбіталей другого електронного шару ($n = 2$) двох атомів оксигену (O) та утворених з них молекулярних орбіталей кисню (O_2), за [129]

Розглянемо молекулярні орбіталі другого (незаповненого) електронного шару [129]. З двох 2s-орбіталей (по одній від кожного атома) можна утворити дві лінійні комбінації – нормовану суму атомних s-орбіталей (вийде зв'язуюча орбіталь σ_s^{3b}), та нормовану різницю атомних орбіталей (вийде розрихлююча орбіталь $\sigma_s^{p\sigma p}$) – таким чином ми отримаємо хвильові функції, які будуть власними функціями молекули. Аналогічним чином, з шести 2p-орбіталей (по три від кожного атома) можна одержати ще шість молекулярних орбіталей – дві σ -орбіталі (зв'язуючу σ_z^{3b} та розрихлюючу $\sigma_z^{p\sigma p}$; вони утворюються з атомних орбіталей $2p_z$, вісь симетрії яких лежить вздовж вісі z, що з'єднує атоми) та чотири π -орбіталі, одержані з атомних орбіталей $2p_x$ та $2p_y$, вісі симетрії яких лежать вздовж осей x та y, перпендикулярних вісі z (це будуть відповідно зв'язуючі орбіталі π_x^{3b} та π_y^{3b} , а також розрихлюючі орбіталі $\pi_x^{p\sigma p}$ та $\pi_y^{p\sigma p}$). Схематичне зображення взаємного розташування рівнів енергії атомних орбіталей двох атомів кисню та молекулярних орбіталей утвореної з них молекули кисню наведено на рис.107. Оскільки на цих рівнях енергії має бути розташовано дванадцять електронів – по шість електронів, розташованих у другому електронному шарі ($n = 2$) кожного атома, то їх можна розмістити на молекулярних орбіталях одним із трьох способів, які відрізнятимуться розташуванням двох електронів на найвищих заповнених орбіталях $\pi_x^{p\sigma p}$ та $\pi_y^{p\sigma p}$ (рис.108).

А саме, ці два електрони можуть розташовуватися на різних орбіталях і мати однаковий напрямок спіну (молекула кисню знаходитиметься при цьому в стані $^3\Sigma$), розташовуватися на одній орбіталі і мати протилежні напрямки спіну (стан молекули $^1\Delta$), а

також розташовуватися на різних орбіталях, але мати протилежні напрямки спіну (стан $^1\Sigma$). При цьому, за правилом Хунда, найнижчу енергію матиме триплетний стан $^3\Sigma$.

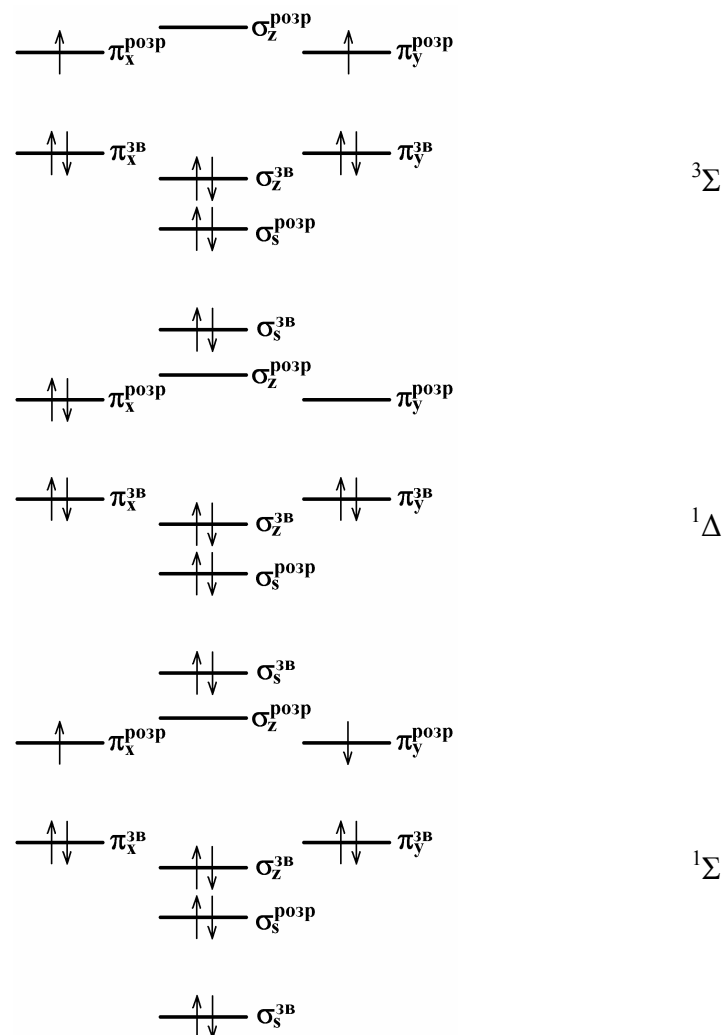


Рис.108. Варіанти розміщення електронів на двох найвищих заповнених орбіталях молекули кисню $\pi_x^{p\sigma p}$ та $\pi_y^{p\sigma p}$, які відповідають різним станам молекули – $^3\Sigma$, $^1\Delta$ та $^1\Sigma$, за [130]

Взаємне розташування рівнів енергії, які відповідають станам молекули кисню $^3\Sigma$, $^1\Delta$ та $^1\Sigma$, зображено на рис.109 [130].

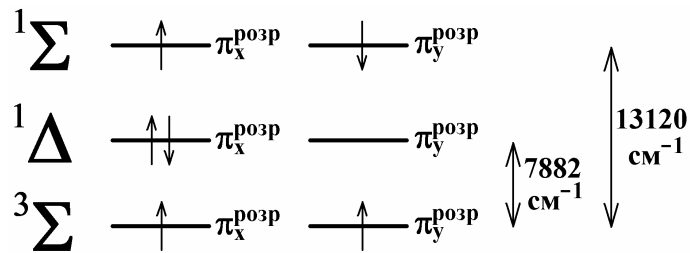


Рис.109. Взаємне розташування рівнів енергії, які відповідають станам молекули кисню $^3\Sigma$, $^1\Delta$ та $^1\Sigma$, розташування електронів на найвищих заповнених рівнях ($\pi_x^{\text{розр}}$ та $\pi_y^{\text{розр}}$), а також різниця енергій між рівнями (в одиницях оберненої довжини хвилі, cm^{-1}), за [130]

Різниця енергій між основним ($^3\Sigma$) та першим збудженим ($^1\Delta$) станами становить 7882 cm^{-1} (що відповідає довжині хвилі 1269 нм), а між основним та другим збудженим ($^1\Sigma$) станами – 13120 cm^{-1} (довжина хвилі 762 нм) [130]. Слід також сказати, що перехід між станами $^1\Delta$ та $^3\Sigma$ (а також між станами $^1\Sigma$ та $^3\Sigma$) заборонений за мультиплетністю, в той час як перехід між станами $^1\Delta$ та $^1\Sigma$ дозволений, тому молекула кисню, опинившись у стані $^1\Sigma$, швидко переходить у стан $^1\Delta$, де затримується значно надовше. Так, час життя збуджених станів $^1\Delta$ та $^1\Sigma$ становить в газовій фазі 45 хв та 7-12 с відповідно, а в розчині 10^{-6} - 10^{-3} с та 10^{-11} - 10^{-9} с відповідно [131].

Таким чином, основний стан молекули кисню – триплетний, відповідно, перехід у збуджений синглетний стан є, як вже зазначалося, забороненим. Отже, отримати потрібний для ФДТ синглетний кисень в достатній кількості простим збудженням молекули O_2 на довжині хвилі переходу $^3\Sigma \rightarrow ^1\Delta$ неможливо. Разом

з тим, якщо поряд з молекулою ФС, яка перебуває в збудженому триплетному стані T_1 , опиниться молекула O_2 в основному стані $^3\Sigma$ (теж триплетному), і при цьому взаємна орієнтація спінів ФС та O_2 буде протилежною, так що сумарний спін системи ФС та O_2 дорівнюватиме нулю, то можливе перенесення енергії збудження з ФС на O_2 , причому обидві молекули перейдуть в синглетний стан (основний S_0 та збуджений $^1\Delta$ відповідно), і сумарний спін системи залишиться нульовим.

