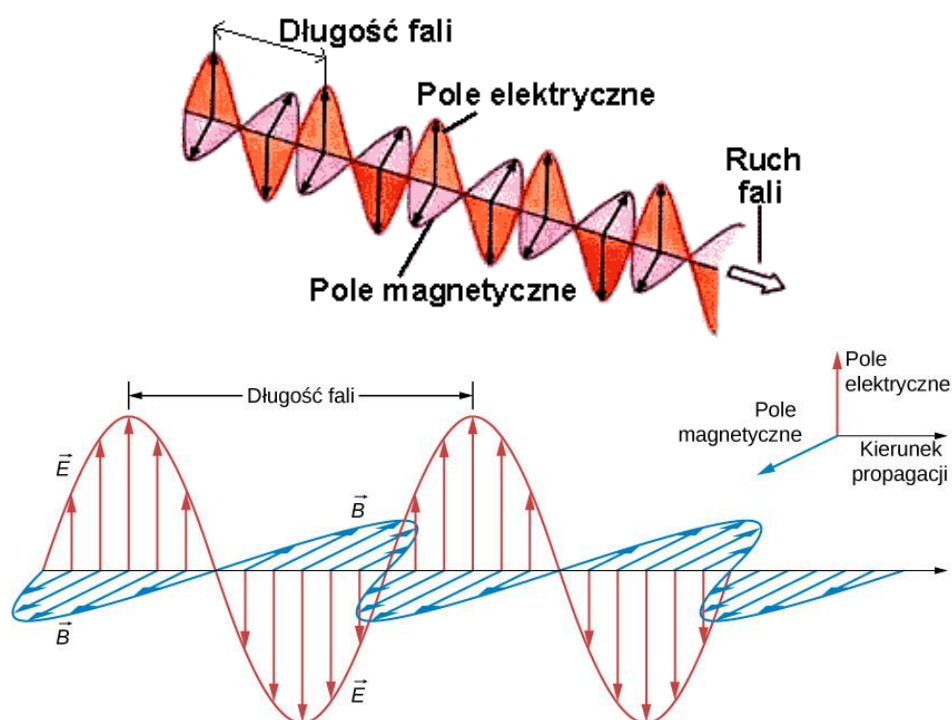


Ćwiczenie 44b

Działania promieniowania elektromagnetycznego 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, $\lambda = 380 \div 780 \text{ nm}$), na które reagują nasze oczy wyróżniamy także promieniowanie ultrafioletowe/nadfioletowe (UV, $\lambda = 180 \div 380 \text{ nm}$), oraz podczerwone (IR; $\lambda = 780 \text{ nm} \div 50 \text{ }\mu\text{m}$). Należy pamiętać, że promieniowanie elektromagnetyczne jest podobnym do fali, oscylującym polem elektrycznym (E) i magnetycznym (B) rozchodzącym się z stałą prędkością w przestrzeni ($c \approx 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ 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.

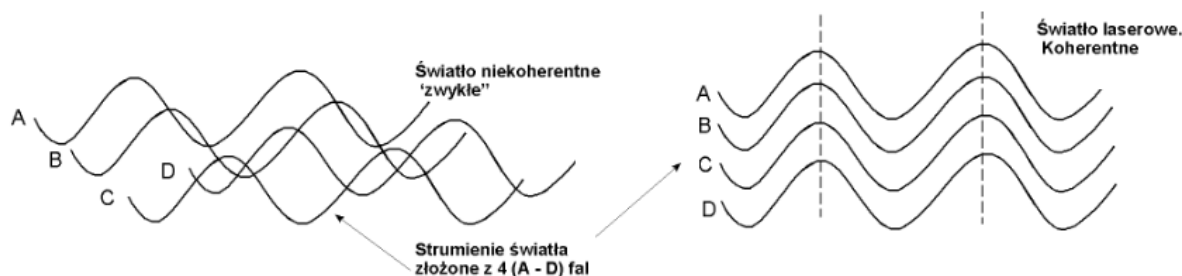


Ryc. 1. Fala elektromagnetyczna promieniowania

Wielkością charakteryzującą falę 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 inkohherentnym (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 niekoherentnym (zwykłym) i koherentnym (laserowym).

