

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

• Направление: 03.03.02 – «Физика»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА


(Бакалаврская работа)

**«КИНЕТИКА ФОТООКИСЛЕНИЯ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА»**

Студентка 4 курса

Группы 06-812

«18» июня 2022 г.

  
\_\_\_\_\_ (Макарова Д.А.)

Научный руководитель

доцент, к.ф.-м.н.

«18» июня 2022 г.

  
\_\_\_\_\_ (А.С. Низамутдинов)

Заведующий кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

«18» июня 2022 г.

  
\_\_\_\_\_ (А.В. Аганов)

Казань 2022 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	4
1.1. Законы поглощения света. ....	4
1.2. Квантовый выход. ....	7
1.3. Кинетика химических реакций.....	8
1.4 Классификация и биологическая роль разных групп птеринов.....	9
1.5. Фотофизические и фотохимические свойства птеринов. ....	11
1.6. Окисление птеринов. ....	13
1.7 Процесс окисления птеринов.....	14
1.8 Заболевание витилиго и его лечение .....	17
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	18
2.1 Регистрация спектров поглощения. ....	18
2.2 Лазерный источник УФ диапазона для облучения раствора птеринов. ....	18
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	19
3.1 Спектр поглощения раствора птеринов при облучении диодом .....	19
3.2 Разностные спектры поглощения при облучении диодом .....	20
3.3 Количественные результаты .....	22
3.4 Спектры поглощения авто- и фотоокисления.....	26
3.5 Разностные спектры.....	28
3.6 Пример аппроксимации гауссовыми функциями .....	29
3.7 Аппроксимация гауссовыми функциями авто- и фотоокисления на длинах волн 239 нм и 245 нм. ....	30
3.8 Аппроксимация гауссовыми функциями авто- и фотоокисления на длинах волн 300 нм и 340 нм. ....	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	33

## ВВЕДЕНИЕ

Нарушение меланогенеза ведёт к развитию ряда патологий, включая витилиго. Тетрагидробиоптерин ( $H_4Bip$ ) в качестве кофермента фенилаланингидроксилазы участвует в окислении фенилаланина в тирозин (предшественник меланина).  $H_4Bip$  легко окисляется кислородом *in vivo* и *in vitro*. Исследованиями доказано, что в пораженной области кожи содержится избыточное количество тетрагидробиоптерина и продуктов его окисления [1].

Существует гипотеза, что избыток тетрагидробиоптерина приводит к накоплению пероксида водорода. А это, в свою очередь, либо способствует индукции GTF-циклогидролазы, либо приводит к окислительному стрессу. Таким образом, мы имеем «замкнутый круг», поддерживающий избыточное количество тетрагидробиоптерина.

Исследованиями доказано, что активный лечебный спектр ультрафиолетовых (УФ) лучей расположен в диапазоне от 296 до 313 нм, хотя механизм действия до конца не изучен.

Идея выхода из данного «замкнутого круга» заключается в воздействии светом УФ диапазона спектра на окисление птеринов.

В рамках всего этого целью практической работы являлось изучение кинетики фотоокисления птеринов.

Исходя из поставленной цели, были решены следующие задачи:

- Сборка лазерной системы на основе кристалла на активной среде  $LiLu_{0,7}Y_{0,3}F_4:Ce^{+3}+Yb^{3+}$ .
- Приготовление трис-буфера с  $pH=7,19$ .
- Регистрация спектров поглощения растворов тетрагидробиоптерина в различных режимах облучения УФ светом со временем задержки 2 минуты.

- Интерпретация спектров поглощения, анализ динамики окисления тетрагидробиоптерина.
- Расчет квантового выхода димеров, концентрации димеров в зависимости от условий УФ облучения.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Законы поглощения света.

Пусть в весьма тонкий слой однородной окрашенной среды вступает поток монохроматической световой энергии с длиной волны  $\lambda$ , поглощаемой красителем (Рисунок 1). Если через каждый квадратный сантиметр поверхности слоя вступает ежесекундно  $I$  эрг, то световой поток равен  $I$  эрг/см<sup>2</sup> • сек. После прохождения слоя, имеющего толщину  $\delta x$  см, поток уменьшается в результате поглощения на положительную величину  $|\delta I|$ , представляющую собой энергию, поглощаемую ежесекундно в этом слое.

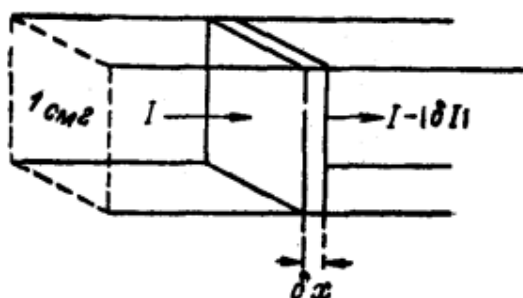


Рисунок 1 - Поглощение светового потока в тонком слое.

Допуская, что ослабление потока определяется только числом поглощающих частиц – молекул, находящихся на его пути, и не зависит от абсолютной величины потока, а так же от взаимного влияния молекул, можно получить два основных закона поглощения, подтверждаемых опытом [2].

1) Каждый тонкий слой постоянной толщины внутри однородной окрашенной среды поглощает определенную долю входящего в него потока монохроматической радиации – закон Бугера-Ламберта.



2) Поглощение данным тонким слоем пропорционально числу окрашенных молекул, в нем содержащихся, а следовательно, также числу их в единице объема среды, т.е. их концентрации – закон Бера.

Первую закономерность можно сформулировать как независимость поглотительной способности молекул от энергии светового потока  $I$ . Соблюдение этого закона было показано Вавиловым (1920 г.) посредством опыта, при котором поток изменялся от крайне малого значения до очень большого, а именно с  $10^{-11}$  до  $10^8$  эрг/см<sup>2</sup> • сек.

Напротив, закон Бера, утверждающий независимость поглотительной способности молекул от их сближения при увеличении концентрации, для красителей обычно нарушается и может рассматриваться лишь, как правило, справедливое только при достаточном разведении раствора[3].

Выразим концентрацию красителя числом  $n$  его молекул в 1 см<sup>3</sup>. Тогда в объеме тонкого слоя, равном  $\delta x$  см<sup>3</sup>, находится  $n\delta x$  молекул красителя. Поглощаемая в этом объеме доля светового потока есть  $\frac{|\delta I|}{I} = \frac{-\delta I}{I}$ , где  $|\delta I|$  - абсолютное значение величины, на которую уменьшается поток, а  $\delta I$  – сама, отрицательная, величина изменения потока ( $\delta I < 0$ ). Согласно приведенным двум законам поглощения, эта доля пропорциональна числу молекул, находящихся в объеме, т.е.

$$\frac{-\delta I}{I} = kn\delta x \text{ – закон Бугера-Ламберта-Бера,} \quad (1)$$

где коэффициент пропорциональности  $k$  называется молекулярным коэффициентом поглощения. Он зависит от примененной длины волны и представляет собой константу, характеризующую поглотительную способность молекулы для данной длины волны.

В формуле (1) слева от знака равенства стоит отвлеченное число. Поэтому  $k$  измеряется в единицах, размерность которой равна см<sup>2</sup>.

Обратимся к вопросу измерения молекулярной константы  $k$ , важность которой следует из последующего изложения.

Выше мы намеренно рассматривали поглощение в очень тонком слое для выяснения сущности явления. В действительности всегда имеют дело с окрашенным слоем конечной толщины  $l$  сантиметров, поглощение в котором настолько велико, что для него выражение (1) непосредственное неприменимо. Однако такой слой может быть мысленно разложен на ряд тонких слоев, последовательно проходимых светом, для каждого из которых справедлива формула (1). Заменяя  $kn$  на  $K$ , перепишем последнюю в виде  $\delta \ln I = -K \delta x$  и проинтегрируем это выражение от начальной величины светового потока  $I_0$ , вошедшего в слой при значении координаты  $x=0$ , до конечного его значения  $I_1$  после прохождения слоя, когда координата  $x=l$ . Получаем  $\ln I_1 - \ln I_0 = -Kl$  или  $\ln \frac{I_1}{I_0} = -Kl$ , откуда следует обычное выражение закона Бугера-Ламберта для слоя конечной толщины  $l$ :  $\frac{I_1}{I_0} = e^{-Kl}$ , где  $e$  – основание натуральных логарифмов.

При выводе этого закона предположено, что молекулы распределены в слое конечной толщины  $l$  настолько редко, что они не экранируют друг друга.

По закону Бера константа  $K$  пропорциональна концентрации красителя ( $K = kn$ ).

Отношение величины потока, вышедшего из слоя  $I_1$ , к вошедшему -  $I_0$ , носит название пропускания  $T$  слоя:

$$T = \frac{I_1}{I_0} = e^{-knl}.$$

Логарифм обратной величины  $\frac{1}{T}$

$$D = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I_l}$$

Называют оптической плотностью  $D$  слоя.

Концентрацию растворенного вещества общепринято выражать числом грамм-молекул в 1 литре раствора ( $M$ ); при этом вместо молекулярного коэффициента поглощения  $k$  необходимо соответственно пользоваться новым молярным коэффициентом поглощения  $\varepsilon_{\text{п}}$ , который удовлетворяет условию  $\varepsilon_{\text{п}}c = kn = K$ .

$$\frac{\varepsilon_{\text{п}}}{k} = \frac{n}{c} \approx 6 \cdot 10^{20}$$

На практике для большего удобства пользуются десятичными логарифмами и закон Бугера-Ламберта-Бера представляют в следующей форме:

$$\lg I_0 - \lg I_l = \varepsilon cl,$$

где  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции (молярный коэффициент поглощения).

## 1.2 Квантовый выход.

Способность молекул отдавать поглощенную энергию в виде световой энергии количественно характеризуют величиной выхода флуоресценции[4].