Як вже зазначалося, одержана в результаті такого процесу форма молекули кисню (синглетний кисень в стані $^1\Delta$) є токсичною і знищує клітини пухлини (фотодинамічна дія II типу) [128]. Так, синглетний кисень реагує з ненасиченими ліпідами, холестерином, похідними α -амінокислот (всі перелічені сполуки входять до складу мембрани клітини, а отже їх хімічні перетворення призводять до руйнування мембрани), а також з пуриновими нуклеотидними основами [115]. В результаті такої реакційної здатності синглетного кисню в біологічному середовищі, час життя кисню в стані $^1\Delta$ зменшується з 2 мкс (в воді) до < 0.04 мкс [115]. Відповідно середня відстань, на яку дифундує молекула кисню в біологічному середовищі за час життя збудженого синглетного стану $^1\Delta$, становить < 0.02 мкм, тому ФС пошкоджує лише ті об'єкти, які знаходяться в безпосередній близькості до місця його локалізації в організмі [115, 132].

Таким чином, збуджена молекула ФС призводить (як результат фотодинамічної дії I чи II типу) до пошкодження біологічних молекул, що входять до складу пухлини. Це тягне за собою руйнування пухлини за одним з трьох механізмів: (1) безпосереднє руйнування клітин пухлини (внаслідок пошкодження

однієї зі складових клітини, наприклад клітинної мембрани, що запускає один з двох механізмів загибелі клітини – апоптоз чи некроз); (2) руйнування кров'яних судин пухлини (за одним з низки механізмів, наприклад пошкодженням стінок судини), що призводить до припинення постачання в пухлину кисню та інших поживних речовин, які надходять з кров'ю; та (3) посилення імунної реакції на пухлину, завдяки зокрема тому, що мертві чи пошкоджені злоякісні клітини розпізнаються клітинами імунної системи, і це в результаті викликає імунну реакцію на клітини пухлини взагалі [118]. Слід сказати, що два останніх механізми є важливими зокрема тому, що перший механізм має ряд обмежень – ФС часто або не може проникнути в глибину пухлини, щоб безпосередньо (за першим механізмом) знищити в цьому місці злоякісні клітини, або там (в області пухлини, відносно далекій від кров'яних судин) виникає так звана гіпоксія – відсутність кисню, необхідного для фотодинамічної дії. Слід зауважити також, що реалізація першого (безпосереднє знищення клітини) чи другого (руйнування кров'яних судин) механізму залежить від інтервалу часу між введенням ФС та опроміненням, тобто від того, чи в момент опромінення ФС переважно вже встиг проникнути в простір між клітинами пухлини, чи ще знаходиться в стінках судини (або в крові); при цьому другий механізм нерідко є ефективнішим [118].

6.5. Фотосенсибілізатори: історія і перспективи

Зрозуміло, що основною запорукою успішного здійснення ФДТ є наявність ефективного ФС. З викладених вище принципів ФДТ зрозуміло, яким вимогам має задовольняти ФС. Він, зокрема,

повинен: (1) інтенсивно поглинати світло в діапазоні “вікна прозорості” організму (650-950 нм); (2) мати високий квантовий вихід інтеркомбінаційної конверсії (тобто, високу ефективність переходу в триплетний стан) та довгий час життя в триплетному стані, та ефективно утворювати активні форми кисню (зокрема, синглетний кисень); (3) швидко та ефективно концентруватися в пухлині; (4) бути фотостабільним; (5) мати низьку темнову (тобто, за відсутності фотозбудження) токсичність; (6) легко виводитись з організму. Дослідницька робота з розробки нових ФС триває й досі. Розроблені на даний момент ФС (частина з них вже впроваджена в клінічну практику) прийнято поділяти на три покоління [121].

До ФС першого покоління відносять одержану з крові суміш похідних гематопорфірину (Hematoporphyrin derivative, HpD) та препарат Photofrin (Рис.110), який є по суті теж сумішшю олігомерів – похідних гематопорфірину, очищеною від менш ефективних компонентів [133].

Спектр поглинання характерної сполуки класу порфіринів – гематопорфірину наведено на рис.111.

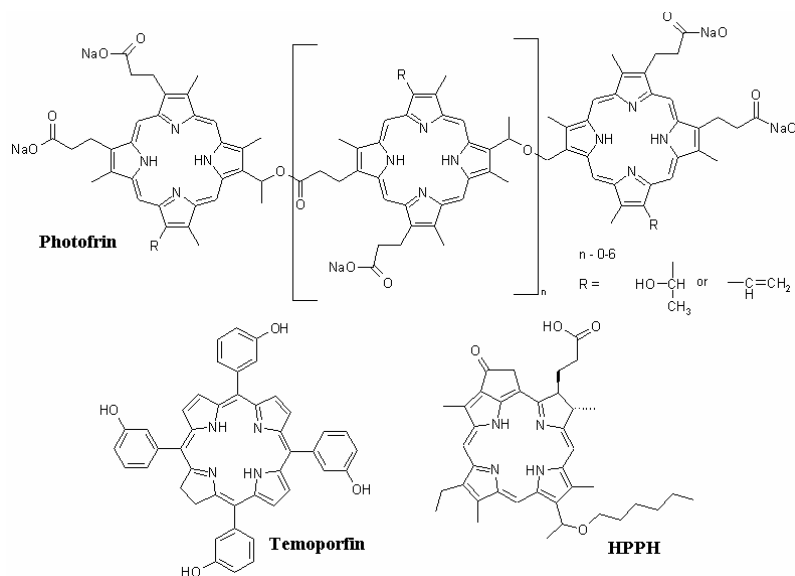


Рис.110. Структури низки фотосенсибілізаторів першого та другого поколінь

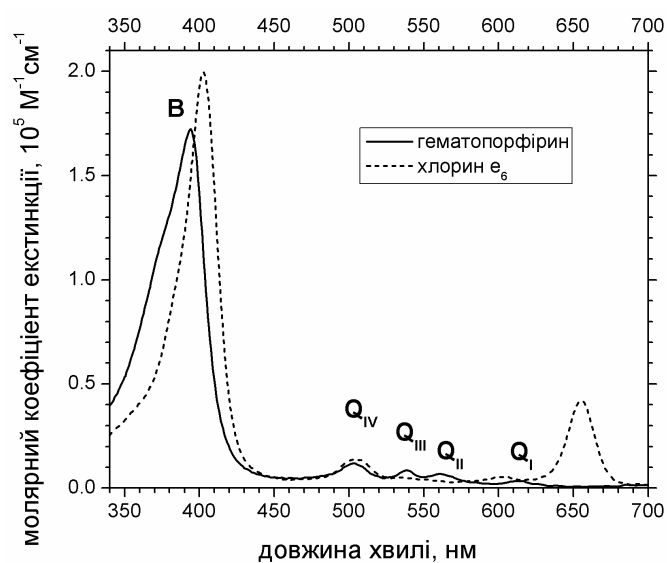


Рис.111. Характерні спектри поглинання водних розчинів сполук класу порфіринів (гематопорфірин, в 50мМ TRIS-HCl буфері, pH 7,8) і хлоринів (хлорин e_6 , в 50мМ TRIS-HCl буфері, pH 7,9). Для гематопорфірину вказані позначення окремих смуг

Видно, що спектр містить інтенсивну короткохвильову смугу – так звану смугу Соре (яку також називають В-смугою), а також чотири короткохвильові низькоінтенсивні Q-смуги (які позначаються, починаючи від довгохвильової, як Q_I , Q_{II} , Q_{III} та Q_{IV}). І хоча поглинання гематопорфірину на довжині хвилі смуги Соре значно інтенсивніше, ніж на довжинах хвилі Q-смуг, при використанні у ФДТ цей ФС збуджують все ж на довжині хвилі найбільш довгохвильової смуги Q_I (630 нм), оскільки на цій довжині хвилі глибина проникнення променя в біологічну тканину є більшою.