Światło laserowe

Laser jest urządzeniem wytwarzającym i wzmacniającym wiązkę promieniowania elektromagnetycznego. Jego nazwę stanowi akronim utworzony z pierwszych liter angielskiej nazwy wyrażenia *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, co można przetłumaczyć jako: wzmacnianie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Światło emitowane przez laser jest **monochromatyczne** (tzn. że posiada tylko jedną długość fali (kolor)), **skolimowane** (tzn. że wiązka światła laserowego ma niewielką rozbieżność i łatwo można utrzymać niewielką średnicę wiązki na dużych dystansach) oraz **koherentne** (spójne). Te właściwości sprawiają, że z powodzeniem wykorzystywane jest w badaniach naukowych czy w celach medycznych. 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). Bodźce ciągłe są łagodniejsze, natomiast impulsowe działają bardziej drażniąco 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.

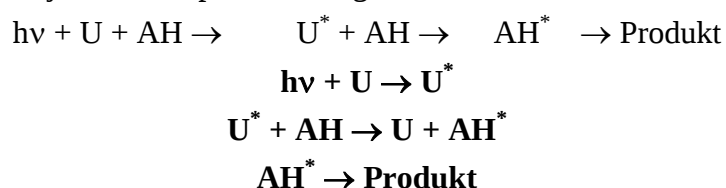
Promieniowanie laserowe wpływa na komórki żywe, doprowadzając do wielu zmian na poziomie komórkowym. Główne efekty promieniowania niskoenergetycznego skupiają się na: nasileniu przyswajania tlenu, zwiększeniu procesów regeneracyjnych, pobudzaniu podziałów komórkowych; zwiększeniu syntezy kolagenu, białek, kwasów nukleinowych; pobudzaniu aktywności enzymów błonowych i przekaźników synaptycznych, zmianie napięcia błon komórkowych (w tym też zmiany wazodylatacyjne). Użycie laserów o wyższej mocy pozwala na ich zastosowanie do niszczenia lub usuwania tkanek, co wykorzystywane jest w zabiegach chirurgicznych, medycynie estetycznej czy innych zabiegach stosowanych w onkologii, okulistyce, ginekologii, stomatologii, czy w zabiegach terapeutycznych mających na celu połączenie przeciwbólowych efektów tego promieniowania z długotrwałym efektem regeneracyjnym. Bardzo często promieniowanie laserowe wykorzystywane jest też w sytuacjach gdzie istnieje konieczność podania wybiórczej wiązki światła na odpowiedni fragment skóry, czy innej tkanki – co jest powszechnie stosowane w terapii fotodynamicznej.

Fotosensybilizacja

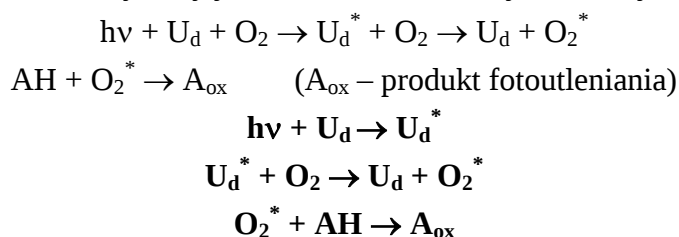
Często terminu „fotosensybilizacja” używa się w odniesieniu do zwiększenia wrażliwości komórek na działanie światła widzialnego i ultrafioletowego. Substancje fotouczulające (fotosensybilizatory, fotouczulacze) stosowane są celowo dla uzyskania wpływu leczniczego np. w bielactwie, łuszczycy, ziarniniaku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

Światło inicjuje proces określany jako *fotosensybilizacja*, 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 fotosensybilizatora 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 fotosensybilizacji inicjowany jest światłem, lecz dalsze etapy zachodzą już w ciemności.