Под квантовым выходом  $\varphi$  флуоресценции понимают отношение числа фотонов  $h\nu$ , излученных на всем протяжении полосы испускания, к числу поглощенных за то же время фотонов при монохроматическом возбуждении светом данной частоты  $\nu$ :

$$\varphi = \frac{\text{число излученных фотонов}}{\text{число поглощенных фотонов}} = \frac{\text{число молекул излучивших}}{\text{число молекул поглотивших}}.$$

### 1.3 Кинетика химических реакций.

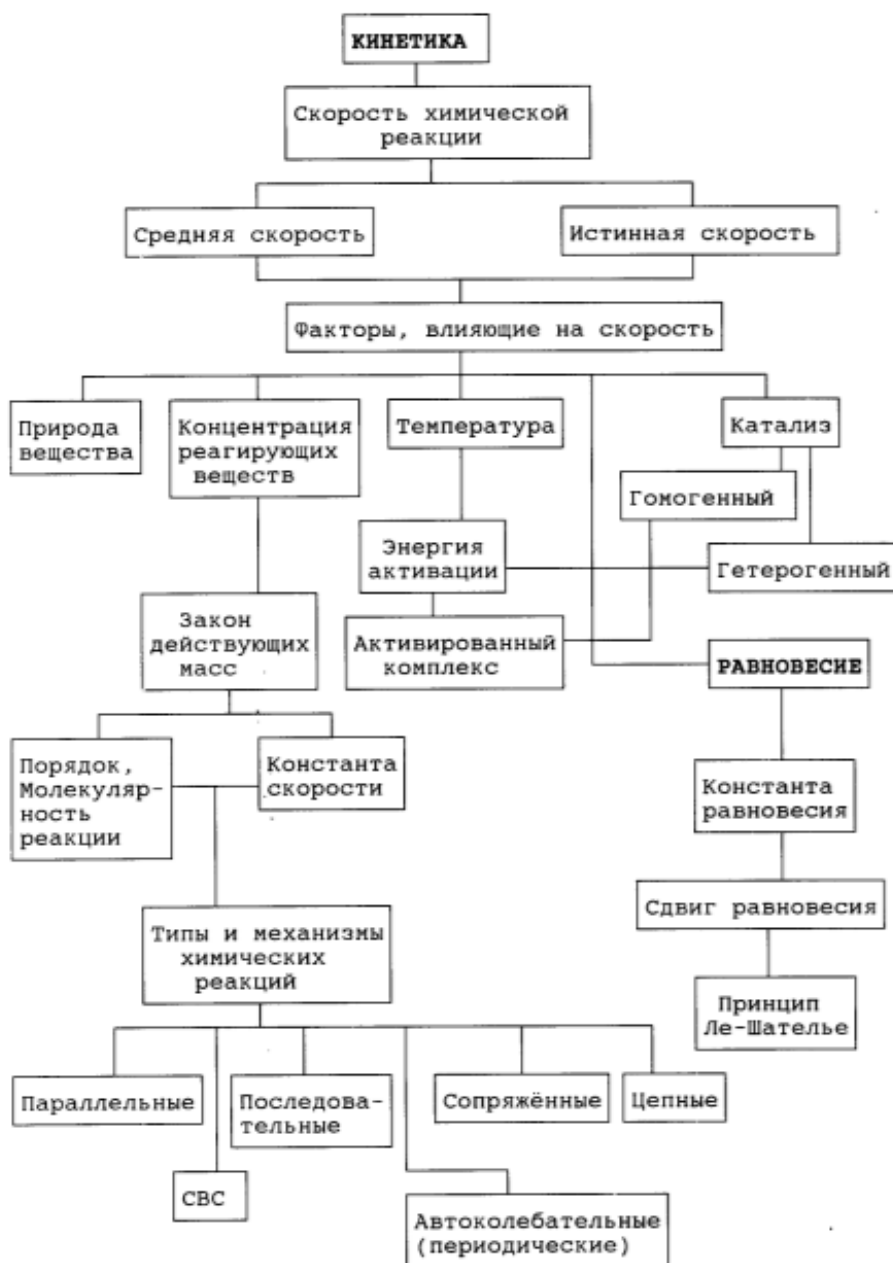


Рисунок 2 - Кинетика химических реакций.

Кинетика - раздел, изучающий скорости и механизмы химических реакций, а так же факторы, влияющие на них. Химические реакции идут с различной скоростью: одни очень быстро, другие – годами. Кроме того, чтобы реакции осуществлялись, необходимы определенные условия: давление, температура и др. Одна и та же реакция идет медленно при обычной температуре и очень быстро при высокой. Знание скоростей химических реакций имеет очень большое значение для науки и практики[5].

Кинетика изучает скорости химических реакций и их зависимость от различных факторов. Скорость химической реакции – это число элементарных актов реакции, происходящих в единицу времени в единице объема. Почему же скорость определяется числом элементарных актов взаимодействия? Дело в том, что взаимодействие происходит только в случае столкновения молекул друг с другом. Правда далеко не каждое столкновение молекул приводит к реакции. Необходимы еще соответствующая ориентация электронных облаков взаимодействующих молекул, а так же определенная энергия, которой молекулы должны обладать. Измеряется скорость химической реакции изменением концентрации реагирующих веществ в единицу времени.

Скорость химической реакции зависит от очень многих факторов:

- концентрации реагирующих веществ;
- температуры реакции;
- природы реагирующих веществ;
- катализаторов;
- степени измельчения (твердые вещества);
- среды (для реакций, идущих в растворе);
- интенсивности облучения и т.д.

Самыми главными и общими для большинства химических реакций являются первые четыре фактора. Другие же факторы действуют на определённые типы реакций. Так, интенсивность облучения влияет на фотохимические реакции.

#### **1.4 Классификация и биологическая роль разных групп птеринов**

Птерины – низкомолекулярные гетероциклические соединения, которые широко распространены в живых организмах, в первую очередь, в виде восстановленных коферментных форм. В основе строения птерина лежит птеридин с карбонильной группой ( $-C=O$ ) в  $C_4$  положении и аминогруппой ( $-NH_2$ ) в  $C_2$  положении (Рисунок 3, А). Птеридин

представляет собой конденсированную систему пиримидина и пиразина. Птерины делятся на две обширные группы: производные фолиевой кислоты, или «конъюгированные» птерины, и «неконъюгированные» птерины (производные птерина). В состав фолатов помимо птерина входит остаток пара-амино-бензойной кислоты (п-АБК) и от 1 до 5 остатков глутаминовой кислоты (Глу) (Рисунок 3, В). Кроме того, к птеринам относят и флавины (бензоптеридины) (Рисунок 3, Б).

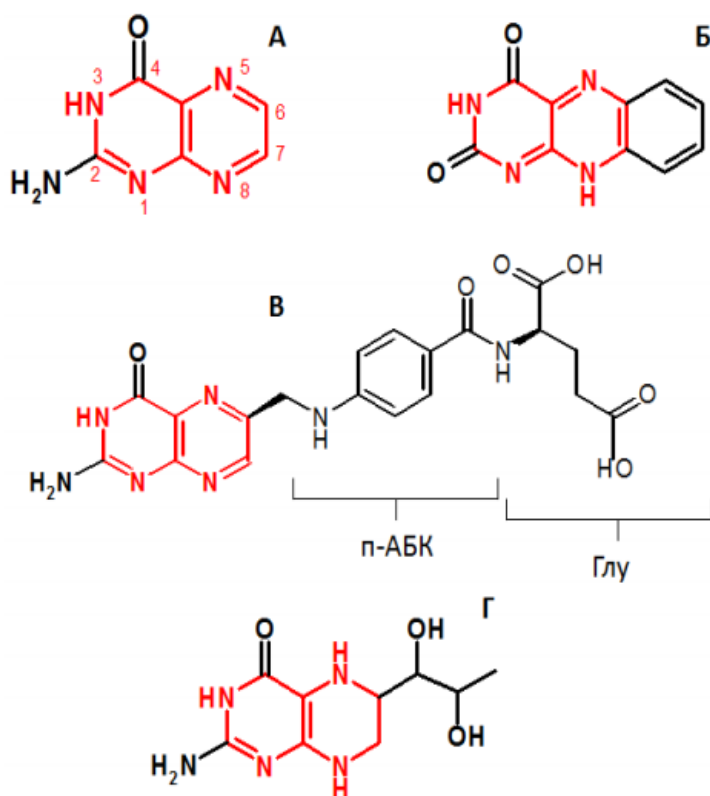


Рисунок 3 - Химическая структура птеринов (птеридиновая система показана красным): птерин (А), флавин (Б), фолиевая кислота (В), тетрагидробиоптерин (Г).

Птерины различаются по положению и характеру боковых групп. Разнообразие структур птеринов, в первую очередь, обусловлено вариацией заместителя в С<sub>6</sub> положении (Рисунок 3). Также птерины различаются по степени восстановленности как полностью восстановленные, или тетрагидровосстановленные, дигидровосстановленные и окисленные формы птеринов. Тетрагидровосстановленные птерины играют роль ключевых биологических коферментов. В первую очередь, речь идет о (6R)- L-5,6,7,8-



тетрагидробиоптерине ( $H_4Bip$ ) (Рисунок 3, Г). Биологическая роль  $H_4Bip$  состоит в участии в работе NO-синтаз других процессах жизнедеятельности.

Дигидроптерины, в отличие от тетрагидровосстановленных форм, как правило, не являются коферментами, и образуются как промежуточные соединения в ходе каталитического акта ряда ферментов (например, фенилалан-гидроксилазы, тирозингидроксилазы). Для ряда ферментов дигидроптерины являются субстратом: это сепиаптеринредуктаза, дигидрофолатредуктаза и другие.

Окисленные птерины присутствуют в живых организмах по большей части как продукты распада тетра- и дигидровосстановленных форм и используются в медицине как маркеры окислительного стресса, воспаления и активации иммунной системы, сердечнососудистых заболеваний, синтеза нейротрансмиттеров [6].

### **1.5 Фотофизические и фотохимические свойства птеринов.**

Фотохимия окисленных форм птеринов исследована наиболее подробно. Окисленные птерины отличает высокий выход флюоресценции, способность к эффективному переносу заряда, способность образовывать триплетные возбужденные состояния с длительным временем жизни, что, в свою очередь, обуславливает высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода [7]. Также отметим, что конечный продукт аутоокисления тетрагидробиоптерина,  $Bip$ , под действием УФ-излучения в присутствии молекулярного кислорода окисляется до 7,8-дигидро-6-формилптерина ( $H_2Fop$ ), который в свою очередь окисляется до 6-формилптерина ( $Fop$ ) и 6-карбоксихптерина ( $Kap$ ) (Рисунок 4).

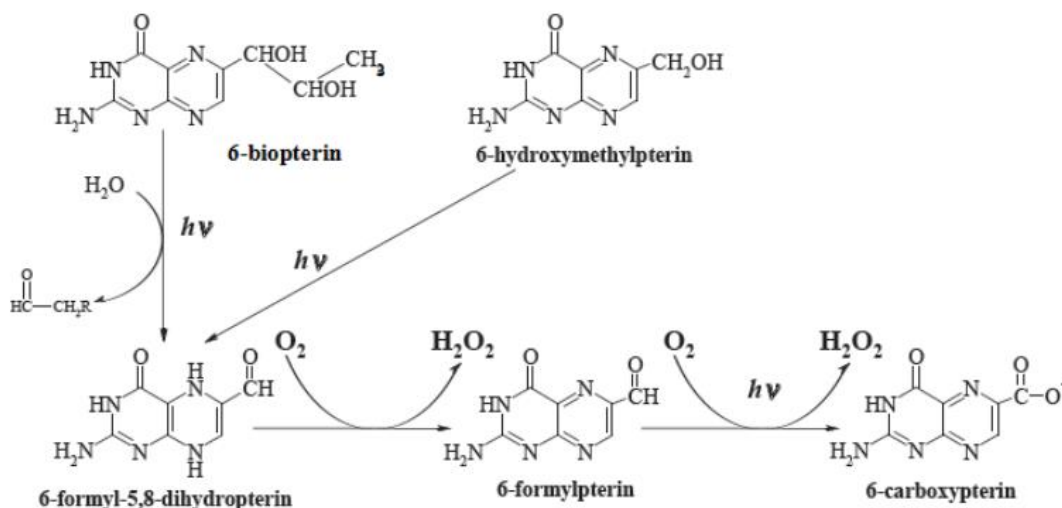


Рисунок 4 - Схема фотоокисления 6-биоптерина и 6-гидроксиметилптерина.