Чому ж Q-смуги, зокрема найбільш довгохвильова, що відповідає переходу електрона на найнижчий незаповнений рівень енергії, є такими низькоінтенсивними? Щоб це зрозуміти, слід зауважити, що ФС першого покоління є порфіринами – сполуками на основі порфіну (Рис.112), і їх π -електронна система є по суті π -електронною системою порфіну – циклічною спряженою системою π -електронів, яка й визначає їх спектральні властивості. Якщо порфін не містить металу в центрі чи протонів при всіх чотирьох внутрішніх атомах нітрогену, його кільце належить до групи симетрії D_{2h} ; якщо ж кільце містить атом металу, для чого треба депротонувати всі внутрішні атоми нітрогену, або ж якщо всі чотири атоми протоновані (що може бути за низьких значень рН) – то до групи D_{4h} . Замісники, приєднані до порфіринового кільця, більшою чи меншою мірою збурюють симетрію, що має відповідний вплив на спектри.

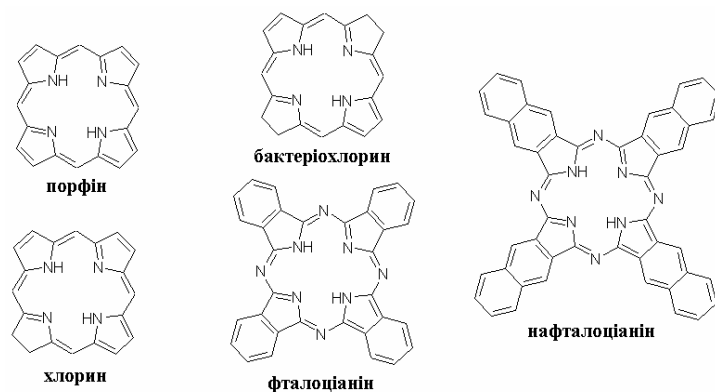


Рис.112. Макроциклічні структури, що лежать в основі найефективніших ФС

Для опису спектральних властивостей порфіринів використовують так звану чотирьохорбітальну модель Гутермана [134], яка непогано викладена в [135]. Згідно з цією моделлю, для пояснення природи електронних переходів порфірину у видимій області обмежуються двома заповненими орбітями та двома незаповненими, які для вільного порфірину (без атома металу; група симетрії D_{2h}) представлені на Рис.113.

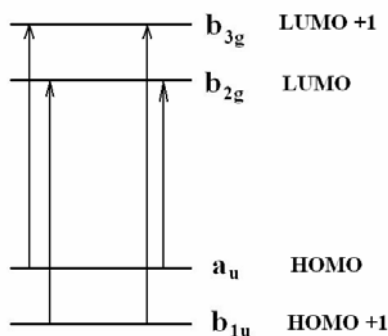


Рис.113. Дві вищі заповнені та дві нижчі незаповнені орбіталі порфірину

При цьому, з-поміж можливих переходів між ними, переходи $a_u \rightarrow b_{3g}$ та $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$ мають однаковий напрямок вздовж вісі Н-Н молекули (тобто вісі, що з'єднує атоми гідрогену при внутрішніх атомах нітрогену порфінового кільця, позначимо її як вісь x), а переходи $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$ та $a_u \rightarrow b_{2g}$ також мають однаковий напрямок та орієнтовані вздовж вісі y (у площині молекули і перпендикулярно вісі x).

Основним електронним станом порфірину є стан 1^1A_g . Збуджені стани отримуються змішуванням переходів $a_u \rightarrow b_{3g}$ та $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$ (виходять два стани 1^1B_{3u}) та переходів $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$ та $a_u \rightarrow b_{2g}$ (виходять два стани 1^1B_{2u}). При цьому змішування кожної пари переходів дає два переходи з основного рівня на збуджений – з малою силою осцилятора (переходи компенсуються) та з високою (переходи додаються). Конкретно, змішування $a_u \rightarrow b_{3g}$ та $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$ дає переходи у стани 1^1B_{3u} (найнижчий збуджений стан, мала сила осцилятора) та 2^1B_{3u} (третій збуджений стан, велика сила осцилятора). Змішування переходів $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$ та $a_u \rightarrow b_{2g}$ дає переходи у стани 1^1B_{2u} (другий збуджений стан, мала сила осцилятора) та 2^1B_{2u} (четвертий збуджений стан, велика сила осцилятора). Таким чином, виходить наступна схема рівнів енергії електронів порфірину та переходів між ними (рис.114).

При цьому переходи $1^1A_g \rightarrow 1^1B_{3u}$ та $1^1A_g \rightarrow 1^1B_{2u}$ дають у спектрі поглинання низькоінтенсивні смуги, що позначаються як Q_x та Q_y відповідно (відомі також як смуги Q_I та Q_{III} відповідно, причому їх дипольні моменти переходу орієнтовані взаємно перпендикулярно), а переходи $1^1A_g \rightarrow 2^1B_{3u}$ та $1^1A_g \rightarrow 2^1B_{2u}$ дають інтенсивні V_x та V_y смуги, які зливаються і дають у сумі смугу $Sore$. Слід додати, що дипольні моменти переходу смуг V_x та V_y

теж орієнтовані взаємно перпендикулярно.

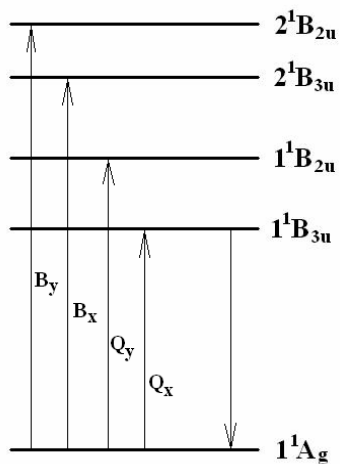


Рис.114. Схема енергетичних станів електронної системи порфірину та переходів між ними

Проте, досі розглядалися тільки електронні переходи, які пояснюють лише дві з чотирьох Q-смуг спектра поглинання, і не йшлося про коливальну структуру. Згідно з [136], молекула порфірину також здійснює коливання, і саме коливаннями пояснюються смуги Q_{II} та Q_{IV} . Причому, згідно з [136], у смуги Q_{II} та Q_{IV} рівною мірою дають внесок як повносиметричні коливання (які не змінюють напрямку дипольного моменту переходу), так і неповносиметричні, які його змінюють (що проявляється при поляризаційних вимірах). Отже, згідно з [136] (але з урахуванням того факту з [135], що 2^1B_{3u} нижчий за 2^1B_{2u}), схема рівнів та переходів між ними для порфіринів виглядає так, як зображено на рис.115.

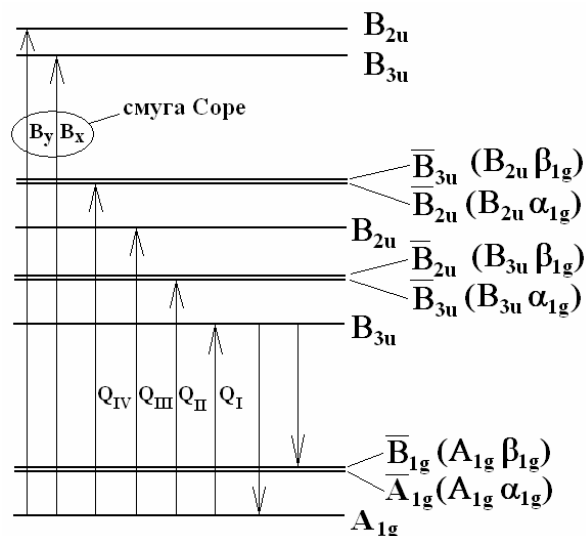


Рис.115. Схема енергетичних станів електронної системи порфірину та переходів між ними з урахуванням коливальної структури (в дужках – симетрія електронного стану та симетрія коливання)

Отже, Q-смуги в спектрі поглинання порфіринів є низькоінтенсивними через те, що відповідні переходи є результатом змішування двох переходів з близькими силами осцилятора, причому ці сили осцилятора взаємно компенсуються, і різниця дуже мала. Проте, виявляється, що якщо понизити симетрію π -електронної системи, сили осцилятора згаданих переходів відрізнятимуться сильніше, і різниця буде більшою. Тому ФС другого покоління включають, крім модифікованих сполук на основі порфіну, також сполуки на основі хлорину (π -електронна система зменшена на один зв'язок) та бактеріохлорину (π -електронна система зменшена на два зв'язки), а також інших споріднених макроциклів – фталоціаніну, нафталоціаніну тощо (рис.112). Наприклад, в клінічній практиці використовуються такі

сполуки на основі хлорину, як Теморорфін (комерційно відомий як Foscan [137]) та НРРН (комерційно відомий як Photochlor [138]) (рис.110). З Рис.111 видно, що найбільш довгохвильова смуга в спектрі поглинання сполуки класу хлоринів (хлорин e_6) не лише інтенсивніша, а й зсунута в довгохвильовий бік порівняно з аналогічною смугою сполуки класу порфіринів (гематопорфірин).