U podstaw zjawiska *fotosensybilizacji* (*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” wychwytyującego 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), „zwykłe” fotouczulacze odgrywają stosunkowo niewielką rolę, natomiast duże znaczenie mają uczulacze fotodynamiczne czyli te, których rola sprowadza się do generowania tlenu singletowego.

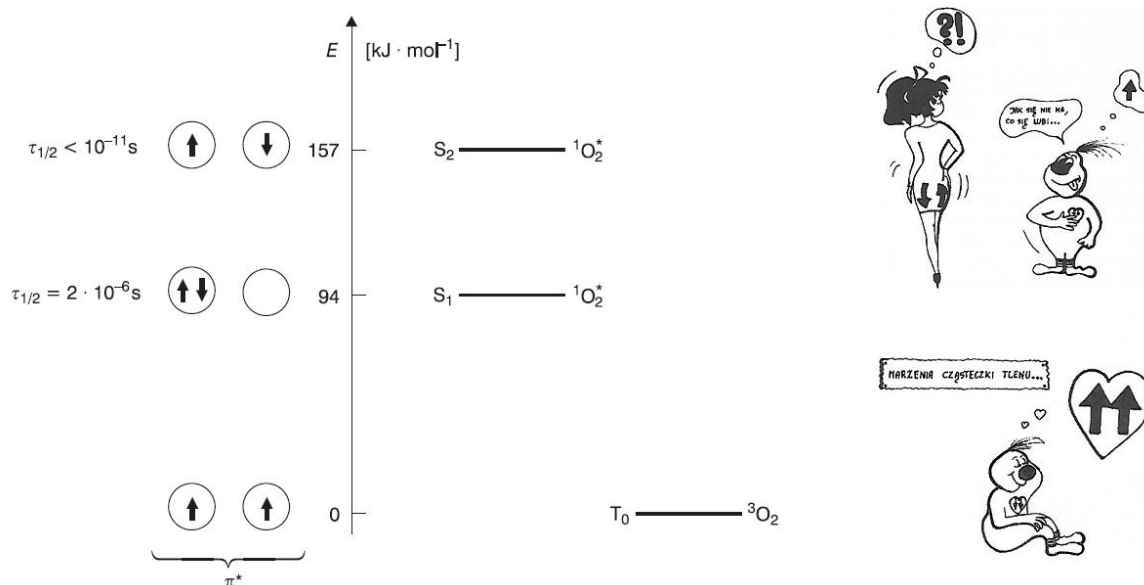
Tlen singletowy

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, gdyż aby wejść w reakcję musi przyjąć od innej cząsteczki dwa elektrony, a biorąc pod uwagę orientację spinów – najlepiej aby były one zorientowane przeciwnie niż te jakie występują w cząsteczce tlenu. Zdecydowana większość cząsteczek, z którymi tlen mógłby wchodzić w reakcje w komórkach, ma sparowane elektrony, a ponieważ orientacja elektronów zajmujących ten sam orbital jest przeciwna to ich wypadkowy spin jest równy 0 (i mówimy że są one w stanie singletowym¹). Nawet gdyby pojawiała się cząsteczka w stanie tripletowym to do zainicjowania reakcji musi być dostarczona energia, bo tlen wejdzie w reakcję z cząsteczką, w której elektrony będą miały antyrównoległą orientację spinów w porównaniu do tlenu tripletowego – a do ewentualnej zmiany orientacji spinu wymagana jest energia.

