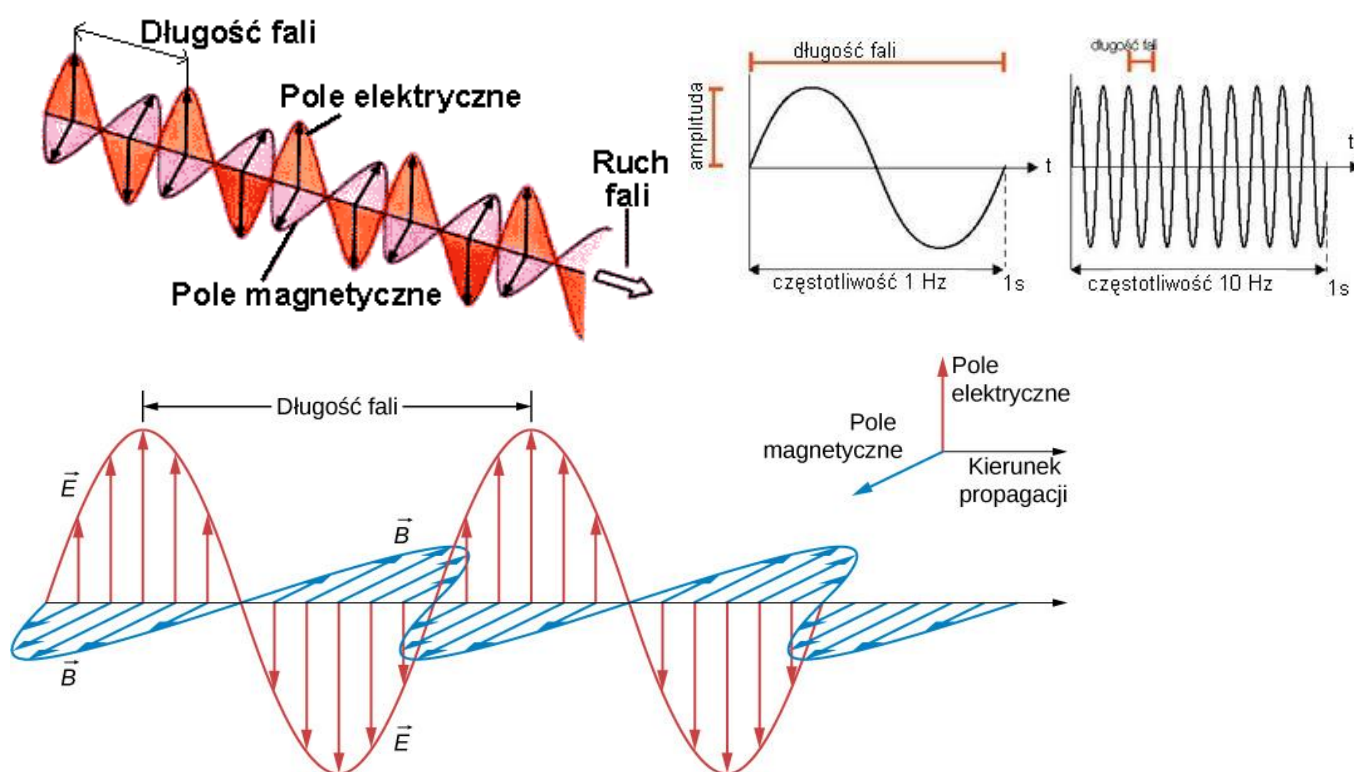


Ćwiczenie 21

Badanie właściwości światła laserowego. Efekt działania promieniowania na komórki. Wpływ uczulacza fotodynamicznego.

Światło – promieniowanie elektromagnetyczne będące jedną z wielu form propagacji energii w przestrzeni.

W potocznym rozumieniu mianem światła określane jest promieniowanie widzialne dostrzegalne przez oko ludzkie. W szerszym aspekcie powinniśmy mówić o promieniowaniu optycznym (będącym rodzajem promieniowania elektromagnetycznego) bowiem w optyce oprócz światła widzialnego (VIS, $\lambda = 380 - 780$ nm), na które reagują nasze oczy wyróżniamy jeszcze promieniowanie ultrafioletowe/nadfioletowe (UV, $\lambda = 180 - 380$ nm), oraz podczerwone (IR; $\lambda = 780$ nm - $50 \mu\text{m}$). Należy pamiętać, że promieniowanie elektromagnetyczne jest podobnym do fali, oscylującym polem elektrycznym (E) i magnetycznym (B) rozchodzącym się z stałą prędkością w przestrzeni ($c \approx 3 \times 10^8$ m/s w próżni). Wektory linii natężenia elektrycznego i magnetycznego są prostopadłe do siebie i do kierunku rozchodzenia się światła, a ich natężenia zmieniają się sinusoidalnie co schematycznie przedstawiono na ryc. 1.

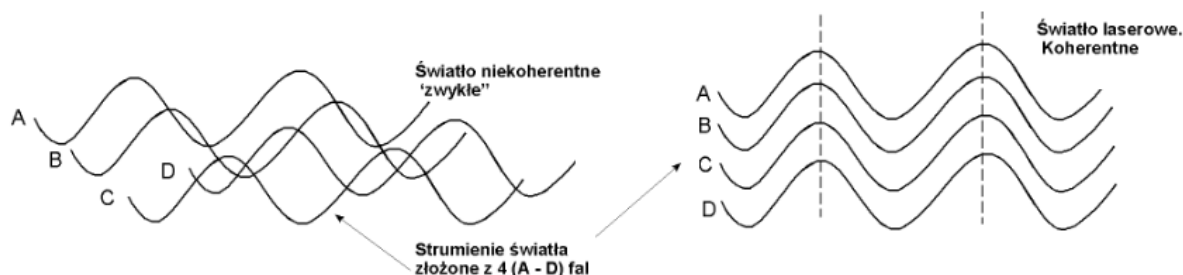


Ryc. 1. Fala elektromagnetyczna promieniowania

Wielkością charakteryzującą fale jest jej częstotliwość (ν - liczba pełnych zmian pola elektromagnetycznego w ciągu sekundy) i długość (λ - odległość pomiędzy dwoma punktami, gdzie wartości pola magnetycznego i elektrycznego mają takie same wartości). Ponieważ prędkości rozchodzenia się fal ($v = \lambda \nu$) są jednakowe, to z równania na prędkość wynika, że im większa jest częstotliwość tym mniejsza długość fali.

Światło wykazuje zarówno naturę korpuskularną (cząsteczkową), jak i falową. Dowodem na korpuskularne właściwości światła są procesy opisujące zjawiska absorpcji i emisji promieniowania przez atomy i cząsteczki, zjawisko Comptona i efekt fotoelektryczny. Natomiast przejawem właściwości falowych są: załamanie światła, dyfrakcja (ugięcie), interferencja (nakładanie się fal promieniowania) i polaryzacja.