Якщо ФС першого і другого поколінь – це власне фотосенсибілізатори, тобто хромофори, що поглинають світло і генерують за рахунок свого збудженого стану активні форми кисню (зокрема синглетний кисень), то ФС третього покоління (якісь із них впроваджено в клінічну практику, якісь перебувають на стадії випробовувань, та більшість – на етапі наукових розробок) – це складні системи. Вони складаються з власне ФС, тобто з молекули, що поглинає світло та генерує активні форми кисню (зазвичай це один із ФС другого покоління), та групи чи наносистеми, чия роль полягає в підвищенні ефективності системи порівняно з молекулою ФС без такої групи чи наносистеми [121]. Згадане підвищення ефективності досягається, як правило, за рахунок більшого накопичення ФС в пухлині, причому з'єднані з молекулою ФС групи чи наносистеми можуть діяти як активні носії (тобто розпізнаватися певними рецепторами злоякісних пухлин) та пасивні (просто полегшувати проникнення в пухлину). Так, в якості активних носіїв до молекули ФС ковалентно приєднують, наприклад, цукрову (вуглеводну) чи пептидну групу, які розпізнаються спеціальними рецепторами, причому злоякісна клітина має більше таких рецепторів, ніж здорова. З такою ж метою молекули ФС інтегрують у ліпопротеїни малої густини (LDL) – клітини пухлин мають підвищену кількість рецепторів, що

розпізнають ці біологічні наносистеми. Крім того, як носії ФС використовуються та досліджуються також різні полімери (наприклад, білоруський препарат Фотолон, що використовується в клінічній практиці, є системою, яка складається з ФС хлорину e_6 та полімеру полівінілпіролідону [139]), міцели, везикули, наночастинки (останні можуть бути, наприклад, магнітними, що дозволяє керувати переміщенням ФС-наносистеми всередині організму з допомогою магнітного поля) [121].

Проводяться також розробки ФС-наносистем, які можна було б збуджувати в інфрачервоному діапазоні спектра, в області першого чи другого “біологічного вікна прозорості”. Для цього можна використати, наприклад, явище двофотонного збудження, причому для більшої ефективності збудження ФС складається з антенної системи – багатьох однакових хромофорів, які збуджуються двофотонно, та власне ФС, на який переноситься енергія збудження з антенної системи. Таку ФС-систему можна реалізувати, наприклад, у вигляді складної молекули, в яку входять вісім двофотонно-збуджуваних антенних хромофорів, ковалентно приєднаних до одного ФС-хромофора [140], або у вигляді наночастинки, в яку інтегровані як двофотонно-збуджувані антенні хромофори, так і ФС-хромофори [141]. Можна також використати явище up-конверсії, коли послідовне поглинання низькоенергетичних інфрачервоних фотонів, що супроводжується послідовним переходом електрона на рівні з дедалі більшою енергією (наприклад, в атомах лантаноїдів), зрештою робить можливим перенесення енергії збудження на молекулу ФС – так, збудження наночастинки $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ лазером з довжиною хвилі 980 нм викликало її випромінювання на довжинах хвилі 540 та 660

нм, що було використано для перенесення енергії на ФС з відповідними довжинами хвилі поглинання [142].

Проте, навіть збудження в інфрачервоній області спектра забезпечує проникнення світла в біологічну тканину на глибину лише порядку одного сантиметра. Тому привабливою є ідея використати для збудження фотосенсибілізатора рентгенівські промені, які проникають крізь м'які тканини достатньо глибоко, щоб знищити пухлину в будь-якому місці організму. Підхід до створення фотосенсибілізаторів, збуджуваних рентгенівським випромінюванням, запропонував вперше В. Чен в 2006-му році [143]. Майбутнє медичне використання такого підходу (він ще перебуває на стадії наукових розробок) наперед назвали радіодинамічною терапією. Підхід полягає у створенні наносистем, що складаються з ФС, який генерує синглетний кисень при фотозбудженні, та з наночастинки-сцинтилятора, здатної при збудженні рентгенівськими променями випромінювати видиме чи ультрафіолетове світло в діапазоні поглинання ФС. Рентгенівське збудження сцинтилятора при цьому призводить до виникнення електронних збуджень цього сцинтилятора, які переносяться далі безвипромінювально на ФС. В якості сцинтилюючих наночастинок було описано частинки з післясвіченням $\text{BaFBr:Eu}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$, які дозволяли активацію ФС навіть після припинення дії рентгенівського випромінювання [143]. Були також запропоновані кон'югати наночастинок ZnS:Cu,Co (сцинтилятор з післясвіченням) з ФС тетрабромродаміном 123 [144]; наночастинки $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}$, енкапсульовані в мікросфери (розміру близько 2 мкм) з полі (D,L-лактид-ко-гліколіду) разом з ФС протопорфірином IX [145]; наночастинки, що містять ядро Tb_2O_3 (близько 3,6 нм),

вкрите зовнішнім шаром з полісилоксану (SiO_2 ; сумарний розмір близько 9.8 нм), до якого приєднаний ФС тетрафеніл-порфірин [146]. Також були створені наночастинки у формі міцел, утворених поверхнево-активною речовиною, молекула якої в гідрофільній від'ємно зарядженій групі $-\text{N}(\text{COO}-)_2$ містить атом Eu^{3+} чи Gd^{3+} ; в гідрофобній частині утвореної міцели вбудовується ФС гіперіцин; при збудженні рентгенівським випромінюванням атомів Eu^{3+} та Gd^{3+} збудження переноситься на гіперіцин [147]. Нарешті, були описані наночастинки, в яких ядро з $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}$ (близько 80 nm) вкрите двома оболонками з SiO_2 : щільною для захисту ядра, яке дуже піддається гідролізу, та пористою, в пори якої вбудовується фотосенсибілізатор мероціанін 540 [148].

Таким чином, наукові дослідження, присвячені розробці нових ефективніших ФС-систем для ФДТ, досі тривають.

Список літератури

1. Ящук В.М., Кудря В.Ю., Шевченко С.Я., Вретік Л.О. Вступ до фотоніки органічних середовищ: Навчальний посібник для студентів фізичних факультетів вищих навчальних закладів.- К.: ВД "СофтПресс", 2010.- 132 с.
2. A.Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes // Nature.- 1933.- V.131.- P.839-840.
3. В.М.Ящук. Фотоніка полімерів.- Київ, ВПЦ «Київський університет», 2004.- 119 с.
4. M.Pope, Ch.Swenberg. Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers (2nd ed.).- NY: Oxford University Press.- 1999.- 1182 p. (Поуп М., Свенберг Ч. Электронные процессы в органических кристаллах. - М., Мир.- 1985.- Т.1,2.- 544 с).
5. Рабек Я. Экспериментальные методы в фотохимии и фотофизике.-М.:Мир, 1985. Т.2.
6. Молекулярная фотоника // сб. статей под ред. Ф.И.Вилесова, В.Л.Ермолаева, А.А.Красновского, Б.С.Непорента, А.И.Сидорова, В.Е.Холмогорова.- Л.: «Наука», 1970.- 440 с.
7. Гиллет Дж. Фотофизика и фотохимия полимеров. - М.: "Мир", 1988.- 435 с.
8. V.M.Yashchuk. Migrating Electronic Excitations in π -electron-containing Polymers // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 1998.-V.324.-P.211-222.
9. V.M.Yashchuk. Triplet exciton in π -electron containing polymers // Polimery.- 1999.- V.44.- P.475-480.
10. V.M.Yashchuk. Excited triplet sites in polymers // Вісник Київського університету, сер.Фізика.- 2000.- Вип.1.- С.66-73.
11. А.Гиллем, Е.Штерн. Электронные спектры поглощения органических соединений.- М.: Изд. иностранной литературы, 1957.- 388 с.