В отличие от окисленных, дигидровосстановленные формы птеринов имеют низкие квантовые выходы образования триплетов. Интенсивность их флюоресценции также существенно ниже, чем у окисленных птеринов. Под действием УФ-излучения в присутствии кислорода воздуха дигидроптерины могут окисляться до окисленных форм, либо в отсутствие  $\text{O}_2$  могут образовывать димеры [8]. Кроме того, известно, что дигидроформы птеринов являются эффективными тушителями активных форм кислорода (АФК). Дигидроптерины имеют высокие константы скорости тушения синглетного кислорода ( $k_q \Delta$ ): например, для  $\text{H}_2\text{Vip}$   $k_q \Delta = (3,7 \pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , для дигидронеоптерина  $k_q \Delta = (4,6 \pm 0,4) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

Если фотохимия окисленных и дигидровосстановленных форм птеринов изучена достаточно подробно, то фотохимия тетрагидровосстановленных, коферментных форм птеринов до сих пор остается почти не исследованной. По-видимому, это обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, длинноволновый максимум в спектре поглощения тетрагидровосстановленных птеринов сдвинут в область коротковолнового ультрафиолета: в этом диапазоне в живых организмах поглощают в основном белки и нуклеиновые кислоты. Во-вторых, восстановленные птерины не стабильны, так как подвержены окислению

молекулярным кислородом. Последнее обстоятельство значительно затрудняет изучение их фотохимии.

### 1.6 Окисление птеринов.

Вір образуется *in vivo* из  $H_2$ Вір путем неферментативного окисления. Однако специфический химический процесс, который приводит к этому превращению в коже человека при патологии, до сих пор не изучен [9].

Образование Вір может быть результатом окисления  $H_2$ Вір пероксидом водорода, но недавно было показано, что эта реакция дает дигидроксантиптерин ( $H_2$ Хар) как продукт. Тот же основной продукт был получен при «автоокислении»  $H_2$ Вір (реакция с  $O_2$  в растворе, уравновешенном воздухом) и признан типичным продуктом окисления 7,8-дигидроптерина производные, содержащие группу  $-CHOH$ , связанную с  $C_6$ . Однако сообщалось, что окисление  $H_2$ Вір  $^1O_2$  дает Вір.

С другой стороны, неферментативное окисление  $H_4$ Вір с помощью  $O_2$  или других окислителей приводит к образованию  $H_2$ Вір *in vivo*. Спектр поглощения этого соединения, как и Вір, имеет интенсивные полосы в УФ-А и УФ-В (280–320 нм) области спектра (Рисунок 5).

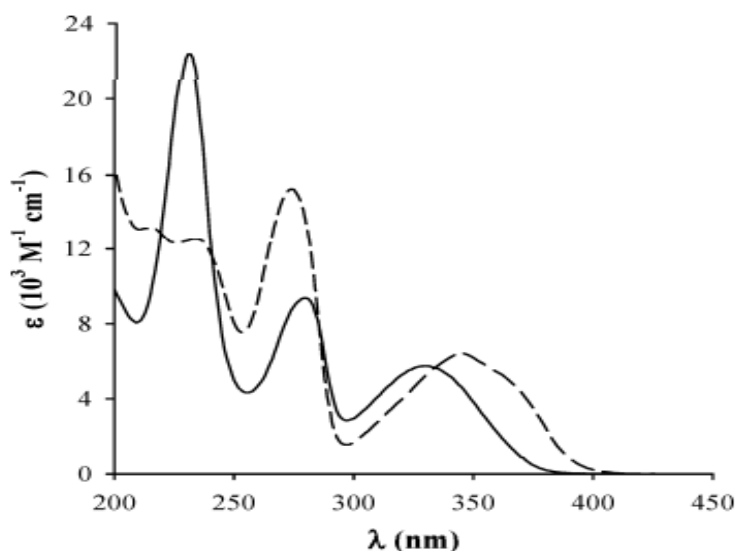
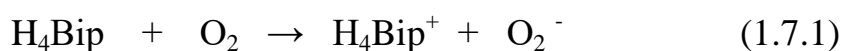


Рисунок 5 - Спектры поглощения  $H_2$ Вір и Вір в водных растворах (рН 6,8–7,0); сплошная линия:  $H_2$ Вір; пунктирная линия: Бип.

Несмотря на этот факт и наличие  $H_2Vip$  в коже человека, особенно в патологических ситуациях, при отказе от УФ защиты, фотохимическое поведение  $H_2Vip$  подробно не изучалось, хотя фотохимическое окисление  $H_2Vip$  может быть источником производства  $Vip$ .

### 1.7 Процесс окисления птеринов

5,6,7,8-Тетрагидробиоптерин ( $H_4Vip$ ) является коферментом фенилаланингидроксилазы, которая катализирует окисление молекулярным кислородом фенилаланина в тирозин (предшественник меланина) на начальном этапе процесса меланогенеза. Нарушение меланогенеза происходит при ряде дерматологических заболеваний, в том числе при витилиго, которое характеризуется появлением депигментированных участков кожи [10]. Тетрагидробиоптерин является полностью восстановленным птерином и легко окисляется кислородом (автоокисление) *in vivo* и *in vitro*. При автоокислении наряду с окисленными птеринами образуются и активные формы кислорода (АФК) ( $O_2^{\bullet-}$  - супероксид-анион радикал и  $H_2O_2$  –пероксид водорода). При витилиго  $H_2O_2$  определяется в коже пациентов в миллимолярных концентрациях. Образование АФК приводит к окислительному стрессу, который рассматривается в качестве одного из существенных факторов в патоэтиологии витилиго. У пациентов с витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез  $H_4Vip$  и образующийся избыток  $H_4Vip$  может подвергаться автоокислению. Процесс автоокисления  $H_4Vip$  начинается со спонтанной реакции переноса электрона с тетрагидробиоптерина на молекулу кислорода, в результате которой образуется супероксид-анион радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) и тетрагидробиоптерин-катион радикал ( $H_4Vip^{\bullet+}$ ):



Или образуется тригидробиоптериновый радикал  $H_3Vip^{\bullet}$  и гидропероксильный радикал  $HO_2^{\bullet}$ :



Свободные радикалы и АФК участвуют в дальнейших реакциях активации молекулярного кислорода и окисления  $\text{H}_4\text{Bip}$ . В целом, автоокисление  $\text{H}_4\text{Bip}$  является радикальным цепным процессом. Первым молекулярным продуктом автоокисления  $\text{H}_4\text{Bip}$  является хиноноидный 6,7-дигидробиоптерин ( $\text{qH}_2\text{Bip}$ ) с временем жизни 1,5 минуты. Затем  $\text{qH}_2\text{Bip}$  изомеризуется в более стабильный 7,8-дигидробиоптерин ( $\text{H}_2\text{Bip}$ ) или трансформируется в 7,8-дигидроптерин ( $\text{H}_2\text{Ptr}$ ) путём отрыва бокового радикала.  $\text{H}_2\text{Ptr}$  легко окисляется кислородом до дигидроксантиоптерина ( $\text{H}_2\text{Xap}$ ) и птерина (Pterin), а  $\text{H}_2\text{Bip}$  окисляется до биоптерина (Bip). На рисунке 6 представлены молекулярные продукты, образующиеся в процессе автоокисления  $\text{H}_4\text{Bip}$ .

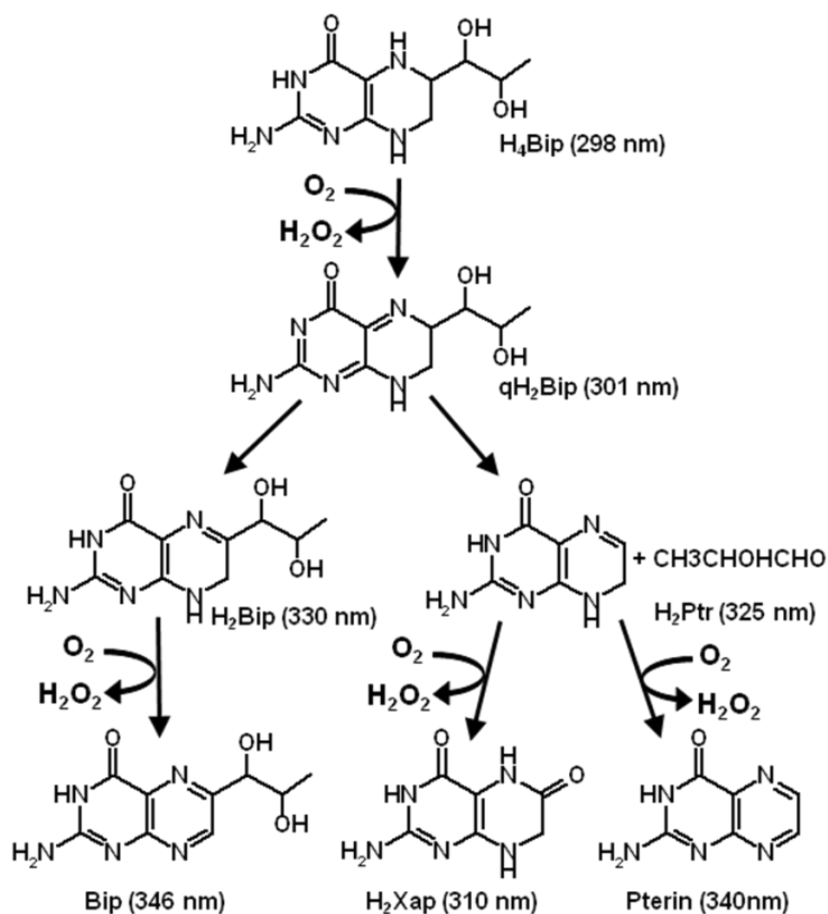


Рисунок 6 - Схема автоокисления тетрагидробиоптерина (в скобках длинноволновые максимумы в спектрах поглощения).

Методом HPLC-MS/MS-масс-спектрометрии было показано, что птериновые продукты автоокисления  $H_4\text{Vpr}$  (дигидроптерин, дигидроксантоптерин и птерин) преобладают над окисленными биоптериновыми продуктами (дигидробиоптерин и биоптерин) [11]. Важным моментом при рассмотрении автоокисления избытка  $H_4\text{Vpr}$ , сопровождающего витилиго, является образование  $H_2O_2$  на каждом этапе окислительного процесса. Накопление  $H_2O_2$  может приводить к формированию окислительного стресса (Рисунок 7).

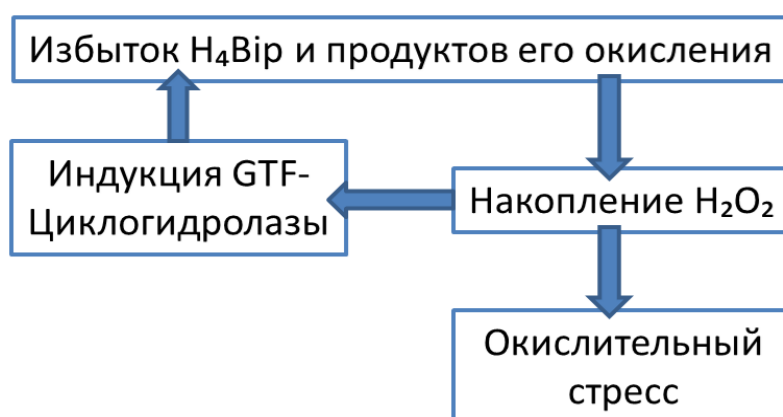


Рисунок 7 - Схема «замкнутого круга», поддерживающего избыточное количество тетрагидробиоптерина.

Есть гипотеза, что если  $H_4\text{Vpr}$  окислять так, чтобы  $H_2O_2$  не образовывалась, то можно значительно уменьшить количество окислительных процессов и тогда ситуация нормализуется [12].

Ранее было показано, что УФ излучение ускоряет автоокисление  $H_4\text{Vpr}$  в присутствии окисленных производных, служащих фотосенсибилизаторами. Фотосенсибилизированное окисление  $H_4\text{Vpr}$  может вносить вклад в патогенез витилиго.