Znacznie bardziej reaktywny jest **tlen singletowy** $^1O_2^*$. Powstaje on po wzbudzeniu cząsteczki tlenu tripletowego 3O_2 . Wzbudzenie polega na dostarczeniu energii potrzebnej do

¹ Liczba kwantowa całkowitego spinu (S) cząsteczki równa się sumie liczb spinowych elektronów tej cząsteczki. Spin elektronu wynosi $\pm \frac{1}{2}$, w zależności od jego orientacji. Widać zatem, że sparowane elektrony mają spin całkowity równy 0 – jeden ma $+\frac{1}{2}$ a drugi $-\frac{1}{2}$. Pozwala to na określenie stanu cząsteczki wg reguły 2S+1. Czyli dla takiej cząsteczki mówimy że jest w stanie singletowym (1), a w przypadku kiedy elektrony mają zgodny spin ich spiny się sumują ($2(\frac{1}{2}+\frac{1}{2}) + 1 = 3$) i cząsteczka znajduje się w stanie tripletowym, tak jak tlen mający 2 niesparowane elektrony.

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 $^1\text{O}_2^*$ w stanach S_1 i S_2 , różniące się czasem życia ($\tau_{1/2}$) i energią wzbudzenia. Cząsteczka $^1\text{O}_2^*$ 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 $^1\text{O}_2^*$ w stanie S_1 , o znacznie dłuższym czasie życia. Jest ona nazywana po prostu **tlenem singletowym**.



Ryunki. pochodzą z książki: G. Bartosz „Druga Twarz Tlenu” Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003. grafika.: E. Jaruga

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.

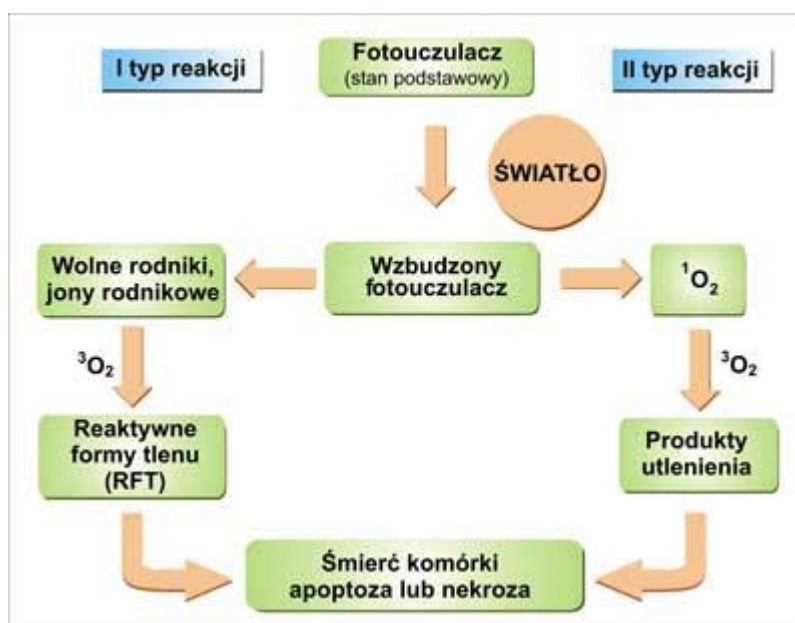
Tlen singletowy oddziałuje z innymi cząsteczkami na dwa sposoby: przekazuje energię wzbudzenia innym cząsteczkom (a sam przechodzi w stan tripletowy), bądź wchodzi z nimi w reakcje chemiczne. Wśród cząsteczek wrażliwych na działanie tlenu singletowego można wymienić reszty aminokwasowe białek (histydyny, 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 ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$) rodnik hydroksylowy ($HO^{\bullet}$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2). Semizredukowany sensybilizator może reagować z tlenem w stanie podstawowym (3O_2) i generować powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego, 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. 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.