Światło z którym się stykamy na co dzień składa się z wielkiej liczby fal z których każda znajduje się w innej fazie (Ryc. 2). Takie światło nazywamy inkoherentnym (niespójnym). Światło laserowe jest tu wyjątkiem, gdyż jego strumień jest koherentny (spójny), tzn. wszystkie fale tworzące strumień znajdują się w tej samej fazie (Ryc. 2).



Ryc. 2. Rozkład fal w świetle koherentnym (zwykłym) i niekoherentnym (laserowym).

Ogólna charakterystyka światła laserowego

Laser jest urządzeniem wytwarzającym i wzmacniającym wiązkę promieniowania elektromagentycznego (zwykle światła). Jego nazwę stanowi akronim utworzony z pierwszych liter angielskiej nazwy wyrażenia *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, co można by przetłumaczyć jako: wzmacnianie światła przez wymuszoną emisję promieniowania

Światło emitowane przez laser jest falą elektromagnetyczną o ściśle określonych właściwościach, które odróżniają je od naturalnych źródeł takich jak płomień czy słońce.

1. **Jest monochromatyczne**, tzn. że posiada tylko jedną długość fali (kolor), naturalne źródła światła promieniują w szerokim spektrum od podczerwieni do ultrafioletu.
2. **Jest koherentne** (spójne), tzn. że fale świetlne emitowane przez laser posiadają tą samą fazę, natomiast naturalne źródła światła emitują fale o różnych fazach.
3. **Jest skolimowane**, tzn. że wiązka światła laserowego ma niewielką rozbieżność i łatwo można utrzymać niewielką średnicę wiązki na dużych dystansach. W naturalnych źródłach światła nie jest możliwe osiągnięcie takiego stopnia kolimacji nawet przez zastosowanie skomplikowanych układów optycznych.

Te właściwości sprawiają, że światło laserowe z powodzeniem wykorzystywane jest w badaniach naukowych czy w celach medycznych/kosmetycznych. Aby uzyskać odpowiedni efekt działania lasera należy go zastosować w odpowiedni sposób, czyli dostarczyć odpowiednią dawkę światła (najczęściej mierzona w dżulach) na odpowiednią głębokość tkanki. W zależności od dawkowania (wyrażonego w J/cm^2) możemy pobudzać aktywność fizjologiczną (mały bodziec), bądź ją hamować (silne bodźce). Z klinicznego punktu widzenia,

wartość energii powinna być dostosowana do stanu chorobowego. Ważny jest też sposób aplikacji promieniowania. Podobny efekt można uzyskać stosując większą moc w krótszym czasie, bądź mniejszą energię ale dłuższy czas naświetlenia. Lasery posiadają również regulację trybu pracy na ciągłą bądź chwilową (modulowaną w impulsach). Boddże ciągłe są łagodniejsze, natomiast impulsowe działają bardziej drażniaco na tkankę. Ważny jest też dobór długości fali promieniowania laserowego, gdyż różne długości światła działają odmiennie na poszczególne struktury tkanki i penetrują ją na różną głębokość.

Wpływ promieniowania laserowego na materię żywą zależy zarówno od fizycznych właściwości promieniowania laserowego (mocy, długości fali, czasu trwania impulsu lub czasu naświetlania i pola powierzchni przekroju wiązki padającej), jak również od właściwości fizyko-chemicznych komórek do których to światło dociera (np.: współczynnika absorpcji i rozpraszania promieniowania, gęstości ośrodka, stopnia zróżnicowania i stanu fizjologicznego organelli komórkowych w poszczególnych komórkach). Z zaobserwowanych do tej pory zmian biologicznych, wywołanych przez promieniowanie laserowe, różnorodność efektów naświetlań jest ogromna. Lasery znalazły zastosowanie w diagnostyce, w leczeniu wielu różnorodnych schorzeń, jak również do wielu procedur kosmetycznych. Zabiegi laserowe (dermatochirurgia) oferowane są przez każdy szanujący się salon kosmetyczny, Spa&Wellness, salon odnowy biologicznej itp. Światło laserowe wykorzystywane jest m.in. w procesach regulacji rogowacenia naskórka i wchłaniania przez niego wilgoci, obkurczaniu włókien kolagenowych, zwiększeniu syntezy kolagenu, normalizacji funkcji komórek produkujących barwniki skóry (melaninę). Przykładowo stosując odpowiednie lasery możemy pobudzać fibroblasty do produkcji kolagenu, co wpływa na poprawienie jędrności i sprężystości skóry (fotoodmładzanie). Nowo powstały kolagen ma bowiem lepsze właściwości mechaniczne, staje się bardziej odporny na ściskanie i zerwanie. Światło laserowe powoduje ponadto zmiany w potencjale błony komórkowej, stymuluje wydzielanie neuroprzekaźników, wzrost syntezy kwasu rybonukleinowego, ATP (zwiększenie liczby mitochondriów), prostaglandyn, usprawnia dysocjację hemoglobiny, przyspiesza gojenie uszkodzeń i stanów zapalnych tkanek.

W kosmetologii lasery bardzo często używane są do usuwania nadmiernego owłosienia, plam barwikowych czy tatuaży. W depilacji laserowej dochodzi do trwałego i całkowitego uszkodzenia włosa w wyniku zniszczenia struktur odpowiedzialnych za jego wzrost i jest to możliwe jedynie wtedy gdy włos będzie naświetlany w fazie anagenowej (fazie wzrostu). Jeśli w wyniku dostarczonej energii nie nastąpi całkowite uszkodzenie struktur odpowiedzialnych za wzrost, włos będzie przechodził w fazę telogenu (faza spoczynku włosa), a następnie odrośnie on ponownie. Najlepiej widoczne rezultaty depilacji laserowej widoczne są u osób posiadających jasny odcień skóry i ciemne, grube włosy. Należy też pamiętać doboru odpowiedniej ilości dostarczanej energii i okresu powtórzeń, tak aby wszystkie naświetlane włosy były w fazie anagenowej (jednorazowa depilacja usuwa ok. 20-30% włosów - dlatego zabiegi należy powtarzać, aby dostosować odstępy między poszczególnymi