12. Дж.Дэвидсон. Биохимия нуклеиновых кислот.- М.: Мир, 1976.- 416 с.
13. V.M.Yashchuk, V.G.Syromyatnikov, T.Yu.Ogul'chansky, V.Yu.Kudrya, O.Yu.Kolendo. Carbochain functional macromolecules with one-way direct electronic excitation energy transfer // Вісник Київського університету. Сер.Фізика.- 2000.- Вип.2.- С.60-63.
14. В.М.Ящук, В.Ю.Кудря, Г.П.Головач, П.Н.Прасад, Х.Шуга. Деякі базисні моделі функціональних макромолекул для наноелектроніки та нанофотоніки. Блок-кополімерна функціональна макромолекула з однонаправленою екситонною провідністю для наноелектроніки та нанофотоніки // Наукові записки НаУКМА. Сер. фіз.-мат. наук.- 2003.- Т.21.- С.59-67.
15. Кудря В.Ю. Спектральні властивості функціональних π -електронмістких молекулярних систем з направленим перенесенням електронних збуджень.- Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата фіз.-мат. наук.- 2004.- 20 с.
16. V.Yashchuk, V.Kudrya, M.Losytskyy, H.Suga, T.Ogul'chansky. The nature of the electronic excitations capturing centres in the DNA // Journal of Molecular Liquids.- 2006.- V.127, Iss.1-3.- P.79-83.
17. V.M.Yashchuk, V.Yu.Kudrya, M.Yu.Losytskyy, I.Ya.Dubey, H.Suga. Electronic Excitation Energy Transfer in DNA. Nature of Triplet Excitations Capturing Centers // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2007.- V.467.- P.311-323.
18. V.M.Yashchuk, V.Yu.Kudrya, I.V.Savchenko, G.P.Golovach, I.Ya.Dubey, R.D.Fedorovich, H.Suga, J.V.Grazulevicius. Synthetic and Biological Functional Compounds with Direct Excitons Conductivity for anoelectronic Devices // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2007.- V.468.- P.275-288.
19. Кудря В.Ю. Спектральні властивості та фотостабільність нуклеїнових кислот та олігонуклеотидів // Наукові записки НаУКМА: Сер. фіз.-мат. наук.- 2011.- Т.113.- С.50-55.

20. V.Yu.Kudrya, V.M.Yashchuk. The Spectral Properties and Photostability of the DNA, RNA and Oligonucleotides // Ukr. Phys. J.- 2012.- V.57, N2.- P.187-192.
21. М.А.Ельяшевич. Атомная и молекулярная спектроскопия.- М.: Гос. изд. физ.-мат. литературы, 1962.- 892 с.
22. R.O.Rahn, R.G.Shulman, J.W.Longworth. Phosphorescence and Electron Spin Resonance Studies of the UV-Excited Triplet State of DNA // J. Chem. Phys.- 1966.- V.45, N 8.- P.2955-2965.
23. Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. Molecular Probes Inc.: Eugene, Oregon, USA, 2002.
24. V.Yu.Kudrya, V.M.Yashchuk, S.M.Levchenko, V.I.Mel'nik, L.A.Zaika, D.M.Govorun. The Peculiarities of the RNA Luminescence // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2008.- V.497.- P.93-100
25. Yashchuk V.M., Tkachuk Z.Yu., Levchenko S.M., Kudrya V.Yu., Mel'nik V.I., Vorob'ev V.P. Autophosphorescence of proteins and polyribonucleotides and possibility of the spectral testing of their interaction // Biotechnology.- 2012.- V.1, N 4.- P.104-112.
26. V.M.Yashchuk, V.Yu.Kudrya, S.M.Levchenko, Z.Yu.Tkachuk, D.M.Hovorun, V.I.Mel'nik, V.P.Vorob'yov, G.V.Klishevich. Optical Response of the Polynucleotides-Proteins Interaction // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2011.- V.535.- P.93-110.
27. S.Gohlke, E.Illenberger. Probing biomolecules: Gas phase experiments and biological relevance // Europhysics News.- 2002.- V.33, N6.- P.207-209.
28. Yu.V.Rubin, Yu.P.Blagoi, V.A.Bokovoy, V.S.Leontiev, R.G.Lee. The Investigation of Structural and Energy Transfer in DNA Solution in Range 4.2-273K Using 6-Thioguanine // Int. J. Quant. Chem.: Quant. Bio. Symp.- 1994.- V.21.- P.187-194.
29. Yu.V.Rubin. Physical properties of anticancer drug 6-thioguanine // Proc. Spie.- 2004.- V.5507.- P.346-357.
30. M.Sholokh, R.Sharma, D.Shin, R.Das, O.A.Zaporozhets, Y.Tor, Y.Mely. Conquering 2-Aminopurine's Deficiencies: Highly Emissive

Isomorphic Guanosine surrogate Faithfully Monitors Guanosine Conformation and Dynamics in DNA // J. Am. Chem. Soc.- 2015.- V.137 (9).- P.3185-3188

31. M.Sholokh, R.Improta, M.Mori, R.Sharma, C.Kenfack, D.Shin, K.Voltz, R.H.Stote, O.A.Zaporozhets, M.Botta, Y.Tor, Y.Mely. Tautomers of a Fluorescent G Surrogate and Their Distinct Photophysics Provide Sensitive Information Channels // Angew. Chem. Int. Ed.- 2016.- V.55.- P.7974-7978.

32. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 2. Пер. англ.- М.: Мир, 1985.- 368с.

33. J.De Ruyck, M.Fameree, J.Wouters, E.A.Perpete, J.Preat, D.Jacquemin. Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity // Chem. Phys. Letters.- 2007.- V.450.- P.119–122.

34. А.Д.Супрун, Ю.І.Прилуцький. Основи теорії білкових молекул. - К.: ВПЦ "Київський університет", 2003.- 99 с.

35. V.M.Yashchuk,V.Yu.Kudrya. The spectral properties of DNA and RNA macromolecules at low temperatures: fundamental and applied aspects // Methods Appl. Fluoresc.- 2017.- V.5.- 014001.

36. Klopffer W. // Aromatic Polymers in Dilute Solid Solution. In: Charles E.Hoyle, J.M.Torkelson // Photophysics of Polymers.- Am.Chem.Soc., Washington, dc 1987, p.264-285.

37. Faidysh A.N., Slobodyanik V.V, Yashchuk V.N. Intramolecular energy transfer by singlet and triplet excitons in macromolecules.// J. Luminescence.- 1979.- V.21.- P.85-92.

38. Slobodyanik V.V., Naidyonov V.P., Pochinok V.Ya., Yashchuk V.N. Fluorescence and host-guest energy transfer in polymeric chains // J. Luminescence.- 1984.- V.29.- P.309-320.

39. Emanuele, E., Markovitsi, D., Milli, Ph., Zakrzewska, K. UV Spectra and Excitation Delocalization in DNA: Influence of the Spectral Width // Chem. Phys. Chem.- 2005.- V.6.- P.1387-1393.