Показано, что основной отличительной чертой фотоокисления  $H_4\text{Vpr}$  от его автоокисления является образование димеров дигидроптерина ( $H_2\text{Ptr}$ )<sub>2</sub> и дигидробиоптерина ( $H_2\text{Vpr}$ )<sub>2</sub> (Рисунок 8), в связи с чем была предложена



гипотеза уменьшения количества продуктов окисления  $H_4\text{Bip}$  за счет УФ облучения и генерации димеров как фактора УФ терапии витилиго [12].

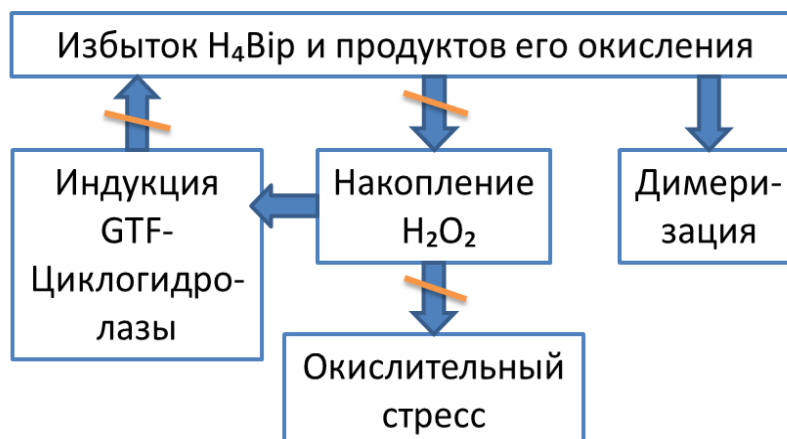


Рисунок 8 - Схема, отражающая идею выхода из «замкнутого круга», поддерживающего избыточное количество тетрагидробиоптерина путем димеризации процесса окисления птеринов.

### 1.8 Заболевание витилиго и его лечение

Витилиго – приобретенное заболевание кожного покрова, характеризующееся одним или несколькими депигментированными пятнами, возникающими в результате исчезновения меланоцитов. Встречается с распространенностью 0.5 – 1% в популяциях от общего населения. Его классифицируют как фокальный, генерализованный, сегментный или универсальный, а поражения могут влиять на любую часть тела. Чаще всего витилиго локализуется на руках, ногах, суставах и на лице. У пациентов наблюдается пониженное качество жизни и повышенный риск развития психологических заболеваний. Патогенез не изучен до конца, предложены многочисленные механизмы развития данного заболевания, в том числе аутоиммунные и нейронные [13]. Недавно была предложена новая теория на основе *in vivo* наблюдений, согласно которой возникновение данного расстройства может быть связана с отслоением меланоцитов от базального слоя, за которым следует транс-эпидермальную миграцию и смерть меланоцитов [14].

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Регистрация спектров поглощения.

Светом УФ лампы облучаем кювету с раствором птеринов в воде с буфером трис. Спектры фиксировались спектрофотометром StellarNet с интервалом в 2 минуты.

Важно так же отметить, что раствор находился на магнитной мешалке, что препятствовало нарушению структуры раствора.



Рисунок 9 - Схема экспериментальной установки регистрации спектров поглощения раствора птеринов, состоящая из: 1 – УФ лампа; 2 – Кювета с раствором Tris+H<sub>4</sub>Vip; 3 – магнитная мешалка; 4 – Спектрофотометр StellarNet.

### 2.2 Лазерный источник УФ диапазона для облучения раствора птеринов.

Для изучения влияния на клетки излучения ультрафиолетового диапазона спектра был собран лазер на активной среде LiLu<sub>0,7</sub>Y<sub>0,3</sub>F<sub>4</sub>:Ce<sup>+3</sup>+Yb<sup>3+</sup>. На рисунке 10 представлена схема лазерной установки.

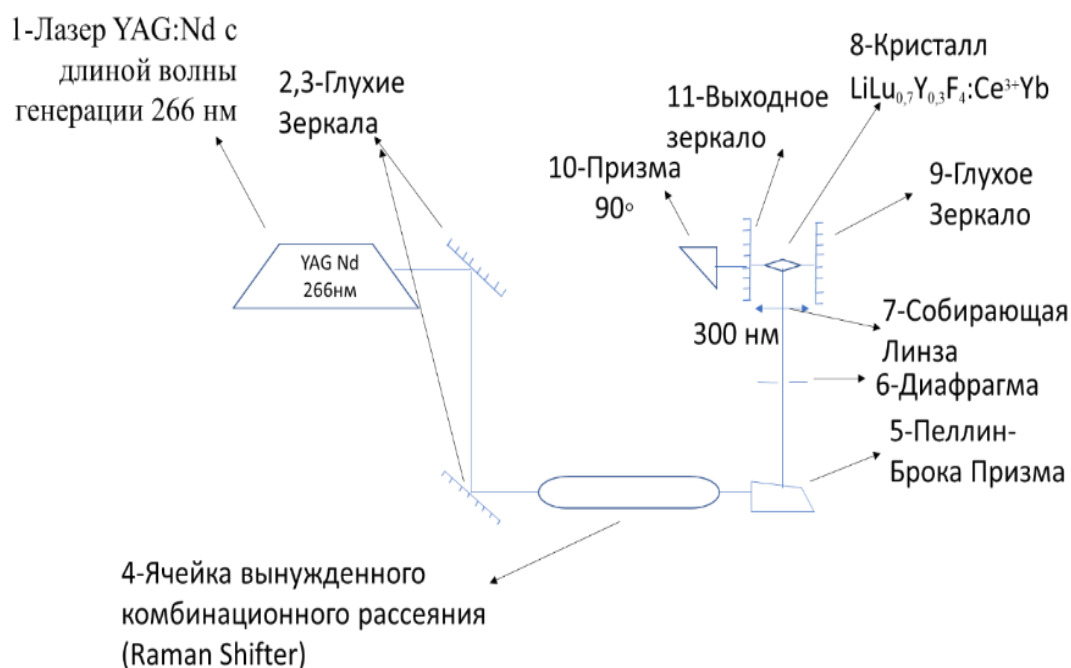


Рисунок 10 - Схема экспериментальной установки. 1 - лазер  $\text{YAG:Nd}^{3+}$ ; 2,3 - «глухие» зеркала с коэффициентом отражения  $R = 99,9\%$ ; 4 - ВКР ячейка; 5 - призма Пеллин-Брока; 6 - диафрагма; 7 - собирающая линза; 8 - кристалл  $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}\text{Yb}$ ; 9 - «выходное» зеркало с коэффициентом отражения  $R = 25\%$ ; 10 - призма  $90^\circ$ ; 11 - «заднее» зеркало с коэффициентом отражения  $R = 50\%$ .

Кювету с раствором птеринов в воде с буфером трис облучали лазером на протяжении 3-х минут, фиксировали спектры с помощью спекрофотометра StellarNet. Спектры фиксировались с интервалом 2 минуты.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Спектр поглощения раствора птеринов при облучении диодом

Некоторые из спектров поглощения приведены ниже (Рисунок 11). Данный спектр является суммой спектров поглощения многих продуктов окисления, каждый из которых имеет максимум поглощения на своей длине волны. Это серия облучения в период 1, 3, 7 и 10 минут облучения. Видно, что оптическая плотность уменьшается, достигает минимума в районе 245 нм, затем достигает максимума близ 310 нм, после чего уменьшается.

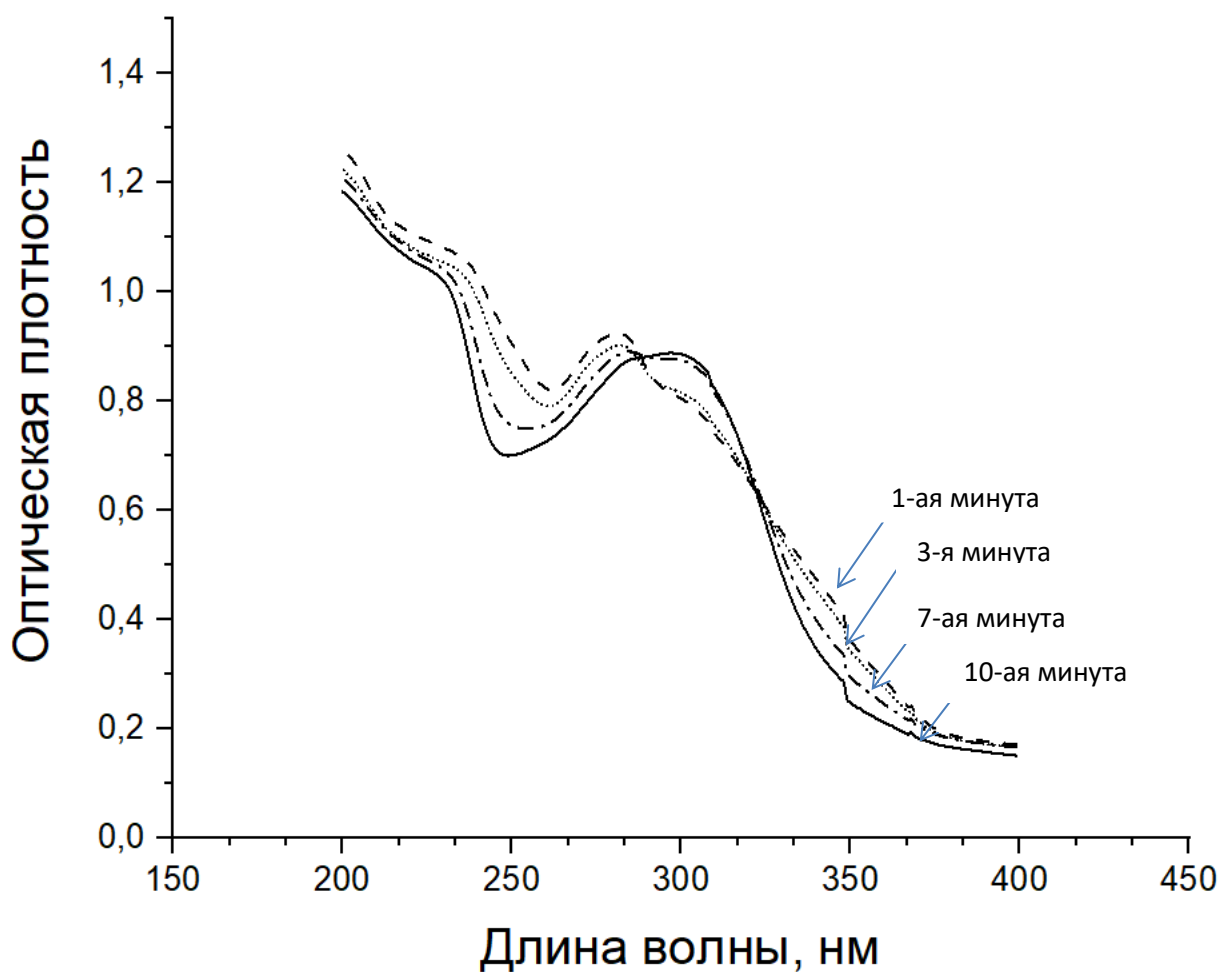


Рисунок 11 - Спектр поглощения раствора птеринов.

Данный рисунок просто иллюстрирует процесс окисления раствора птеринов. Для дальнейшего исследования необходимо получить разностные спектры.