zabiegami do faz wzrostu poszczególnych włosów). U osób posiadających włosy jasne (tzn. o małej zawartości melaniny) trudno jest uzyskać znaczącą i trwałą redukcję owłosienia. Do zabiegów depilacji stosuje się lasery emitujące fale o długości w przedziale 630-1200 nm. W tym zakresie fal energia jest szczególnie dobrze pochłaniana przez melaninę i wnika wystarczająco głęboko do skóry właściwej na głębokość, na której umieszczone są struktury włosa odpowiedzialne za jego wzrost. Podobnego lasery wykorzystywane są też do usuwania tatuaży. Podobnie, jak w przypadku włosów najlepsze rezultaty uzyskuje się przy usuwaniu ciemnych barwników. Energia emitowana przez laser jest selektywnie pochłonięta przez barwnik, co powoduje jego rozbitcie na drobniejsze cząsteczki. Rozdrobniony barwnik może ulegać odparowaniu z wierzchnich warstw skóry poprzez mikrouszkodzenia naskórka lub rozproszeniu w głębszych warstwach, gdzie później eliminowany jest na drodze fagocytozy. Końcowe efekty usunięcia tatuaży widać dopiero wielu zabiegach, a ostateczny efekt widoczny jest po upływie 2-3 lat od zakońzonego zabiegu. Podczas usuwania plam barwnikowych widocznych na skórze stosowane są techniki polegające na ich podgrzaniu (fototermoliza). Większość plam barwnikowych i przebarwień skóry wynika z nadmiernego miejscowego nagromadzenia melaniny. W wyniku działania lasera, cząsteczki barwnika lasera podgrzewają się i ulegają zniszczeniu. Dobranie odpowiedniej ilości energii i fali świetlnej dla barwnika powoduje że działanie lasera jest wybiórcze, ponieważ otaczające tkanki nie zawierające melaniny pozostają nieuszkodzone, lub są uszkodzone w minimalnym stopniu. Przy zastosowaniu laserów bardzo często chłodzi się skórę (zimny żel, strumień zimnego powietrza), aby zapobiec przegrzaniu naskórka i zmniejszyć dolegliwości bólowe.

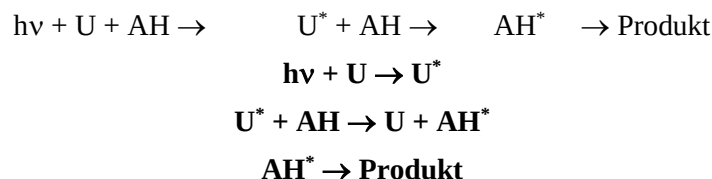
Fotosensibilizacja

Często terminu „fotosensibilizacja” używa się w odniesieniu do zwiększenia wrażliwości skóry na działanie światła widzialnego i ultrafioletowego. Substancje fotouczulające (fotosensibilizatory, fotouczulacze) stosowane są celowo dla uzyskania wpływu leczniczego np. w bielactwie, łuszczycy, ziarniniaku grzybiastym. Fotosensibilizacja może zajść przypadkowo w wyniku niekorzystnego, ubocznego działania pewnych leków, w następstwie kontaktu zawodowego, lub w wyniku wewnątrznaczyniowego wytwarzania fotouczulaczy.

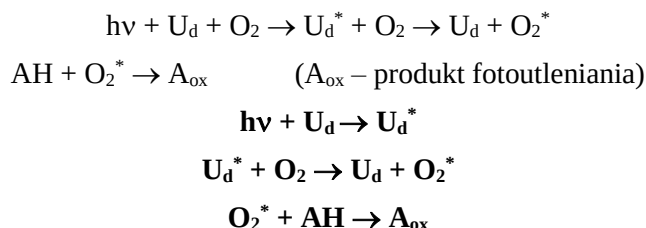
Światło inicjuje proces określany jako *fotosensibilizacja*, czyli fotouwrażliwienie polegające na pochłanianiu energii promieniowania świetlnego i przekazywania jej innym substancjom biorącym udział w reakcji świetlnej. W wyniku absorpcji światła sensybilizator, znajdujący się w stanie podstawowym, ulega wzbudzeniu do wyższego poziomu energetycznego. Wzbudzona cząsteczka fotosensibilizatora może reagować bezpośrednio z substratem lub z innymi cząsteczkami (najczęściej z tlenem), znajdującymi się w mieszaninie reakcyjnej, dając produkty mogące ponownie reagować z substratami. Proces fotosensibilizacji inicjowany jest światłem, lecz dalsze etapy zachodzą już w ciemności.

U podstaw zjawiska *fotosensibilizacji* (*fotouczulania*) leży zjawisko przekazywania energii wzbudzenia elektronowego z cząsteczki donora na cząsteczkę akceptora. Możemy wyróżnić dwa

rodzaje fotouczulanych reakcji chemicznych. W pierwszym rodzaju reakcji energia wzbudzenia ($h\nu$) **uczulacza (U)** może być wykorzystana do aktywacji substratu (**akceptora**) **AH**, tzn. jest on akceptorem energii wzbudzenia:



W drugim rodzaju energia wzbudzenia uczulacza U_d może być zużyta do aktywacji cząsteczki tlenu. Tego typu uczulacz nazywany jest **uczulaczem fotodynamicznym (U_d)**:



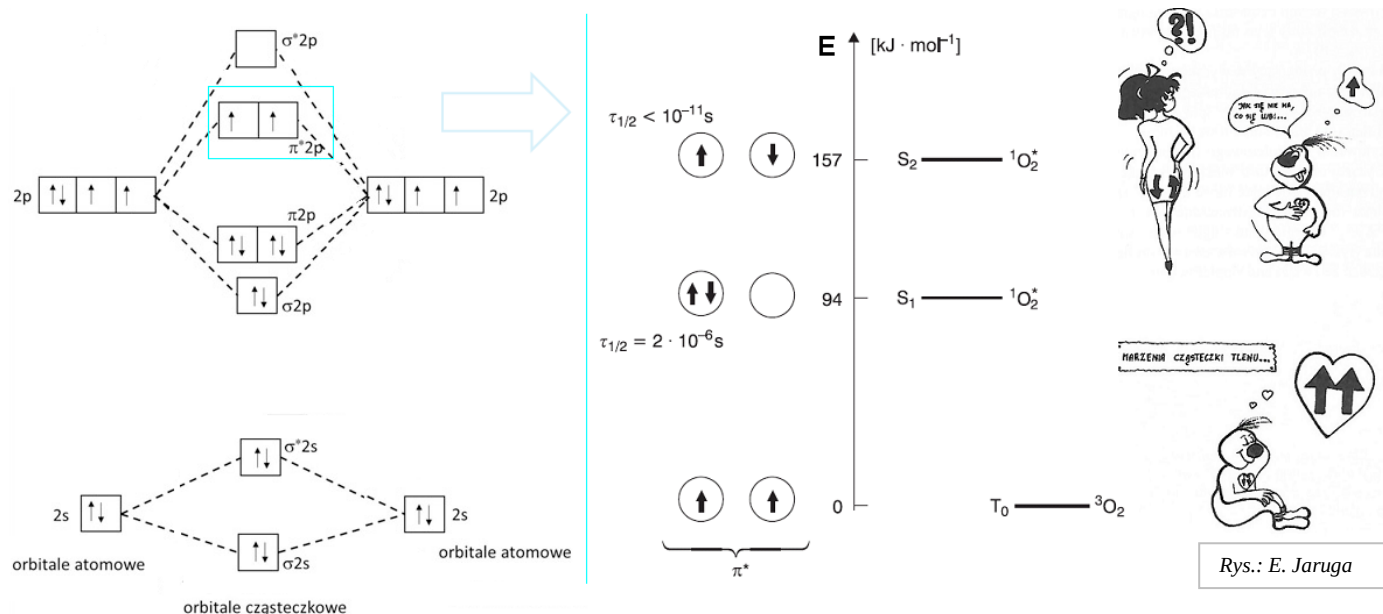
Z powyższych reakcji widzimy, że uczulacz, zarówno „zwykły” (U), jak i fotodynamiczny (U_d), nie bierze udziału w reakcji fotochemicznej, spełnia rolę „odbiornika” wychwytyjącego fotony o określonej energii i przekazującego uzyskaną energię innej cząsteczce, która dzięki temu ulega chemicznym zmianom. Zatem w kategoriach chemicznych uczulacz jest katalizatorem. We wszystkich reakcjach fotochemicznych światło (w szerszym znaczeniu terminu – także promieniowanie UV) jest substratem.