40. Ballini J.P., Vigny P., Daniels M. Synchrotron excitation of DNA fluorescence. Decay time evidence for excimer emission at room temperature // *Biophys. Chem.*- 1983.- V.18.- P.61–65.
41. Vaya I., Gustavsson T., Douki T., Berlin Y., Markovitsi D. Electronic excitation energy transfer between nucleobases of natural DNA // *J. Am. Chem. Soc.*- 2012.- V.134.- P.11366–11368.
42. Ge G., Georghiou S. Excited-state properties of the alternating polynucleotide poly(dA-dT)-poly(dA-dT) // *Photochem. Photobiol.*- 1991.- V.54.- P.301-305.
43. V.Yu.Kudrya, V.M.Yashchuk, I.Ya.Dubey, K.I.Kovalyuk, O.I.Batsmanova, V.I.Mel'nik, G.V.Klishevich, A.P.Naumenko, Yu.M.Kudrya. The Spectral Properties of the Telomere Fragments // *Ukr. J. Phys.*- 2016.- V.61, N.6.- P.516-518
44. V.M.Yashchuk, V.Yu.Kudrya, I.Ya.Dubey, K.I.Kovalyuk, O.I.Batsmanova, V.I.Mel'nik, G.V.Klishevich. Luminescence of telomeric fragments of DNA macromolecule // *Mol.Cryst.Liq.Cryst.*- 2016.-Vol.639.-P.1-9.
45. Birks J.B. Excimers // *Rep.Prog.Phys.*- 1975.- V.38.- P.903-974.
46. M.Yu.Losytskyy, V.M.Yashchuk, S.M.Yarmoluk. Electronic singlet excitations transfer in DNA-cyanine dye system // *Functional Materials.*- 2000.- V.7, N4.- P.1-5.
47. T.M.Nordlund, D.Xu, K.O.Evans. Excitation Energy Transfer in DNA: Duplex Melting and Transfer from Normal Bases to 2-Aminopurine // *Biochemistry.*- 1993.- V.32.- P.12090-12095.
48. M.Kawai, M.J.Lee, K.O.Evans, T.M.Nordlund. Temperature and base sequence dependence of 2-aminopurine fluorescence bands in single- and double-stranded oligodeoxynucleotides // *J.Fluorescence.*- 2001.- V.11(1).- P.23-32.
49. V.P.Tokar, M.Yu.Losytskyy, V.M.Yashchuk. Peculiarities of the DNA-Styrylcyanine dye system luminescence // *Ukr. J. of Phys.*- 2008.- V.53, N.12.- P.1149-1154.

50. V.Yu.Kudrya, V.M.Yashchuk, M.Yu.Losytskyy, V.V.Gusak, O.I.Dacenko, D.M.Kryvorotenko, A.O.Balanda, S.M.Yarmoluk, Y.O.Gumenyuk. The Photostable Luminescent Dyes and Their Influence on the DNA // Вісник Київського університету. Сер.Фізико-математичні науки.- 2006.- Вип.3.- С.501-513.
51. V.M.Yashchuk, V.V.Gusak, I.M.Dmytruk, V.M.Prokopets, V.Yu.Kudrya, M.Yu.Losytskyy, V.P.Tokar, Ya.O.Gumenyuk, S.M.Yarmoluk, V.B.Kovalska, A.O.Balanda, D.V.Kryvorotenko. Two-Photon Excited Luminescent Styryl Dyes as Probes for the DNA Detection and Imaging. Photostability and Phototoxic Influence on DNA// Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2007.- V.467.- P.325–338.
52. Levchenko S.M., Tokar V.P., Yashchuk V.M. Mobile electronic excitations in RNA // Functional Materials.- 2011.- V.18,N.3.- P.1-3.
53. Bersohn A., Isenberg I. Phosphorescence in nucleotides and nucleic acids // J. Chem. Phys.- 1964.- V.40, N11.- P.3175-3180.
54. V.M.Yashchuk, V.Yu.Kudrya, S.M.Levchenko, N.V.Yevtushenko. Some Peculiarities of Electronic Excitation Energy Structure of the Biologic Polynucleotides and Processes of Triplet Excitation Trapping // Наукові записки НаУКМА: Сер.фіз.-мат.наук.-2007.- Т.61.- С.39-42.
55. Ohulchansky T.Y., Pudavar H.E., Yarmoluk S.M., Yashchuk V.M., Bergey E.J., Prasad P.N. A monomethine cyanine dye Cyan-40 for two-photon excited fluorescence detection of nucleic acids and their visualization in live cells // Photochem. Photobiol.- 2003.- V.77, N2.- P.138-145.
56. Кудря В.Ю. Спектральні прояви взаємодії олігоаденілату з високомолекулярними білками // Наукові записки НаУКМА: Сер. фіз.-мат. наук.- 2013.- Т.139.- С.34-37.
57. Th.Peters. All about Albumin. In: Biochemistry, genetics, and medical application.– NY: Academic press, 1996.– 432 p.
58. Lacowicz R. Principles of Fluorescence Spectroscopy.– NY: Springer Science, 2006.

59. Kochevar I.E. Photoimmunology. In: Photoimmunology, Krutmann J., Elmetts C.A. (eds.), Blackwell Science, London.– 1995. P.19-33.
60. Yang X.Y., Gaspano F.P., DeLeo V.A. 8-Methoxypsoralen-DNA Adducts in Patients Treated with 8-Methoxypsoralen and Ultraviolet A Light // J. Invest. Dermatol.- 1989.- V.92.- P.59-63.
61. Birks J.B. Photophysics of aromatic molecules.-N.Y.: Willey-Interscience, 1970.- 650p.
62. Красновский А.А., Шапошникова М.Г., Литвин Ф.Ф. Участие синглетного кислорода в фотохемилюминесценции, фотоокислении и фотосенсибилизирующем действии хлорофилла // Биофизика.- 1974.- Т.19, №4.- С.650-654.
63. Бутримович О.В., Гуринович В.В., Исаченкова Л.А. Фотореакционная дезактивация синглетных возбужденных состояний молекул в растворах, содержащих галогенметаны // Тезисы докладов IV Всесоюзного совещания по фотохимии.- Ленинград, 1981.- С.253.
64. Rabek J.F., Ranby B. The role of singlet oxygen in the photooxidation of polymers // Photohem. Photobiology.- 1978.- V.28.- P.557-570.
65. Nowakowska M., Kowal J, Waligora B. Photooxidation of polystyrene films. Part II. Photooxidation of polystyrene films with light not absorbed by polymer // Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellonskiego.- 1978.- V.489, N323.- P.125-133.
66. Слободяник В.В., Файдыш А.Н., Ящук В.Н., Федорова Л.Н. Спектральные методы исследования кинетики фотоокисления мономера /БК/ и полимера /ПБК/ N-винилкарбазола // Докл. АН УССР. Сер.Б.- 1977.- N8.- С.714-717.
67. В.В.Слободяник, А.Н.Файдыш, В.Н.Ящук, О.В.Мавреник, Л.Н.Федорова. Изменения поглощения и флуоресценции поливинилкарбазола и его сополимеров при фотоокислении // Высокомогл. соед.- 1978.- Т.20А.- С.2264-2268.