### 3.2 Разностные спектры поглощения при облучении диодом

С целью оценки выхода димера относительно суммы продуктов реакций фотоокисления Тетрагидробиоптерина спектр продуктов был аппроксимирован суммой гауссовых функций (Рисунок 12), соответствующих полосам поглощения продуктов. Важными для оценки количества продуктов являются полоса поглощения с максимумом в области 245 нм, соответствующая поглощению димера дигидробиоптерина, а также полосы

на 301 нм - тетрагидробиоптерин и полоса на 340 нм - птерин. Каждый из спектров соответствует времени облучения с 1 по 10 минуту.

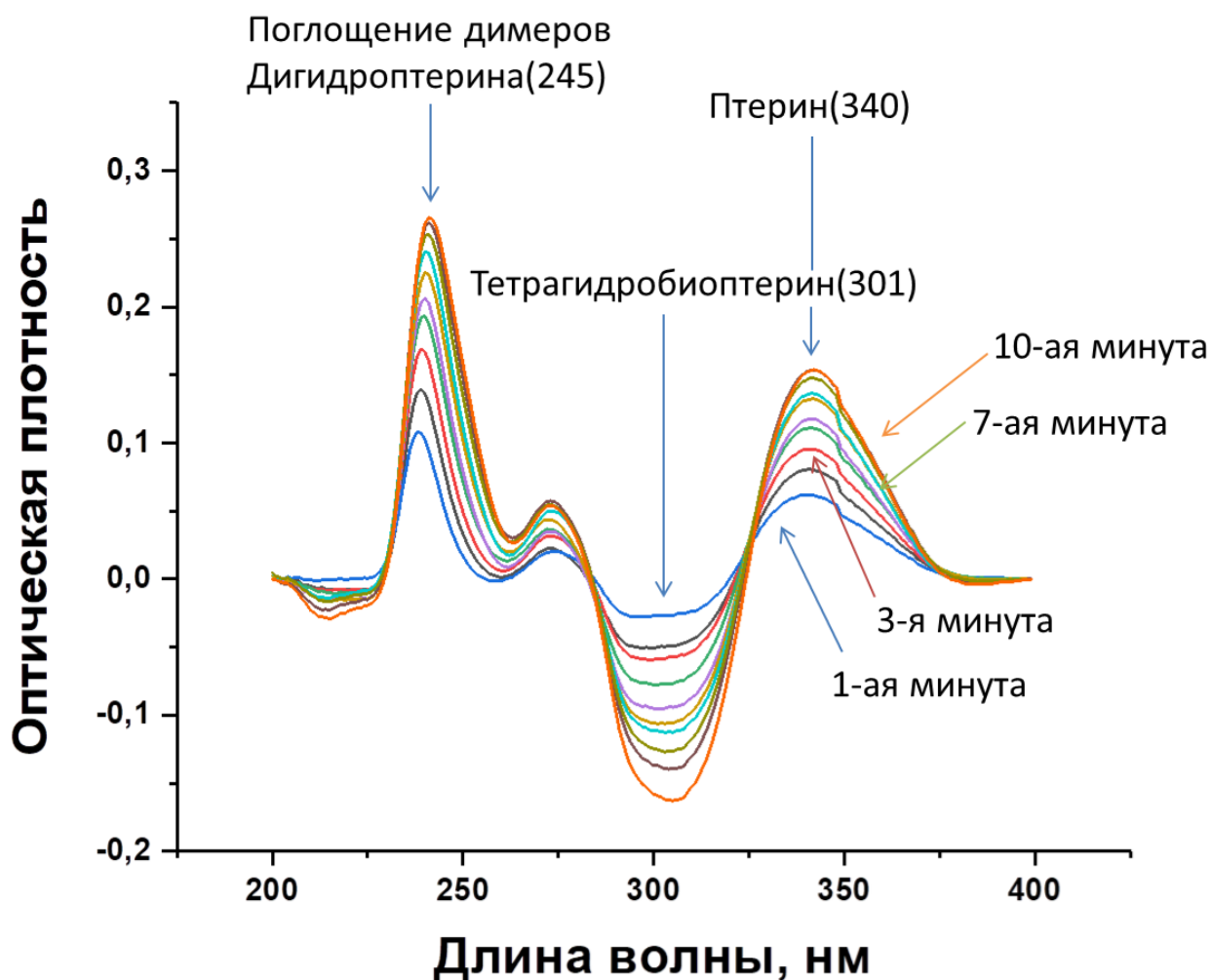


Рисунок 12 - Разностные спектры поглощения (каждый спектр соответствует минуте облучения) в количестве 10 штук.

Для более детального анализа рассмотрим пример облучения в период со 2 по 3 минуту облучения, иллюстрирующий аппроксимацию гауссовыми функциями (Рисунок 13). Здесь так же можно наблюдать максимум в области 245 нм, соответствующий поглощению димера дигидробиоптерина, и полосы на 301 нм - тетрагидробиоптерин , 340 нм - птерин.

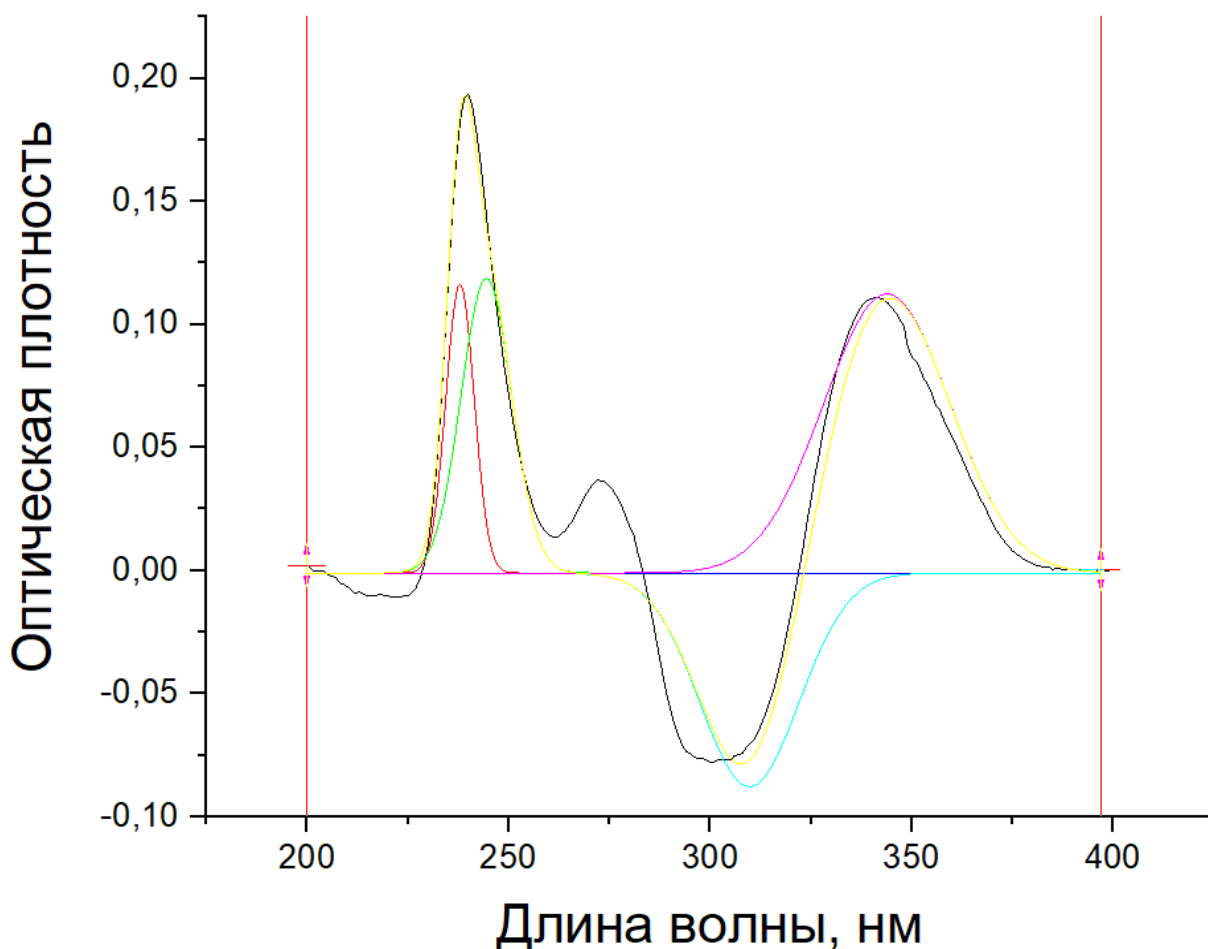


Рисунок 13 - Иллюстрация аппроксимации гауссовыми функциями разностного спектра на 5-ой минуте облучения раствора птеринов.

### 3.3 Количественные результаты

Результаты эксперимента представлены в Таблице 1. С помощью формул, обозначенных ниже, а так же некоторых констант из справочной литературы были посчитаны количество поглощенных фотонов  $K$  (3.3.2), количество димеров  $D$  (3.3.4) и квантовый выход  $Q$  (3.3.5). Важно отметить, что квантовый выход – это отношение количества димеров к количеству поглощённых веществом фотонов.

Таблица 1 – количественные результаты эксперимента (количество димеров  $D$ , количество поглощенных фотонов  $K$ , квантовый выход  $Q$ )



t, мин	K, 1/см <sup>3</sup>	D, 1/см <sup>3</sup>	Q, %
1	1,68 · 10 <sup>16</sup>	1,04 · 10 <sup>14</sup>	0,62
2	3,38 · 10 <sup>16</sup>	1,70 · 10 <sup>14</sup>	0,51
3	0,52 · 10 <sup>17</sup>	2,91 · 10 <sup>14</sup>	0,56
5	0,85 · 10 <sup>17</sup>	4,29 · 10 <sup>14</sup>	0,50
6	1,02 · 10 <sup>17</sup>	4,29 · 10 <sup>14</sup>	0,42
7	1,21 · 10 <sup>17</sup>	4,39 · 10 <sup>14</sup>	0,36
9	1,54 · 10 <sup>17</sup>	4,04 · 10 <sup>14</sup>	0,26
10	1,72 · 10 <sup>17</sup>	3,76 · 10 <sup>14</sup>	0,22

$$C = \frac{A \cdot N_A}{\varepsilon \cdot l} \quad (3.3.1),$$

Где

C – концентрация,

A – оптическая плотность,

N<sub>A</sub> – число Авогадро,

ε – коэффициент экстинкции,

l – оптический путь.

$$K = N - N \cdot 10^{-B} \quad (3.3.2),$$

Где

K – количество поглощенных фотонов,

N – количество фотонов,

B – абсорбция.

$$N = \frac{w \cdot t \cdot \lambda}{h \cdot c} \quad (3.3.3),$$

Где

w – мощность,

t – время облучения,

λ – длина волны,

$h$  – постоянная Планка,

$c$  – скорость света.

$$D = M \cdot C \quad (3.3.4),$$

Где

$D$  – количество димеров,

$M$  – интеграл по гауссам,

$C$  – концентрация.

$$Q = \frac{D}{K} \quad (3.3.5),$$

Где

$Q$  – квантовый выход,

$D$  – количество димеров,

$K$  – количество поглощенных фотонов.

На основании полученных результатов можно построить зависимость количества димеров от времени.