W żywych organizmach, na które działa promieniowanie (światło), „zwykle” fotouczulacze odgrywają stosunkowo niewielką rolę, natomiast duże znaczenie mają uczulacze fotodynamiczne czyli te, których rola sprowadza się do generowania tlenu singletowego.

Tlen singletowy

Wyjątkowość cząsteczki tlenu polega na tym, że jej stan podstawowy jest stanem tripletowym (3O_2); ma ona wówczas dwa niesparowane elektrony na orbitalach molekularnych π^* (Ryc. 3). Reaktywność cząsteczki tlenu w stanie tripletowym jest bardzo niska, zdecydowana bowiem większość cząsteczek organicznych, z którymi tlen mógłby wchodzić w reakcje w komórkach, ma sparowane elektrony, a jak widzimy tlen tripletowy będzie preferował do związki, które tak jak on będą miały niesparowane elektrony i dlatego tak niechętnie ulega reakcjom.

Znacznie bardziej reaktywny jest tlen singletowy $^1O_2^*$, bowiem jak widzimy elektrony Powstaje on po wzbudzeniu cząsteczki tlenu tripletowego 3O_2 . Wzbudzenie polega na dostarczeniu energii potrzebnej do przemieszczenia elektronu z jednego orbitalu molekularnego antywiążącego π^* na drugi i odwróceniu zwrotu jego spinu, bądź też odwróceniu zwrotu spinu elektronu na tym samym orbitalu molekularnym (Ryc. 3). Mamy bowiem dwie formy tlenu singletowego $^1O_2^*$ w stanach S_1 i S_2 , różniące się czasem życia ($\tau_{1/2}$) i energią wzbudzenia. Cząsteczka $^1O_2^*$ w stanie S_2 w roztworach wodnych ma bardzo krótki czas życia i przez to w procesach biologicznych (zachodzących przecież głównie w środowisku wodnym) nie odgrywa większej roli, przeciwnie niż cząsteczka $^1O_2^*$ w stanie S_1 , o znacznie dłuższym czasie życia. Jest ona nazywana po prostu *tlenem singletowym*.



Ryc. 3 Stany elektronowe cząsteczki tlenu: stan podstawowy – tripletowy (T_0), stany wzbudzone – singletowe (S_1 , S_2); π^* (oznaczone kółkami) – orbitale molekularne antywiążące; $\tau_{1/2}$ – czasy trwania stanów wzbudzonych (w roztworach wodnych); strzałki oznaczają spiny elektronów.

Z lewej strony przedstawiono powstawanie orbitali cząsteczkowych w tlenie trypletowym, z prawej natomiast różnice energetyczne pomiędzy poszczególnymi formami tlenu, które związane są z rozmieszczeniem elektronów na orbitalu π^* (zaznaczony po lewej w niebieskiej ramce)

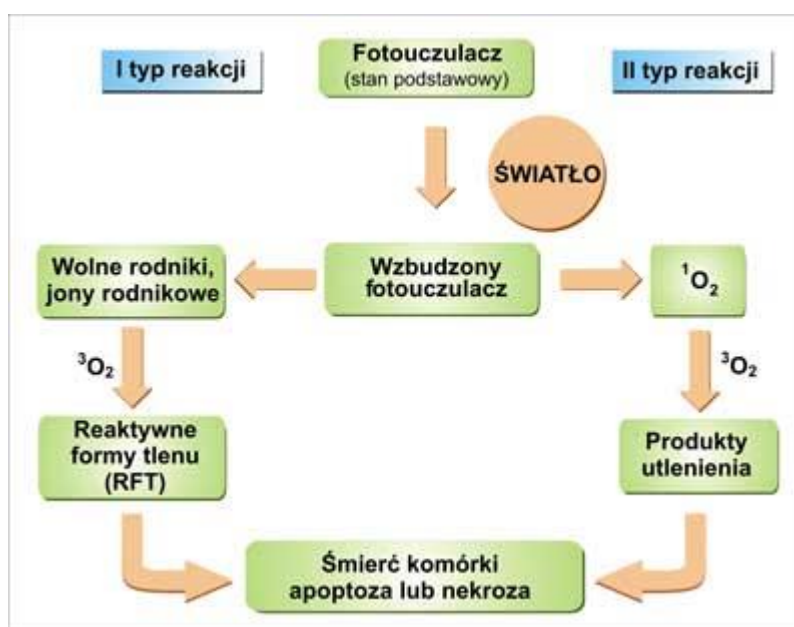
Tlen singletowy oddziałuje z innymi cząsteczkami na dwa sposoby: przekazuje energię wzbudzenia innym cząsteczkom (a sam przechodzi w stan tripletowy), bądź wchodzi z nimi w reakcje chemiczne. Wśród cząsteczek wrażliwych na działanie tlenu singletowego można wymienić reszty aminokwasowe białek (histydyny, metioniny, tryptofanu, tyrozyny, cysteiny) oraz zasady purynowe i pirymidynowe kwasów nukleinowych.

Terapia fotodynamiczna

Światło już od kilku tysięcy lat było wykorzystywane w leczeniu wielu dolegliwości i schorzeń. Niektórzy mówią o dwóch rodzajach wykorzystania światła w lecznictwie, dzieląc je na fototerapię (bazuje na absorpcji światła przez endogenne składniki komórek i tkanek) oraz na fotochemioterapię, która wykorzystuje promieniowanie do wzbudzania uprzednio wprowadzonego do organizmu związku chemicznego. Wśród tych drugich metod szczególne znaczenie przypisuje się terapii fotodynamicznej, powszechnie stosowanej w diagnostyce i leczeniu zmian nowotworowych.