68. Горбань И.С., Ящук В.Н., Кальницкий А.Я., Найденов В.П. Особенности элементарного акта переноса энергии электронного возбуждения в макромолекулах // Журн. прикл. спектроскопии.- 1987.- Т.47, N1.- С.96-101.
69. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. Молекулярная биология клетки. Т.1.- М.: Мир, 1994.- 517 с.
70. S.Katoh. Early research on the role of plastocyanin in photosynthesis // Photosynthesis Research.- 2003.- V.76.- P.255-261.
71. J.J.Pueyo, C.Gomez-Moreno, S.G.Mayhew. Oxidation-reduction potentials of ferredoxin-NADP⁺ reductase and flavodoxin from *Anabaena* PCC 7119 and their electrostatic and covalent complexes // Eur. J. Biochem.- 1991.- V.202.- P.1065-1071.
72. R.Cammack, K.K.Rao, C.P.Bargeron, K.G.Hutson, P.W.Andrew, L.J. Rogers. Midpoint Redox Potentials of Plant and Algal Ferredoxins // Biochein. J. - 1977. - V.168. - P.205-209
73. R.M.Schuermans, J.M.Schuermans, M.Bekker, J.C.Kromkamp, H.C.P.Matthijs, K.J.Hellingwerf. The Redox Potential of the Plastoquinone Pool of the Cyanobacterium *Synechocystis* Species Strain PCC 6803 Is under Strict Homeostatic Control // Plant Physiology.- 2014.- V.165.- P.463-475.
74. L.Barsanti, P.Gualtieri. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition, CRC Press, 2014.
75. J.G.Fernandez-Velasco, A.Jamshidi, X.-S.Gong, J.Zhou, R.Y.Ueng. Photosynthetic Electron Transfer through the Cytochrome b6f Complex Can Bypass Cytochrome f* // The Journal of Biological Chemistry.- 2001.- V.276.- P.30598-30607.
76. <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/index.htm>
77. R. Croce, H. van Amerongen. Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: From individual complexes to thylakoid membrane // J. Photochem. Photobiol. B.- 2011.- V.104.- P.142-153.
78. E.J.Boekema, H. van Roon, J.F.L. van Breemen, J.P.Dekker. Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting

- antenna in partially solubilized photosystem II membranes // Eur. J. Biochem.- 1999.- V.266.- P.444-452.
- 79.** R.Bassi, B.Pineau, P.Dainese, J.Marquardt. Carotenoid-binding proteins of photosystem II // Eur.J.Biochem.- 1993.- V.212.- P.297-303.
 - 80.** T. Renger, E. Schlodder. Optical properties, excitation energy and primary charge transfer in photosystem II: Theory meets experiment // J. Photochem. Photobiol. B.- 2011.- V.104.- P.126-141.
 - 81.** M.Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen // Annalen der Physik.- 1931.- V.401, N3.- P.273-294.
 - 82.** Ramaiah D., Eckert I., Arun K.T., Weidenfeller L., Epe B. Photochem. Photobiol.- 2004.- V.79.- P.99.
 - 83.** Woods J.A., Traynor N.J., Brancalion L., Moseley H. Photochem.Photobiol.- 2004.- V.79.- P.105.
 - 84.** Kovalska V.B., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Losytskyi M.Yu., Tokar V.P., Yarmoluk S. M. Dyes and Pigments.- 2005.- V.67.- P.47.
 - 85.** Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Yarmoluk S.M., Yashchuk V.M., Bergey E.J., Prasad P.N. A monomethine cyanine dye Cyan 40 for two-photon excited fluorescence detection of nucleic acids and their visualization in live cells // Photochem. Photobiol.- 2003.- V.77(2).- P.138-145.
 - 86.** A.Pliss, L.Zhao, T.Y.Ohulchanskyy, J.Qu, P.N.Prasad. Fluorescence Lifetime of Fluorescent Proteins as an Intracellular Environment Probe Sensing the Cell Cycle Progression // ACS Chemical Biology.- 2012.- V.7(8).- P.1385-1392.
 - 87.** Yu Z., Ohulchanskyy T. Y., An P., Prasad P. N., Lin Q. Fluorogenic, Two-Photon-Triggered Photoclick Chemistry in Live Mammalian Cells // J. Am. Chem. Soc.- 2013.- V.135(45).- P.16766-16769.
 - 88.** M.Sholokh, R.Sharma, D.Shin, R.Das, O.A.Zaporozhets, Y.Tor, Y.Mely. Conquering 2-Aminopurine's Deficiencies: Highly Emissive

Isomorphous Guanosine Surrogate Faithfully Monitors Guanosine Conformation and Dynamics in DNA // J. Am. Chem. Soc.- 2015.- V.137, N.9.- P.3185-3188.

89. A.P.Demchenko. Optimization of fluorescence response // Anal. Biochem.- 2005.- V.343.- P.1-22.

90. <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/protein-detection-and-proteomics-technology/detection-of-the-total-protein-profile-in-gels-on-blots-on-microarrays-and-in-capillary-electrophoresis.html>

91. M.Yu.Losytskyy, K.D.Volkova, V.B.Kovalska, I.E.Makovenko, Yu.L.Slominskii, O.I.Tolmachev, S.M.Yarmoluk. Fluorescent Properties of Pentamethine Cyanine Dyes with Cyclopentene and Cyclohexene Group in Presence of Biological Molecules // Journal of Fluorescence.- 2005.- V.15, №6.- P.849-857.

92. Ковальська В.Б. Флуоресцентні барвники для детекції білків різної просторової організації // Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2012.

93. Чиссов В.И., Соколов В.В., Булгакова (Жаркова) Н.Н., Филоненко Е.В. Флюоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций // Российский биотерапевтический журнал.- 2003.- Т.2, № 4.- С.45-56.

94. Конов В.И., Осико В.В., Щербаков И.А. Фундаментальные достижения оптики и лазерной физики для медицины // Вестник Российской академии наук.- 2004.- Т.74, № 2.- С.25-37.

95. Olivo M. Cancer detection using biophotonics // Asia Pacific Biotech News .- 2006.- V.10, N. 12.- P. 653-658.

96. Популярная медицинская энциклопедия. Гл. ред. Б.В.Петровский.- М.: «Советская энциклопедия», 1987.- 704 с.

97. George P.J.M. Fluorescence bronchoscopy for the early detection of lung cancer // Thorax.-1999.- V.54.- P.180-183 (<http://thorax.bmj.com>).

- 98.** Stepanek V.M.T, Hellebust A.E., Roblyer D.M. et al. Autofluorescence imaging to detect oral premalignant and malignant lesions // Worlddental Online. 8 May 2011.
- 99.** Jacques S.L. Optical properties of biological tissues: a review // Phys. Med. Biol.- 2013.- V.58.- P.R37-R61.
- 100.** Gabrecht T., Glanzmann T., Freitag L. et al. Optimized autofluorescence bronchoscopy using additional backscattered red light // Journal of Biomedical Optics.- 2007.- V.12, N. 6.- P. 064016-1-064016-9.
- 101.** Prasad P.N. Introduction to Biophotonics. John Wiley & Sons, Inc., 2003.- 593 p.
- 102.** Metwally M. On improving early lung cancer detection and localization by automated image cytometry and autofluorescence bronchoscopy. Ph.D. thesis.- Faculty of Medicine of the University of Duisburg-Essen, Germany.- 2000.- 67 p. (<http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-10459/Dissmetwally.pdf>)
- 103.** Demos S.G., Gandour-Edwards R., Ramsamooj R., White R. Near-infrared autofluorescence imaging for detection of cancer // Journal of Biomedical Optics.- 2004.- V.9, N. 3.- P.587-592.
- 104.** H.Zeng, A.Weiss, R.Cline et al. Real-time endoscopic fluorescence imaging for early cancer detection in the gastrointestinal tract// Bioimaging.– 1998.– N.6.- P.151-165.
- 105.** Lee P., van den Berg R.M., Lam S. et al. Color fluorescence ratio for detection of bronchial dysplasia and carcinoma *in situ* // Clin. Cancer Res.- 2009.- V.15, N.14.- P.4700-4705.
- 106.** Zheng X., Xiong H., Li Y. et al. Application of Quantitative Autofluorescence Bronchoscopy Image Analysis Method in Identifying Bronchopulmonary Cancer // Technology in Cancer Research & Treatment. Reprint.- 2016.- P.1-6 (DOI: 10.1177/1533034616656466).
- 107.** Chwirot B.W., Chwirot S., Jedrzejczyk W., et al. Ultraviolet laser-induced fluorescence of human stomach tissues: Detection of

cancer tissues by imaging techniques // Lasers in Surgery and Medicine.- 1998.- V.21, N.2.- P.149-158.

108. Yang Y., Ye Y., Li F., Li Y., Ma P. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin // Lasers in Surgery and Medicine.- 1987.- V.7.- P.528-532.

109. Georgakoudi I., Jacobson B.C., Muller M.G. et al. NAD(P)H and Collagen as *in Vivo* Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Precancerous Changes // Cancer Research.- 2002.- V.62.- P.682-687.