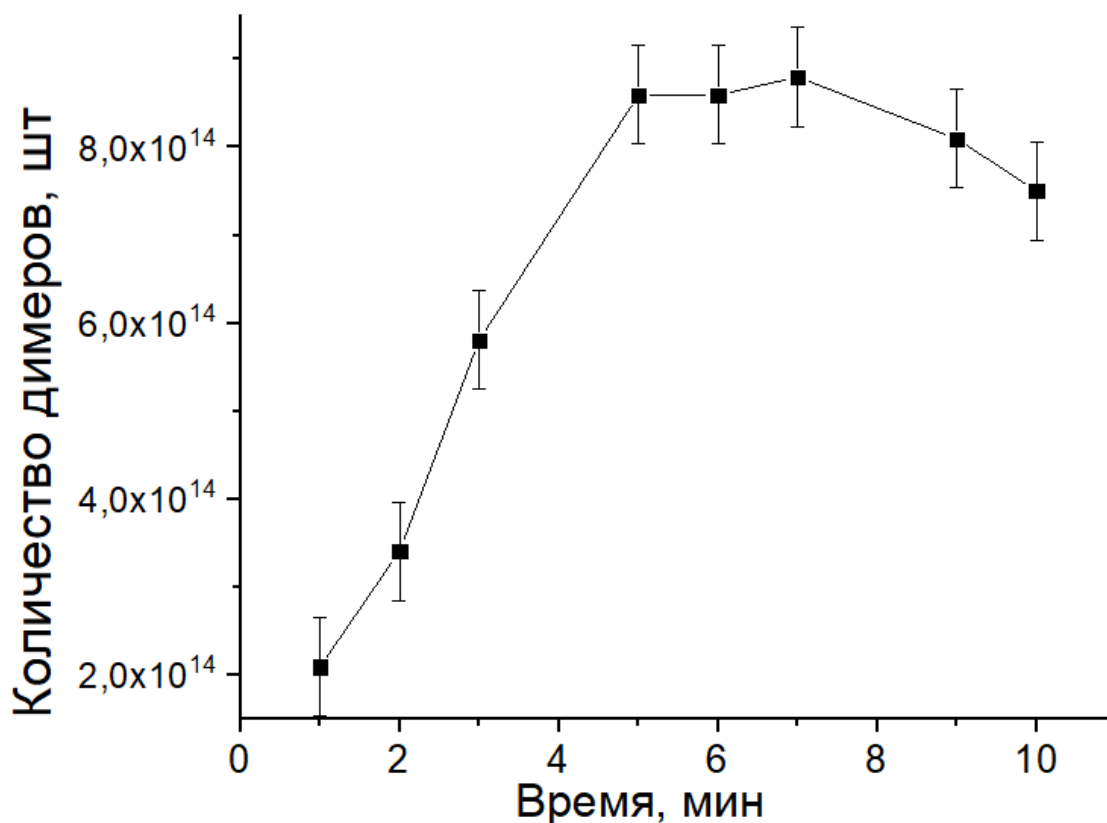


Рисунок 14 - Зависимость количества димеров от времени.

Анализируя график (Рисунок 14), можно установить, что с течением времени количество димеров увеличивается только до определенного значения. Сейчас мы можем говорить лишь о том, что есть смысл облучать раствор птеринов до 7 минуты, поскольку наибольшее количество димеров выделяется именно в этот период времени.

Так же можно установить зависимость квантового выхода от времени (Рисунок 15).

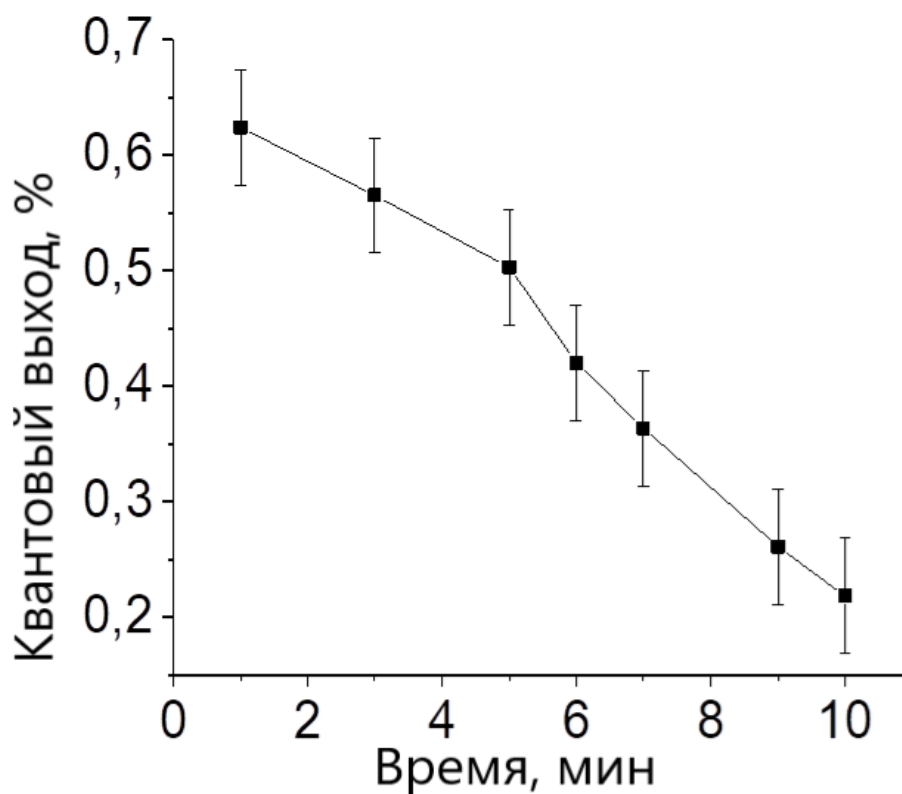


Рисунок 15 - Зависимость квантового выхода от времени.

Исходя из результата построения графика (Рисунок 15), можно наблюдать, что с течением времени квантовый выход уменьшается.

### 3.4 Спектры поглощения авто- и фотоокисления

Некоторые из спектров поглощения приведены ниже (Рисунок 16, Рисунок 17). Данные спектры являются суммой спектров поглощения многих продуктов окисления, каждый из которых имеет максимум поглощения на своей длине волны. Это серия облучения в период 2, 4, 6, и 16 минут облучения.

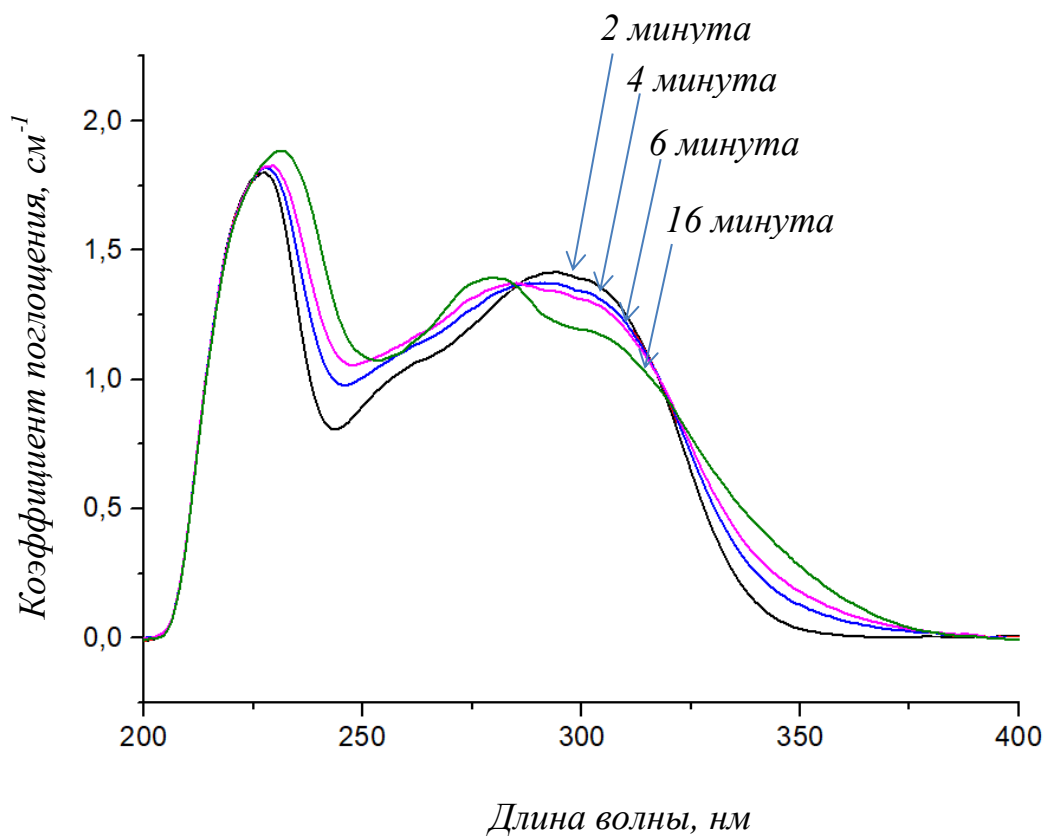


Рисунок 16 - Спектры поглощения в режиме автоокисления.

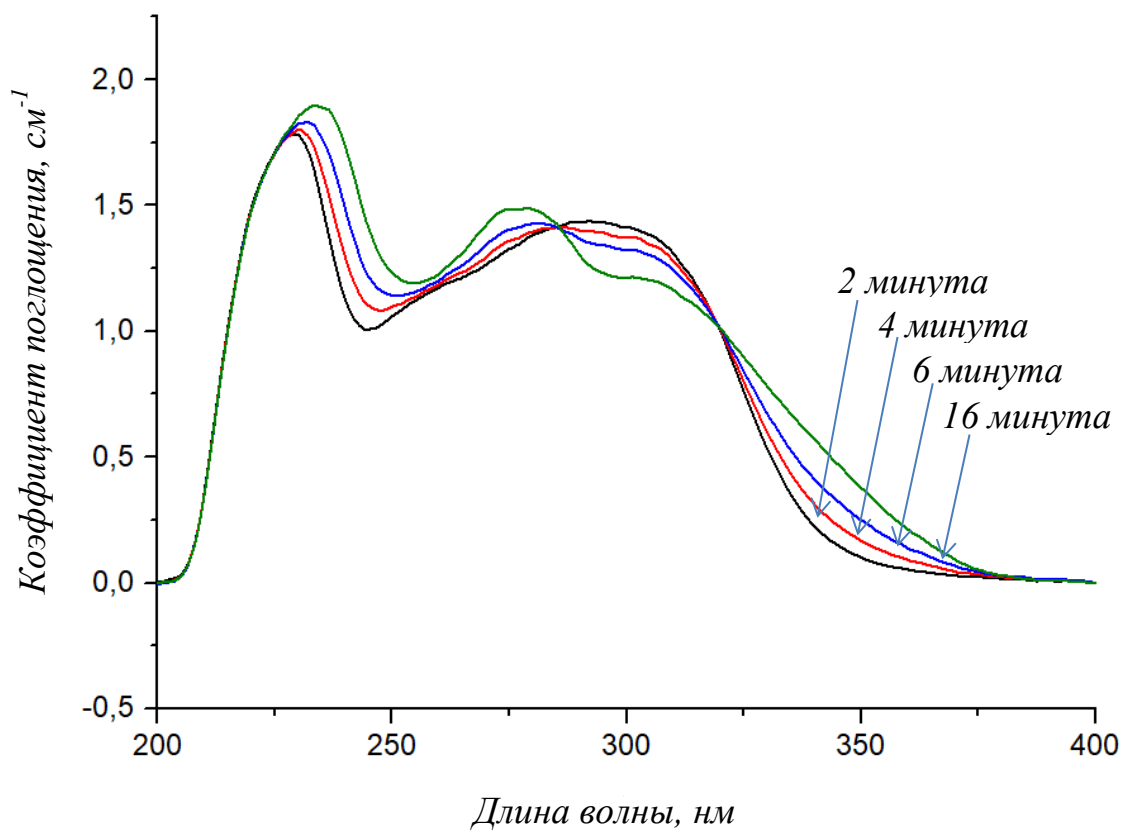


Рисунок 17 - Спектры поглощения в режиме фотоокисления.