Zjawisko sensybilizacji zostało wykorzystane po raz pierwszy przez von Tappeiner'a w terapii nowotworów skóry. Postępowanie to zostało opisane jako „działanie fotodynamiczne” i zainicjowało rozwój tzw. *terapii fotodynamicznej* (PDT – ang. *photodynamic therapy*). PDT wykorzystuje działanie trzech czynników, które oddziałują na tkanki i komórki. Pierwszym jest fotouczulacz/fotosensybilizator – wrażliwy na światło związek, który lokalizuje się w tkance i uczula ją na działanie światła. Drugim czynnikiem jest źródło światła emitujące promieniowanie o odpowiedniej długości fali, które wzbudza

zakumulowany w tkance nowotworowej fotouczulacz. Najczęściej stosuje się lasery lub specjalne lampy z filtrami, emitujące promieniowanie w określonym zakresie. Ostatnim, trzecim czynnikiem jest tlen cząsteczkowy zgromadzony w tkankach, na który to wzbudzony fotouczulacz będzie przenosić energię. Ponieważ jak widzimy, reakcje fotosensybilizacji przebiegają z udziałem tlenu, nazywane są często reakcjami fotodynamicznymi. W wyniku „pobudzenia tlenu” powstają czynniki cytotoksyczne, tj. wolne rodniki i tlen sigletowy. Ponieważ omawiany proces może zachodzić dwiema drogami, to często wyróżniamy reakcje typu I i typu II (Ryc. 4). Powstałe w wyniku obu reakcji produkty są bardzo aktywnymi utleniaczami, które następnie inicjują dalsze reakcje prowadzące do zniszczenia tkanki.



Ryc. 4. Dwa typy reakcji w terapii fotodynamicznej (Kulbacka J. i wsp. *Fototerapia jako alternatywna metoda leczenia nowotworów*. Medycyna Rodzinna 2008; 4: 88-95)

W reakcjach typu I wzbudzony fotouczulacz (sensybilizator będący w stanie tripletowym) reaguje na początku poprzez transfer elektronów i protonów z cząsteczkami ze swojego bezpośredniego otoczenia. W procesie tym powstaje semizredukowany sensybilizator i semiutleniony substrat (wolne rodniki, które są reaktywne chemicznie). Powstające wolnorodnikowe substraty reagują z tlenem inicjując powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak np.: anionorodnik ponadtlenny ($O_2^{\bullet-}$) rodnik hydroksylowy ($HO^{\bullet}$), nadutlenek wodoru (H_2O_2). Semizredukowany sensybilizator może reagować z tlenem w stanie podstawowym (3O_2) i generować powstawanie anionorodnika ponadtlennego, który w wyniku reakcji z biocząsteczkami lub ulegając dysmutacji, daje H_2O_2 .

W reakcjach typu II wzbudzony sensybilizator (znajdujący się w stanie trypletowym) przenosi swoją energię bezpośrednio na tlen i tworzy tlen singletowy (1O_2), będący bardzo reaktywną formą tlenu:



Ponieważ tlen singletowy jest bardziej elektrofilowy niż 3O_2 , to może znacznie szybciej reagować z bogatymi w elektrony biocząsteczkami, dając utlenione pochodne

(hydroksynadtlenki, endonadtlenki, sulfotlenki). Oba typy reakcji (I i II) zachodzą równocześnie, a stosunek pomiędzy tymi procesami zależy od rodzaju zastosowanego fotouczulacza, stężenia substratu i tlenu oraz zdolności wiązania fotouczulacza do substratu.

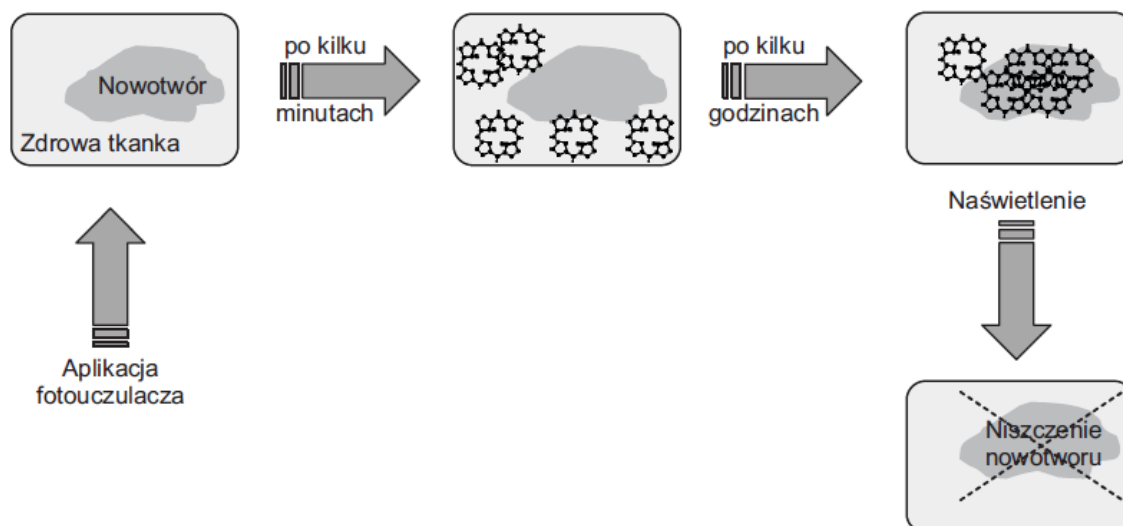
W wyniku tych reakcji powstają produkty, które mają zdolność do uszkodzenia błon komórkowych, błon mitochondriów, lizosomów oraz jądra. Wykazano, że duże stężenie fotouczulacza i krótki czas inkubacji prowadzi do niszczenia komórek w wyniku nekrozy. Natomiast przy niższych stężeniach fotosensybilizatora i dłuższym czasie inkubacji (24 h), następuje śmierć komórek poprzez mechanizm apoptozy

Terapia fotodynamiczna prowadzona w celu zniszczenia komórek nowotworowych może przebiegać na dwa sposoby:

- bezpośredniego działania fotodynamicznego uczulaczy
- pośredniego działania fotodynamicznego uczulaczy

Bezpośredni mechanizm fotodestrukcji komórek nowotworowych polega na uszkodzeniu mitochondriów i systemu błonowego komórki, co prowadzi do inaktywacji enzymów mitochondrialnych i transbłonowych, a w konsekwencji do nekrozy komórek. W pośrednim mechanizmie fotodestrukcji uszkodzenie komórek nowotworowych jest powodowane niszczeniem układu naczyniowego guza komórek nowotworowych w wyniku uszkodzenia śródbłonna oraz ściany naczyń krwionośnych. Komórki nowotworowe różnią się od komórek normalnych zapotrzebowaniem i dostępnością do składników odżywczych. Docierają do nich jedynie cząsteczki transportowane przez krew, stąd uszkodzenie układu naczyniowego ma tak ważne znaczenie. Komórki nowotworowe charakteryzują się zdolnością szybkiego i nieograniczonego podziału. To pociąga za sobą obniżenie ilości tlenu (hipoksja), a może też prowadzić do jego wyczerpania (anoksja). Zachodzące w tych warunkach beztlenowe spalanie glukozy dostarcza kwas mlekowy, który obniża pH komórek nowotworowych i w ten sposób warunkuje selektywne gromadzenie się w nich fotouczulaczy. Ogólną ideę przeciwnowotworowego zastosowania terapii fotodynamicznej ilustruje ryc. 5.