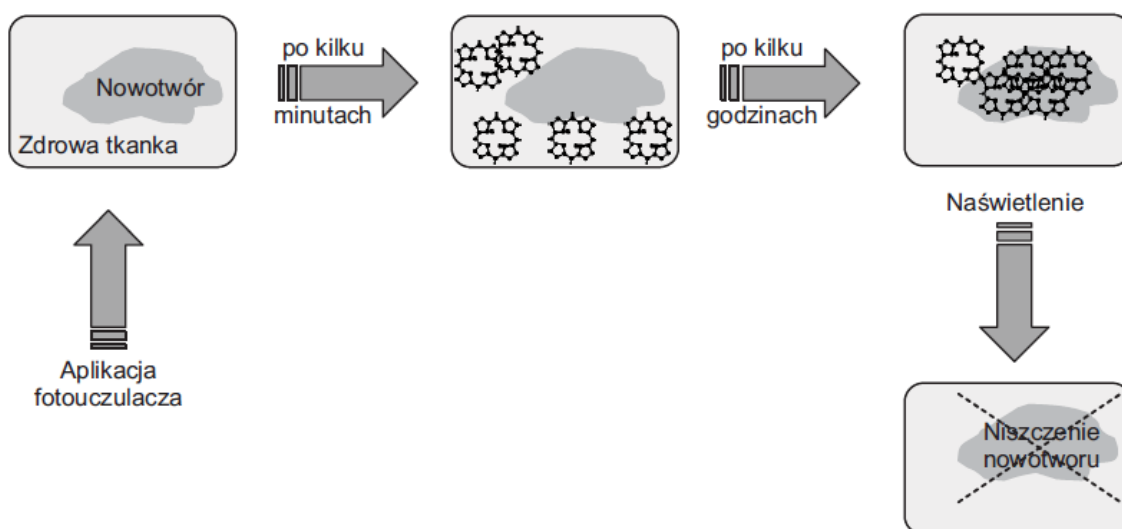
Terapia fotodynamiczna prowadzona w celu zniszczenia komórek nowotworowych może przebiegać na dwa sposoby:

- 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) podawany jest choremu. Kiedy stężenie fotouczulacza w tkance osiągnie maksimum (odpowiednią wartość) rozpoczyna się naświetlanie światłem laserowym o długości fali maksymalnie bliskiej maksimum absorpcji fotouczulacza. Najczęściej stosuje się światło laserowe, 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 komórki nowotworowej (śmierć na drodze apoptozy/nekrozy).



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.

Psolaren 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 łączeniem 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 (promieniowanie wysokoenergetyczne) w obecności fotouczulacza (np. ftalocyjanina, oxoralen). Po naświetleniu erytrocyty usuwamy (odwirowujemy), a w 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 u ludzi) i dlatego prawidłowe osocze

charakteryzuje się słomkowym 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 erytrocytów można wizualnie ocenić, że doszło do hemolizy. Mierząc zawartość hemoglobiny w osoczu (supernatancie otrzymanym pod odwirowaniem erytrocytów) możemy określić stopień hemolizy. Wśród czynników mogących powodować hemolizę, możemy wymienić: drastyczne zmiany temperatury, działanie promieni UV czy prądu (czynniki 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 – a w konsekwencji może dojść nawet do przerwania ciągłości błony plazmatycznej tych komórek. 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 (hemolizy).

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. Jednak, 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 probówek zawierających po 5 ml koncentratu krwinek czerwonych (próbówka na stanowisku) dodać po 5 ml zbuforowanej soli fizjologicznej (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 **1300-1600 obrotów/min**

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

- 2) Supernatant zawierający białka osocza i ewentualnie hemoglobinę, która mogła wydostać się z uszkodzonych erytrocytów, należy odrzucić (wylać – zebrać za pomocą pipety Paustera), a do osadu erytrocytów dodać 10 ml PBS (*jeśli korzystamy z dwóch probówek – dodajemy po 5 ml/próbę*). Wymieszać jak w poprzednim punkcie. Jeżeli zlany supernatant był przezroczysty (brak jakiegokolwiek czerwonego zabarwienia, w przypadku użycia krwi pełnej możliwe jest uzyskanie żółtego lub żółtozielonego zabarwienia) można przejść do punktu 3. Jeżeli widoczna była czerwona barwa – wirowanie należy powtórzyć i po zlanie przezroczystego supernatantu ponownie dodać po 5 ml buforu PBS (do każdej z probówek) i delikatnie wymieszać za pomocą pipety automatycznej.
- 3) Uzyskana zawiesina erytrocytów powinna zawierać ok. 40 % erytrocytów (hematokryt krwi wynosi 37-54 %). Sugeruje się zlanie zawartości obu probówek do jednego naczynia (*plastikowa probówka lub zlewka o pojemności 50 ml*) – sumaryczna objętość powinna wynosić ok 20 - 25 ml (najlepiej dodać do osadu erytrocytów po 5 ml PBS, wymieszać i przenieść do probówki o pojemności 50 ml – połączyć zawartość obu probówek i ewentualnie do uzyskanej zawiesiny dodać 5 ml PBS).