110. Kravchenko V.M., Buriy O.M., Kovalchuk I.M, Yashchuk V.M., Kushnir K.M. Autofluorescent biomolecular sensor for early cancer diagnostics // 9th European Conference On Atoms Molecules & Photons. Abstracts. 6–11 May 2007, Heraklion, Crete, Greece.– Tu3-12.

111. Awasthi K., Moriya D., Nakabayashi T, Li L., Ohta N. Sensitive detection of intracellular environment of normal and cancer cells by autofluorescence lifetime imaging // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.- 2016.- V.165.- P.256–265.

112. Kalyanasundaram K. Photochemistry of porphyridine and porphyrin complexes. Chapter 13 and references therein.- London: Academic Press, 1991.

113. Wang H.W, Wei Y.H., Guo H.W. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for the detection of cell death // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.- 2009.- V.9, N9.- P.1012-1017.

114. P.Agostinis, K.Berg, K.A.Cengel, T.H.Foster, A.W.Girotti, S.O.Gollnick, S.M.Hahn, M.R.Hamblin, A.Juzeniene, D.Kessel, M.Korbelik, J.Moan, P.Mroz, D.Nowis, J.Piette, B.C.Wilson, J.Golab. Photodynamic therapy of cancer: An update // CA Cancer Journal for Clinicians. – 2011. – V.61, N4. – P. 250-281.

115. R. Bonnet. Chemical aspects of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

116. R.R.Allison. Photodynamic therapy: oncologic horizons // Future Oncol. – 2014. – V.10, N1. – P. 123-124.

- 117.** B.C.Wilson. Photodynamic therapy for cancer: Principles // Can. J. Gastroenterol. – 2002. – V.16, N6. – P.393-396.
- 118.** A.P.Castano, T.N.Demidova, M.R.Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2005. – V.2, N2. – P. 91-106.
- 119.** F.H.J.Figge, G.S.Wieland, L.O.J.Manganiello. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. // 1948. – V.68. – P. 600-601.
- 120.** M.R.Hamblin, E.L.Newman. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1994. – V.23. – P. 3-8.
- 121.** I.Yoon, J.Z.Li, Y.K.Shim. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy // Clin. Endosc. – 2013. – V.46. – P. 7-23.
- 122.** F.Danhier. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? // Journal of Controlled Release. – 2016. – V.244, Part A. – P.108-121.
- 123.** J.W.Nichols , Y.H.Bae. EPR: Evidence and fallacy // J. Control. Release. – 2014. – V.190. – P. 451-464.
- 124.** Y.Nakamura, A.Mochida, P.L.Choyke, H.Kobayashi. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? // Bioconjugate Chem. – 2016. - V.27, N10. – P.2225-2238.
- 125.** <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/photodynamic-fact-sheet>
- 126.** L.Brancalion, H.Moseley. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy // Lasers Med. Sci. – 2002. – V.17. – P. 173-186.
- 127.** A.M.Smith, M.C.Mancini, S.Nie. Second window for in vivo imaging // Nature nanotechnology. – 2009. – V.4. – P.710-711.

- 128.** Z.Huang. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy // Technol. Cancer Res. Treat.– 2005.– V.4, N3. – P.283-293.
- 129.** Г.Грей. Электроны и их химическая связь. М.: Мир, 1967, 234 с.
- 130.** M.Laing. The Three Forms of Molecular Oxygen // Journal of Chemical Education. – 1989. – V.66, N6. – P. 453-455.
- 131.** M.C.DeRosa, R.J.Crutchley. Photosensitized singlet oxygen and its applications // Coordination Chemistry Reviews. – 2002. V.233-234. - P. 351-371.
- 132.** T.J.Dougherty, C.J.Gomer, B.W.Henderson, G.Jori, D.Kessel, M.Korbelik, J.Moan, Q.Peng. Photodynamic Therapy // Journal of the National Cancer Institute.–1998.– V.90, N12.–P.889-905.
- 133.** <http://www.rxlist.com/photofrin-drug.htm>
- 134.** M.Gouterman, G.H.Wagniere, L.C.Snyder. Spectra of Porphyrins. Part II. Four Orbital Model // Journal of Molecular Spectroscopy. – 1963. – V.11. – P. 108-127.
- 135.** T.Hashimoto, Y.-K.Choe, H.Nakano, K.Hirao. Theoretical Study of the Q and B Bands of Free-Base, Magnesium, and Zinc Porphyrins, and Their Derivatives // J. Phys. Chem. A. – 1999. – V.103, N12. – P.1894-1904.
- 136.** Г.П.Гуринович, А.Н.Севченко, К.Н.Соловьев. Спектроскопия порфиринов // УФН. – 1963. – Т.LXXIX, вып. 2. – С.173-234.
- 137.** R.R.Allison, G.HDownie, R.Cuenca, X.-H.Hu, C.J.H.Children, C.H.Sibata. Photosensitizers in clinical PDT // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2004. – V.1, Iss.1. – P. 27-42.
- 138.** <http://www.medkoo.com/products/4723>
- 139.** H.A.Isakau, M.V.Parkhats, V.N.Knyukshto, B.M.Dzhagarov, E.P.Petrov, P.T.Petrov. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulations: photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction in vitro // J. Photochem. Photobio. B. – 2008. – V.92. – P. 165-174.

- 140.** W.R.Dichtel, J.M.Serin, C.Edder, J.M.J.Fréchet, M.Matuszewski, L.-S.Tan, T.Y.Ohulchanskyy, P.N.Prasad. Singlet Oxygen Generation via Two-Photon Excited FRET // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – V.126, N17. – P.5380-5381.
- 141.** S.Kim, T.Y.Ohulchanskyy, H.E.Pudavar, et al. // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – V.129, N9. - P.2669-2675.
- 142.** N.M.Idris, M.K.Gnanasammandhan, J.Zhang, P.C.Ho, R.Mahendran, Y.Zhang. *In vivo* photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers // Nature medicine. – 2012. – V.18, N10. – P. 1580-1586.
- 143.** W.Chen, J.Zhang. Using Nanoparticles to Enable Simultaneous Radiation and Photodynamic Therapies for Cancer Treatment // J. NanoSci. Nanotech. – 2006. – V.6. – P.1159-1166.
- 144.** L.Ma, X.Zou, B.Bui, W.Chen, K.H.Song, T.Solberg. X-ray excited ZnS:Cu,Co afterglow nanoparticles for photodynamic activation // Appl. Phys. Lett. – 2014. – V.105. – 013702.
- 145.** X.Zou, M.Yao, L.Ma, M.Hossu, X.Han, P.Juzenas, W.Chen. X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer // Nanomedicine. – 2014. – V.9, N15. – P.2339-2351.
- 146.** A.-L.Bulin, C.Truillet, R.Chouikrat, F.Lux, C.Frochot, D.Amans, G.Ledoux, O.Tillement, P.Perriat, M.Barberi-Heyob, C.Dujardin. X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins // J. Phys. Chem. C. – 2013. – V.117. – P. 21583-21589.
- 147.** S.Kaščáková, A.Giuliani, S.Lacerda, A.Pallier, P.Mercère, É.Tóth, M.Réfrégiers. X-Ray induced RadioPhotoDynamic Therapy (RPDT) using lanthanide micelles: beyond depth limitations // Nano Research. – 2015. – V.8. – P.2373-2379.
- 148.** H.Chen, G.D.Wang, Y.-J.Chuang, Z.Zhen, X.Chen, P.Biddinger, Z.Hao, F.Liu, B.Shen, Z.Pan, J.Xie. Nanoscintillator-Mediated X-ray Inducible Photodynamic Therapy for In Vivo Cancer Treatment // Nano Lett. – 2015. – V.15. – P.2249-2256.

Навчальне видання

ЯЩУК Валерій Миколайович
КУДРЯ Владислав Юрійович
КРАВЧЕНКО Владислав Миколайович
ЛОСИЦЬКИЙ Михайло Юрійович

ВСТУП ДО БІОФОТОНІКИ

Навчальний посібник
для студентів фізичних факультетів вузів

Друкується за авторською редакцією