Fotouczulacz zmodyfikowany tak aby gromadził się głównie w chorej tkance (skóra, nabłonek układu oddechowego, tkanki nowotworowe) podajemy choremu. Kiedy stężenie fotouczulacza w tkance osiągnie maksimum rozpoczynamy naświetlanie światłem laserowym o długości fali maksymalnie bliskiej maksimum absorpcji fotouczulacza. Najczęściej używamy światła laserowego, gdyż światło to dostarcza w krótkim czasie ogromną liczbę fotonów. Energia fotonów absorbowana przez fotouczulacz umożliwia powstawanie tlenu singletowego, a następnie wolnych rodników, które powodują zniszczenie (śmierć na drodze apoptozy/nekrozy) komórki nowotworowej.



Ryc. 5. Schemat ilustrujący zasady terapii fotodynamicznej (PDT) (Trytek M. i wsp. *Porfiryny i ftalocyjaniny. Cz. I. Właściwości i niektóre zastosowanie*. Biotechnologia 2005; 4(71): 109-127).

Stosowane obecnie fotouczulacze nie są pozbawione wad. Kumulując się i pozostając przez długi czas w skórze są przyczyną powstawania nadwrażliwości na światło słoneczne. Nie są również związkami uniwersalnymi, gdyż tkanki nowotworowe posiadają różną strukturę i nie każdy fotouczulacz przyswajany jest w podobnym stopniu. Dodatkowo fotouczulacz i powstające cytotoksyczne związki mogą działać również na zdrowe tkanki. Do niedawna najczęściej jako fotosensybilizatory stosowane były głównie porfiryny pochodzenia naturalnego. Fotosensybilizacja za pośrednictwem porfiryn zachodzi według reakcji typu II, z wytworzeniem tlenu singletowego. Obserwacje dotyczące selektywnego gromadzenia się porfiryn w tkankach nowotworowych (w tym także pochodnych hematoporfirynowych będących mieszaniną hematoporfiryn i produktów ich degradacji oraz dimerów i wyższych oligomerów porfiryn połączonych wiązaniami estrowymi) wykazały, że gromadzą się one również w skórze, która w skutek ich powolnego uwalniania staje się bardzo wrażliwa na światło. Główne pasmo absorpcji pochodnych hematoporfirynowych jako sensybilizatorów przypada na długość fali ok. 400 nm i 600 nm. Stosowane w fototerapii światło czerwone o długości fali 630 nm pomimo swej przenikliwości jest słabo pochłaniane przez barwniki porfiryne. Te ograniczenia stosowania pochodnych porfiryne jako fotouczulaczy skłoniły do poszukiwań alternatywnych sensybilizatorów w fototerapii. Wyłoniono grupę związków określanych jako fotosensybilizatory drugiej generacji, która obejmuje: chlorofile i ich pochodne, zmodyfikowane porfiryny, kwas 5-aminolewulinowy, barwniki ftalocyjaninowe, psoralen i błękit metylenowy.

Psoralen i jego pochodne (np. oxoralen=ksantokumaryna) charakteryzują się dość znaczącym działaniem fotouczulającym. Związki tego typu w połączeniu ze światłem słonecznym powodują z reguły bolesne i poważne reakcje skórne. Mimo tego przykrego i czasem niebezpiecznego działania substancje tego typu znalazły zastosowanie w leczeniu

bielactwa i łuszczycy. Stosuje się wówczas naświetlania promieniami UV po wcześniejszym podaniu psolarenu lub jego mniej toksycznych pochodnych. Działanie oksoralenu związane jest z łąčeniem się tego związku (pod wpływem promieniowania UV) z zasadami pirymidynowymi DNA.

Fotosensybilizacja przy zastosowaniu **ftalocyjanin** może doprowadzić do modyfikacji biocząsteczek wskutek peroksydacji lipidów błonowych, utleniania cholesterolu czy utlenienia pewnych aminokwasów takich jak cysteina, histydyna, metionina, tryptofan lub tyrozyna. Bardziej skuteczna inaktywacja komórek jest prowadzona przez barwniki lokujące się w błonach. Powodują one uszkodzenia błon plazmatycznych, zniszczenie retikulum endoplazmatycznego, uszkodzenie mitochondriów i błony jądrowej oraz upośledzenie aktywności enzymów oraz receptorów. Lokalizacja barwników ftalocyjaninowych w komórce i w przedziałach międzykomórkowych zależy od ich polarności i rozpuszczalności. Barwniki o charakterze hydrofilowym wiążą się z lizosomami, występują też w mitochondriach, gdzie lokują się zgodnie z gradientem potencjału elektrochemicznego. Natomiast litofilne barwniki anionowe łączą się ze strukturami błonowymi: z błoną plazmatyczną, błoną mitochondrialną, retikulum endoplazmatycznym i błoną jądrową.

Zjawisko fotosensybilizacji może być również wykorzystane do lokalizacji zmian nowotworowych. Po podaniu fotouczulacza i jego nagromadzeniu się w zmiennych chorobowo tkankach, naświetlamy pacjenta promieniowaniem, które powoduje wzbudzenie fotouczulacza. Wzbudzony fotouczulacz wykazując charakterystyczną luminescencję (emisję światła, np. o barwie czerwonej) pozwala na określenie kształtu, wielkości i położenia zmian chorobowych. Postępowanie takie umożliwia wykrywanie nawet drobnych, lub trudnych do zarejestrowania innymi metodami zmian nowotworowych, co w efekcie końcowym pozwala na znacznie skuteczniejsze działanie terapeutyczne.