Видно, что оптическая плотность обоих экспериментов уменьшается после 225 нм, достигает минимума в районе 245 нм, затем достигает максимума близ 310 нм, после чего уменьшается. Данный рисунок просто иллюстрирует процесс окисления раствора птеринов. Для дальнейшего исследования необходимо получить разностные спектры.

### 3.5 Разностные спектры

С целью оценки выхода димера относительно суммы продуктов реакций фотоокисления тетрагидробиоптерина спектры продуктов были аппроксимированы суммой гауссовых функций (Рисунок 18, Рисунок 19), соответствующих полосам поглощения продуктов. Важными для оценки количества продуктов являются полоса поглощения с максимумами в области 245 нм, соответствующая поглощению димера дигидробиоптерина, а также полосы на 301 нм - тетрагидробиоптерин и полоса на 340 нм - птерин.

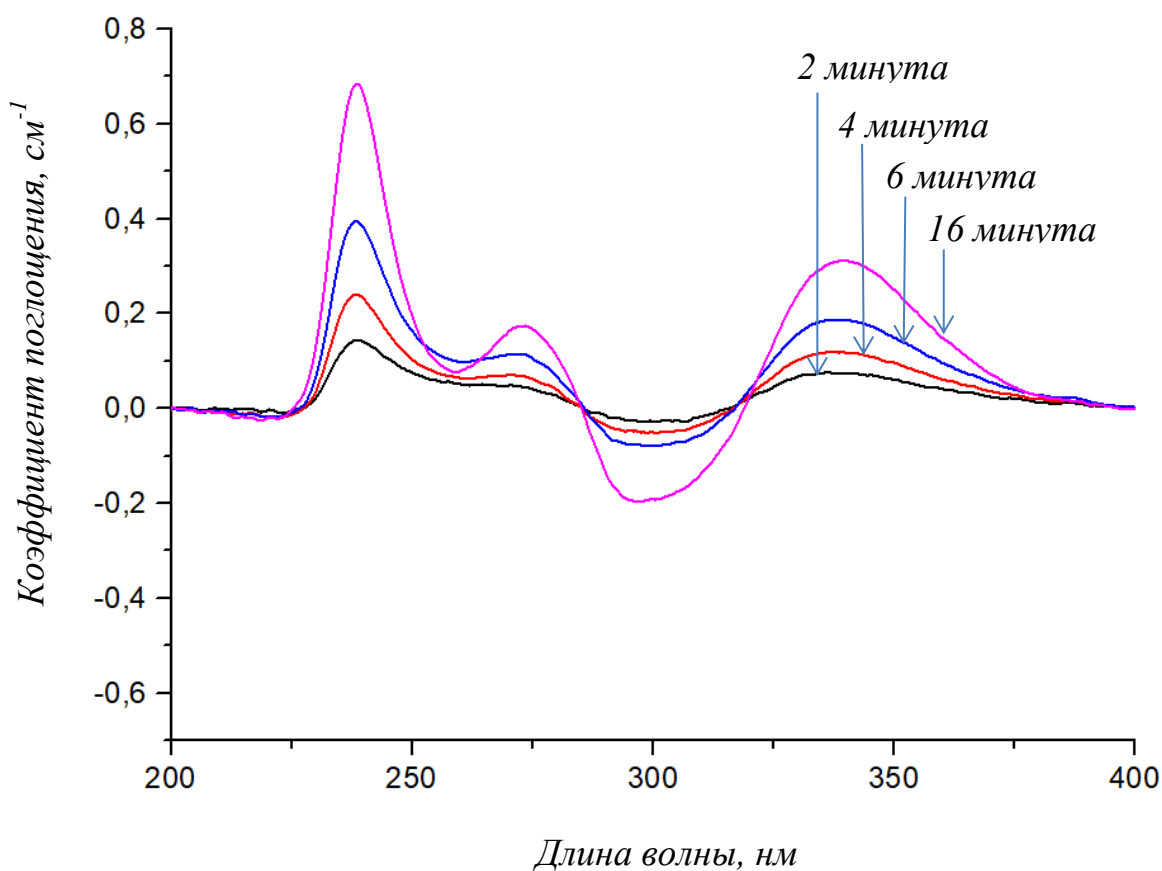


Рисунок 18 - Разностный спектр автоокисления.



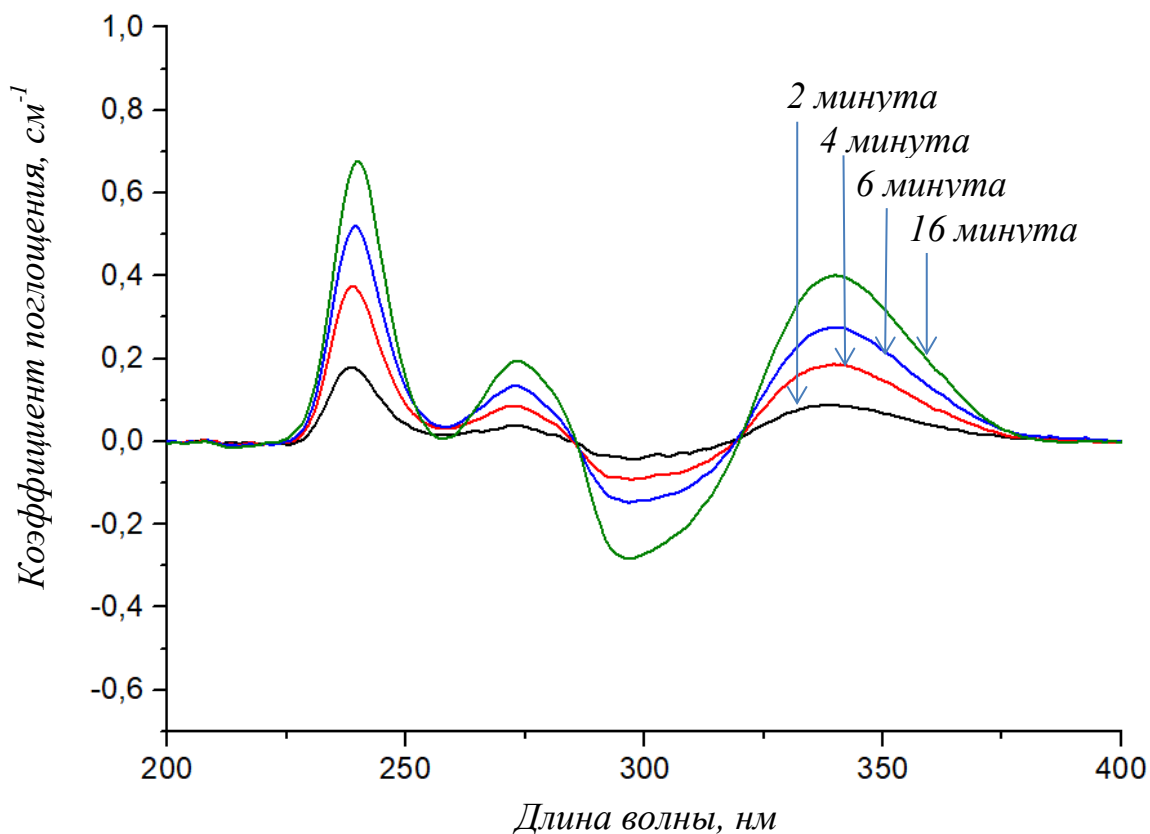


Рисунок 19 - Разностный спектр фотоокисления.

### 3.6 Пример аппроксимации гауссовыми функциями

Для более детального анализа рассмотрим пример фотооблучения в период со 2 по 3 минуту облучения, иллюстрирующий аппроксимацию гауссовыми функциями (Рисунок 20). Здесь так же можно наблюдать максимум в области 245 нм, соответствующий поглощению димера дигидробиоптерина, и полосы на 301 нм - тетрагидробиоптерин, 340 нм - птерин.

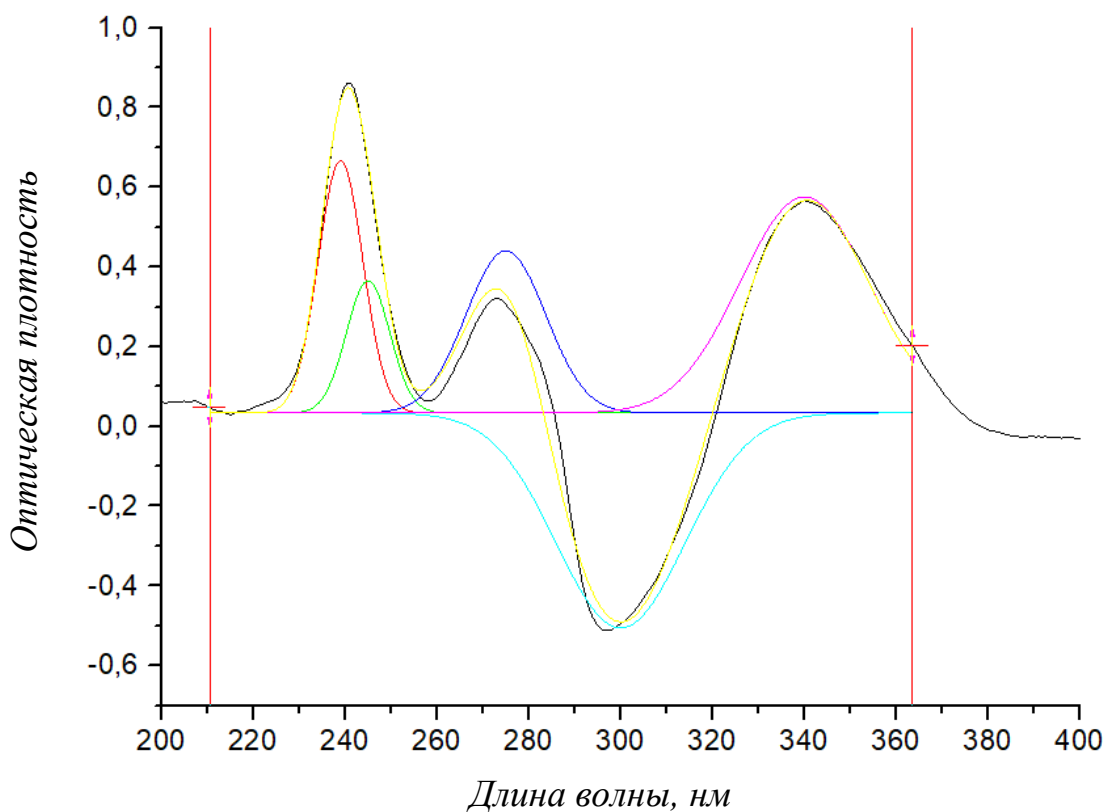


Рисунок 20 - Пример фотооблучения в период со 2 по 3 минуту облучения.