Po delikatnym wymieszaniu przenosi się po 2 ml erytrocytów do 4 ponumerowanych kuwet „makro” o przezroczystych ściankach – o pojemności 3 ml → fot. obok



- 4) Do pierwszych dwóch kuwet dodać po 5 μ l soli fizjologicznej, a do pozostałych (numer 3 i 4) po 5 μ l fotouczulacza (oksoalenu). *Dodawanie małych objętości (poniżej 25 μ l) wymaga aby wprowadzić końcówkę pipety do cieczy – nie dodawać w powietrzu, bowiem objętość jednej kropli która jest w stanie oderwać się od końcówki biurety/pipety wynosi ok. 20-30 μ l.*

Delikatnie wymieszać każdą z prób (sugeruje się użycie plastikowych szpatulek mieszających). Kuwety z numerami 1 i 3 zostawić na stole laboratoryjnym (światło widzialne), a kuwety numer 2 i 4 wstawić pod lampę ultrafioletową. Włączyć światło ultrafioletowe w trybie pracy ciągłej (∞). Z tyłu lampy obok włącznika zasilania znajduje się przełącznik pozwalający ustawić czas naświetlania na (90 s - ∞ - 120 s). Ustawienie go w pozycji środkowej pozwala na ciągły czas pracy lampy. Przetastawienie na 90/120 s – spowoduje automatyczne wyłączenie lampy po określonym czasie.



- 5) Po 15-20 minutach roztwory erytrocytów przenosimy do *probówek Eppendorf'a* (podpisać probówki zgodnie z przyjętą numeracją) i wirować przez 9 minut na wirówce MPW-55 (1700 obr/min; 210g).

Próby o takiej samej masie wstawiamy do wirówki naprzeciw siebie.

- 6) Znad każdego osadu erytrocytów bardzo delikatnie zbieramy supernatant, przenosimy do probówek i określamy ilość uwolnionej hemoglobiny (*patrz 7c*)

7) Pomiar wolnej hemoglobiny:

- a) Włączyć spektrofotometr przynajmniej 10 minut przed przystąpieniem do pomiarów.
- 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 służy do kalibracji spektrofotometru (zerowania – „*blank*”).
- c) Do drugiej kuwety wprowadzić 800 μ l (0,8 ml) 0,9% roztworu NaCl (soli fizjologicznej) i 200 μ l (0,2 ml) otrzymanego w pkt. 6 supernatantu. Wymieszać za pomocą plastikowego mieszadła. Analogiczne przygotowujemy próby dla wszystkich supernatantów (1-4).



- 8) 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)

Tabela wyników:

	Absorpcja _{380 nm}	Absorpcja _{415 nm}	Absorpcja _{450 nm}	WYNIK (hemoglobina [mg/dL])
Próba 1 - kontrola				
Próba 2 - UV				
Próba 3 – F				
Próba 4 – UV/F				

9) 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 absorpcji 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 próbie (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.

Zawartość wolnej hemoglobiny można wyliczyć także z równania Harboe'a:

$$\text{fHb (mg/dL)} = 8,36 (2 \times A_{415 \text{ nm}} - A_{380 \text{ nm}} - A_{450 \text{ nm}}) \times \text{współczynnik rozcieńczenia}$$

Jeżeli chcemy przeliczyć stężenie na molowe to możemy zastosować współczynnik konwersji i dla fHb w przypadku zamiany z mg/dL na µmol/L wynosi on 0,155.