Cześć eksperymentalna

Próbkę zawierającą zawiesinę erytrocytów naświetlamy światłem laserowym lub ultrafioletowym w obecności fotouczulacza (np. ftalocyjanina, oxoralen). Po naświetleniu erytrocyty usuwamy (odwirowujemy), a pozostałym płynie (supernatancie) określamy zawartość hemoglobiny (białko nadające czerwone zabarwienie dla krwi/erytrocytów). W warunkach prawidłowych, niemal cała hemoglobina zawarta jest w erytrocytach. W 100 ml krwi ludzkiej znajduje się średnio ok. 13-16 g hemoglobiny (13000 - 16000 mg/dL). Po usunięciu tych komórek, w osoczu pozostaje niewielka zawartość tego barwnika (<50 mg/dL) i dlatego prawidłowe osocze charakteryzuje się słabym zabarwieniem (barwa zależy też od zawartości innych barwników obecnych w osoczu). W przypadku uszkodzenia błony erytrocytów, zawarta w nich hemoglobina uwalniana jest do osocza, które przybiera czerwoną barwę (i mówimy wtedy o hemolizie). Czerwone zabarwienie osocza pojawia się gdy zawartość hemoglobiny przekracza ~200 mg/dL, co oznacza że dopiero po uszkodzeniu znaczącej ilości komórek można wizualnie ocenić, że doszło do hemolizy. Mierzac zawartość

hemoglobiny w osoczu (supernatancie otrzymanym pod odwirowaniu erytrocytów) możemy określić stopień hemolizy. Wśród czynników mogących powodować hemolizę, możemy wymienić: drastyczne zmiany temperatury, działanie promieni UV czy prądu (cz. fizyczne), czynniki chemiczne (rozpuszczalniki organiczne rozpuszczające błonę lipidową, kwasy, zasady, woda – powodująca zmianę ciśnienia osmotycznego) oraz czynniki biologiczne (toksyny bakteryjne, aktywacja krzepnięcia i osoczowych enzymów proteolitycznych). Ponieważ dodanie wody do krwi wywołuje hiposmozę (obniżenie ciśnienia osmotycznego krwi), to krwinki czerwone zaczynają pobierać wodę z otoczenia, przez co zwiększają swoją objętość – co w konsekwencji może doprowadzić do przerwania ciągłości błony plazmatycznej. Dlatego też większość leków podawanych dożylnie rozcieńczana jest 0,9 % roztworem NaCl (izotoniczny roztwór soli fizjologicznej), który ma takie samo ciśnienie osmotyczne jak osocze (nie powoduje hemolizy). Należy podkreślić, że podatność erytrocytów na działanie czynników hemolitycznych zależy od siły działającego bodźca i od wieku krwinek (młode krwinki są bardziej wytrzymałe niż starsze). Prawidłowo zbudowana, niezmodyfikowana chemicznie błona krwinek czerwonych zapewnia im stosunkowo dużą oporność na działanie hipoosmotycznych roztworów i niewielkich ilości detergentów, takich jak np. saponina. Nie mniej jednak działanie jakiegokolwiek czynnika fizycznego (promieniowanie), czy chemicznego (fotouczulacz) może doprowadzać do uszkodzenia błony, co w konsekwencji powoduje wyciekanie hemoglobiny do środowiska zewnętrznego.

Celem ćwiczenia jest określenie, czy fotouczulacz i promieniowanie niosące wysoką energię (np. światło UV, światło laserowe) mogą przyczyniać się do uszkodzania komórek (w tym przypadku z uszkodzonych erytrocytów wydostaje się hemoglobina, której dokładną ilość możemy zmierzyć za pomocą spektrofotometru). Po odwirowaniu i odrzuceniu całych komórek w roztworze (supernatancie otrzymanym po odwirowaniu) pozostanie uwolniona z nich hemoglobina. Wzrost ilości hemoglobiny powyżej wartości początkowej (określonej w próbie, która nie była poddawana wpływie światła, czy fotouczulacza) będzie świadczył o uszkodzaniu błony krwinek czerwonych (hemolizie).

Wykonanie ćwiczenia

Doświadczenia będą wykonywane na erytrocytach uzyskanych z krwi wieprzowej (od zwierząt przeznaczonych do uboju w zakładach przetwórstwa mięsnego). Zwierzęta te zostały wcześniej przebadane na obecność pasożytów i zakażeń wirusowo-bakteryjnych. Jak podczas każdej pracy z materiałem biologicznym proszę zachować ostrożność podczas pracy.

- 1) Przygotować zawiesinę erytrocytów o składzie przybliżonym do krwi ludzkiej. W tym celu do dwóch plastikowych probówek zawierających po 5 ml koncentratu krwinek czerwonych¹ (próbówka na stanowisku) dodać po 5 ml zbuforowanej soli fizjologicznej

¹ Możliwe jest też użycie świeżo pobranej krwi- wtedy do 7,5 ml krwi podać po 2,5 ml PBS i po wymieszaniu, odwirować podobnie jak w przypadku postępowania z koncentratem erytrocytów

(PBS). Ostrożnie wymieszać za pomocą pipety automatycznej powoli aspirując i wypuszczając płyn – tak aby go nie spienić. Następnie uzyskany roztwór należy odwirować na wirówce laboratoryjnej (12 min., 200 g). Korzystając z wirówki MPW-211 ustawiamy czas wirowania na 12 min, a szybkość wirowania na 1200-1400 obrotów/min., a w przypadku wirówki MPW-2/MPW-340: 1400-1600 obrotów/min.

Wstawiając próbówki do wirówki należy pamiętać, aby rotor wirówki obciążać równomiernie. Naprzeciw próbówki z erytrocytami powinna się znaleźć próbówka o takiej samej masie (identyczna próbówka zawierająca taką samą ilość cieczy – np. wody). Można też koncentrat podzielić na 2 próbówki (po 5 ml koncentratu krwinek, do których dodajemy po 5 ml PBS-u) – zalecane postępowanie przy wirówce MPW-211.

- 2) Supernatant (górna część płynu – nad osadem erytrocytu, który zawiera białka osocza i ewentualnie hemoglobinę, która wydostała się z uszkodzonych erytrocytów) należy odrzucić (wylać) – najlepiej zebrać za pomocą plastikowej pipety Paustera (rys. obok). Jeżeli usuwany supernatant był przezroczysty (brak jakiegokolwiek czerwonego zabarwienia, w przypadku użycia krwi pełnej możliwe jest uzyskanie żółtego lub żółtozielonego zabarwienia) można od razu przejść do punktu 3 (pominąć ponowne wirowanie).



Do otrzymanego osadu erytrocytów dodać 10 ml PBS (jeśli korzystamy z dwóch próbek – dodajemy po 5 ml/próbę). Delikatnie wymieszać za pomocą pipety automatycznej (pobierając i wypuszczając kilkakrotnie zawiesinę) i wstawić ponownie do wirowania (12 min, 200 g). Po wirowaniu powinniśmy mieć przejrzysty supernatant – bez widocznego czerwonego koloru w górnej warstwie, co umożliwia przejście do punktu 3, jeśli jednak był zabarwiony na czerwono - procedurę należy powtórzyć, tak aby w otrzymanym osadzie komórek nie było uszkodzonych erytrocytów.