Данный метод позволяет иллюстрировать различные временные зависимости авто- и фотоокисления на длинах волн 239 нм, 245 нм, 300 нм и 340 нм.

### 3.7 Аппроксимация гауссовыми функциями авто- и фотоокисления

на длинах волн 239 нм и 245 нм

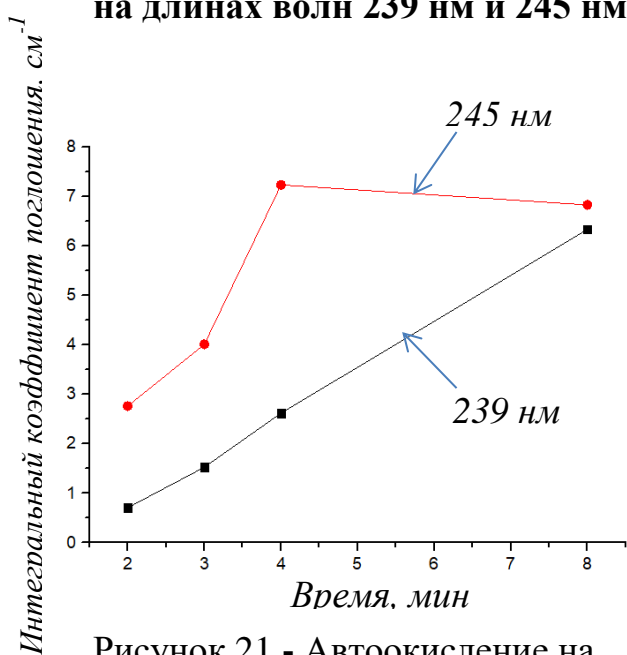


Рисунок 21 - Автоокисление на длинах волн 239 нм и 245 нм.

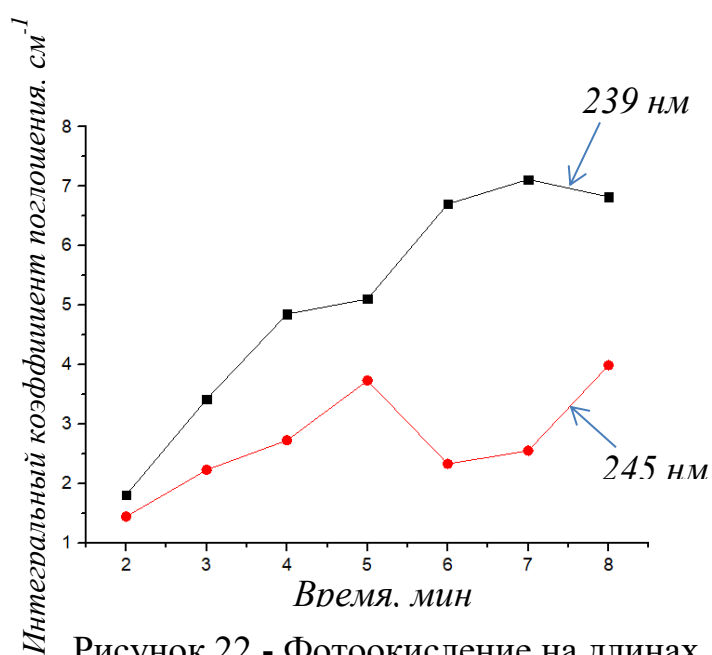


Рисунок 22 - Фотоокисление на длинах волн 239 нм и 245 нм.

На данных графиках представлены зависимости интегральных коэффициентов поглощения от времени облучения. Рисунок 21 иллюстрирует автоокисление на длинах волн 239 нм и 245 нм. На рисунке 22 изображено фотоокисление на тех же длинах волн. Аппроксимация гауссовыми функциями показала, что интегральный коэффициент фотоокисления на длине волны 239 нм превышает интегральный коэффициент автоокисления на той же длине волны. Иная картина на 245 нм. Интегральный коэффициент поглощения автоокисления достигает  $7 \text{ см}^{-1}$ , в то время как при фотоокислении его значение составляет  $4 \text{ см}^{-1}$ .

### 3.8 Аппроксимация гауссовыми функциями авто- и фотоокисления на длинах волн 300 нм и 340 нм.

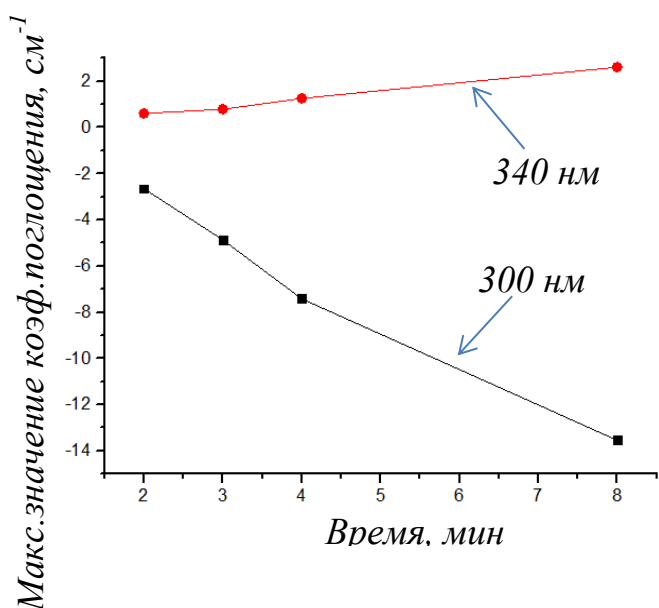


Рисунок 23 - Автоокисление на длинах волн 300 нм и 340 нм.

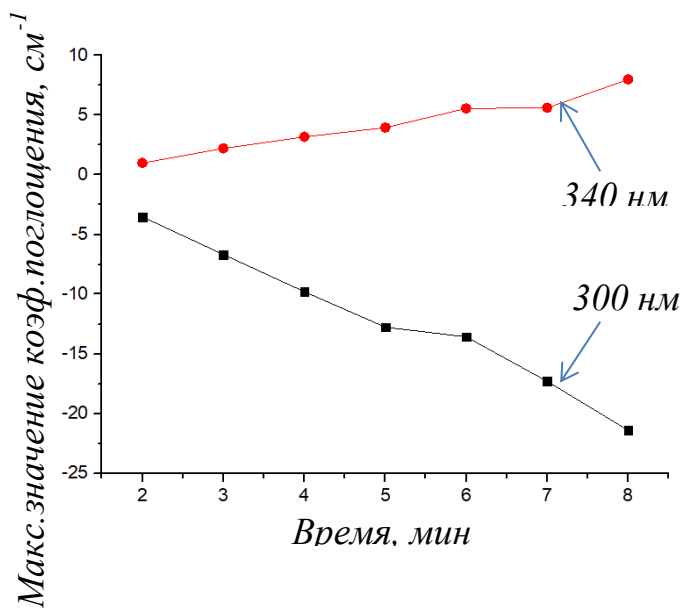


Рисунок 24 - Фотоокисление на длинах волн 300 нм и 340 нм.

На данных графиках представлены зависимости максимального значения коэффициента поглощения от времени облучения. Рисунок 23 иллюстрирует автоокисление на длинах волн 300 нм и 340 нм. На рисунке 24 изображено фотоокисление на тех же длинах волн. Аппроксимация гауссовыми функциями показала, что максимальное значение коэффициента поглощения фотоокисления на длине волны 340 нм значительно превышает

значение при автоокислении. Однако при 300 нм ситуация меняется. Максимальное значение коэффициента поглощения при автоокислении больше, чем при фотоокислении.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом:

Была собрана лазерная система на основе кристалла на активной среде  $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{+3}+\text{Yb}^{3+}$ . Были проведены эксперименты по исследованию фотоиндуцированного окисления тетрагидробиоптерина при облучении УФ светодиодом непрерывного действия и УФ лазером импульсно-периодического действия.

Динамика окисления и появление различных продуктов окисления тетрагидробиоптерина были исследованы методом оптической абсорбционной спектроскопии.

При облучении птеринов УФ светодиодом непрерывного действия с длиной волны 325 нм была обнаружена полоса поглощения димеров в диапазоне 245 нм, вычислен квантовый выход, максимальное значение которого составило в первую минуту облучения 0.62%, найдено наибольшее количество димеров  $8.79 \cdot 10^{14}$  в период с 6 по 7 минуту облучения. А так же произведен расчет квантового выхода димеров и концентрации димеров в зависимости от условий УФ облучения.

Для импульсно-периодического облучения лазерным светом с длиной волны 310 нм не было обнаружено значительного выхода димеров. Спектры поглощения продуктов окисления для авто- и фотоокисления значительно не отличались.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vieyra-Garcia, P.A., Wolf, P. A deep dive into UV-based phototherapy (2021). *Pharmacology and Therapeutics*, 222, статья № 107784.
2. A. A. Buglak et al./ Photooxidation of tetrahydrobiopterin under UV irradiation: possible pathways and mechanisms// *Photochemistry and photobiology*.- 2014.- V.90. – P.1017-1026.
3. Bulat, V. The mechanisms of action of phototherapy in the treatment of the most common dermatoses [Text] / V. Bulat, M. Situm, I. Dediol // *Coll Antropol.* – 2011. – V.35. – P. 147–151.
4. Vignoni M., Lorente C., Cabrerizo F.M., Erra-Balsells R., Oliveros E., Thomas A.H. Characterization and reactivity of photodimers of dihydroneopterin and dihydrobiopterin // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2012. – V. 11, No 6. – P. 979–987.
5. Vignoni M., Serrano M.P., Oliveros E., Thomas A.H. Photodimerization of 7,8- dihydroneopterin in aqueous solution under UV-A irradiation // *Photochemistry and Photobiology*. 2011. – V. 87, No 1. – P. 51-55.
6. Оспанова, С.А. Методики фототерапии в дерматологии [Текст] / С.А. Оспанова, Р.М. Доцанова // *Вестник КазНМУ*. – 2013. – №2. – С.41.
7. Baron, E.D. Introduction to photobiology [Text] / E. D. Baron, A. K. Suggs // *Dermatol Clin.* – 2014. – V.32. – P. 255 – 266.
8. Weichenthal, M. Phototherapy: how does UV work? [Text] / M. Weichenthal, T. Schwarz // *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* – 2005. – V.25. – P.260–266.
9. Bulat, V. The mechanisms of action of phototherapy in the treatment of the most common dermatoses [Text] / V. Bulat, M. Situm, I. Dediol // *Coll Antropol.* – 2011. – V.35. – P. 147–151.
10. Богатырева, В.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на живые клетки [Текст] / В.В. Богатырева // *Научно-технический вестник*

информационных технологий, механики и оптики. – 2006. – №26. – С.10.

11. Генина, Э.А. Методы биофотоники: Фототерапия [Текст] / Э.А. Генина. – Саратов: Новый ветер, 2012. – 119 с. – ISBN 978-5-98116-149-0.
12. Mehraban, S. 308 nm excimer laser in dermatology [Text] / S. Mehraban, A. Feily // J Lasers Med Sci. – 2014. – V.5. – P. 8–9.
13. Menta, D. Ultraviolet B Phototherapy for Psoriasis: Review of Practical Guidelines [Text] / D. Menta, H.W. Lim // Am J Clin Dermatol. – 2016. – V. 17. – P. 125–126.
14. Vangipuram, R. Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review [Text] / R. Vangipuram, S.R. Feldman // Oral Diseases. – 2016. – V.22. – P. 253–259.