- 3) Uzyskana zawiesina erytrocytów powinna zawierać ok. 40 % erytrocytów (hematokryt krwi wynosi 37-54 %). Sugeruje się zlanie zawartości obu probówek do jednego naczynia (**plastikowa próbówka lub zlewka o pojemności 50 ml**) i następnie dodać do niej 15 ml PBSu. Można również dodać po 5 ml PBSu do każdej próby i po delikatnym wymieszaniu przenieść do wspomnianej próbówki/zlewki, a następnie dodać 5 ml PBSu, tak aby uzyskać zawiesinę o zawartości ok. 40 % erytrocytów. Po delikatnym wymieszaniu przenosi się po 2 ml uzyskanej zawiesiny erytrocytów do 4 ponumerowanych kuwet „makro” o przezroczystych ściankach i pojemności 3 ml → fot. obok



- 4) Do kuwety z numerami 1 i 2 dodać po 5 µl soli fizjologicznej, a do kuwet z numerami 3-4 po 5 µl fotouczulacza (oksoresorale). Ponieważ dodawane objętości są niezwykle małe należy pamiętać, aby końcówkę pipety automatycznej zawierającą wprowadzaną substancję zanurzyć w roztworze/zawiesinie do którego chcemy dodać sól fizjologiczną lub fotouczulacz. Następnie wcisnąć tłoczek pipety do oporu (wprowadzamy dodawany związek do zawiesiny erytrocytów) i wyjąć końcówkę

nie zwalniając uchwytu/tłoczka pipety. Dopiero po wyjęciu końcówki zwolnić (puścić) wciśnięty tłoczek pipety, zmienić końcówkę i dodać kolejną substancję do następnej próby. Delikatnie wymieszać każdą z prób (sugeruje się użycie plastikowych szpatulek mieszających).

- 5) Kuwety z numerami 1 i 3 zostawić na stole laboratoryjnym (wystawione będą na działanie światła widzialnego), a kuwety 2 i 4 wstawić pod lampę ultrafioletową na okres 20 minut. Włączyć światło ultrafioletowe w trybie pracy ciągłej (∞). Z tyłu lampy obok włącznika zasilania znajduje się przełącznik pozwalający ustawić czas naświetlania na (90s - ∞ - 120 s). Ustawienie go w pozycji środkowej pozwala na ciągły czas pracy lampy. Przystawienie na 90/120 s – spowoduje automatyczne wyłączenie lampy po określonym czasie.
- 6) Po 20 minutach roztwory erytrocytów przenosimy do probówek Eppendorf'a (podpisać probówki zgodnie z przyjętą numeracją) – najprościej jest przelać je przechylając zawartość kuwet w taki sposób aby wszystko spłynęło do probówki Eppendorfa. Następnie odwirować uzyskane próby - na wirówce MPW-55 (10 minut; 1600 obr/min $\approx$ 186 ÷ 200 g).



Próby o takiej samej masie wstawiamy do wirówki naprzeciw siebie.

- 7) Po odwirowaniu z każdej probówki delikatnie zbieramy supernatant (to jest roztwór w którym będziemy oznaczać zawartość wolnej hemoglobiny), uważając aby nie pobrać erytrocytów z dolnej części. W przypadku wymieszania i pobrania erytrocytów – probówki wstawić do ponownego wirowania. Zebrany supernatant można przenieść do czystych podpisanych probówek lub delikatnie pobieramy taką ilość jaka jest opisana w procedurze pomiaru uwolnionej hemoglobiny (patrz 8c)

8) Pomiar wolnej hemoglobiny:

- a) Włączyć spektrofotometr przynajmniej 10 minut przed przystąpieniem do pomiarów. Sugeruje się również dobranie 5 kuwet, które jako puste będą miały zbliżoną absorpcję światła przy jednej długości fali – np. 415 nm (wstawić i odczytać zmierzona wartość – różnice nie powinny być większe niż 0,010)



- b) Do jednej kuwety („semi-mikro” o poj. 1,5 ml, z przewężonymi ściankami – fot. obok) wlać 1 ml wody lub soli fizjologicznej. Próba ta posłuży do kalibracji spektrofotometru (zerowania – „blank”).

- c) Do kolejnej kuwety wprowadzić 800 μ l (0,8 ml)² 0,9% roztworu NaCl (soli fizjologicznej) i 200 μ l (0,2 ml) otrzymanego w pkt. 7 supernatantu. Wymieszać za pomocą plastikowego mieszadła. Analogiczne przygotowujemy próby dla wszystkich supernatantów (1-4).

² Jeżeli widoczne będzie intensywne czerwone zabarwienie skonsultować to z prowadzącym ćwiczenia. W takim przypadku prowadzący może zalecić użycie innych objętości; np.: 900 μ l soli fizjologicznej i 100 μ l oznaczanego supernatantu. W takim przypadku w wzorze w pkt. 10 zamiast mnożnika 500 powinno się użyć mnożnika 1000 (próbki rozcieńczone 10 $\times$).

9) Zmierzyć absorbancję każdej z próbek przy trzech długościach fali (380, 415, 450 nm). Przy każdorazowej zmianie długości fali, należy wyzerować wskazania spektrofotometru stosując kuwetę z wodą/solą fizjologiczną jako odnośnik.

Sugeruje się dokonać pomiaru w czterech kuwetach (próby 1-4) przy jednej długości fali (np. 380 nm), po czym dokonać zmiany długości fali światła, i po wyzerowaniu pomiar przy kolejnej długości (np. 450 nm)

	Absorpcja 380 nm	Absorpcja 415 nm	Absorpcja 450 nm	WYNIK
Próba 1 - kontrola				
Próba 2 - UV				
Próba 3 – F				
Próba 4 – UV/F				

10) Poziom wolnej hemoglobiny wyliczyć ze wzoru:

$$C_{\text{freeHgb}} = 500 \cdot [1,65 \cdot A_{415} - 0,93 \cdot A_{380} - 0,73 \cdot A_{450}] \text{ [mg/dL] } ^*)$$

gdzie A – oznacza wynik absorbancji przy odpowiedniej długości fali (podanej w nm).

500 – mnożnik określający rozcieńczenie próbek (5 razy/ 100 mL)

Wyliczyć ilość uwolnionej hemoglobiny w próbach kontrolnych, wystawionych na działanie światła ultrafioletowego i fotouczulacza. Wyciągnąć wnioski o wpływie światła UV i fotouczulacza na uszkodzanie erytrocytów. Czy zastosowanie światła i fotouczulacza, w tej samej próbce (próba 4) daje większy efekt uszkodzania niż wynikałoby to z działania samego światła (próba 2) i fotouczulacza bez wzbudzenia (próba 3)? Który z czynników (UV, fotouczulacz) jest bardziej hemolityczny? Czy w wyniku łącznego zastosowania dwóch czynników hemolitycznych zwiększa stopień uszkodzania komórek (porównać ilość hemoglobiny uwolnionej gdy na erytrocyty działały dwa czynniki z sumą uwolnionej hemoglobiny w przypadku zastosowania tylko uczulacza i tylko światła UV) ?

*) na podstawie: Noe D.A., Weedn V., Bell W.R. *Direct spectrophotometry of serum hemoglobin: an Allen correction compared with a three-wavelength polychromatic analysis*. Clin Chem. 1984; 30: 627–630.