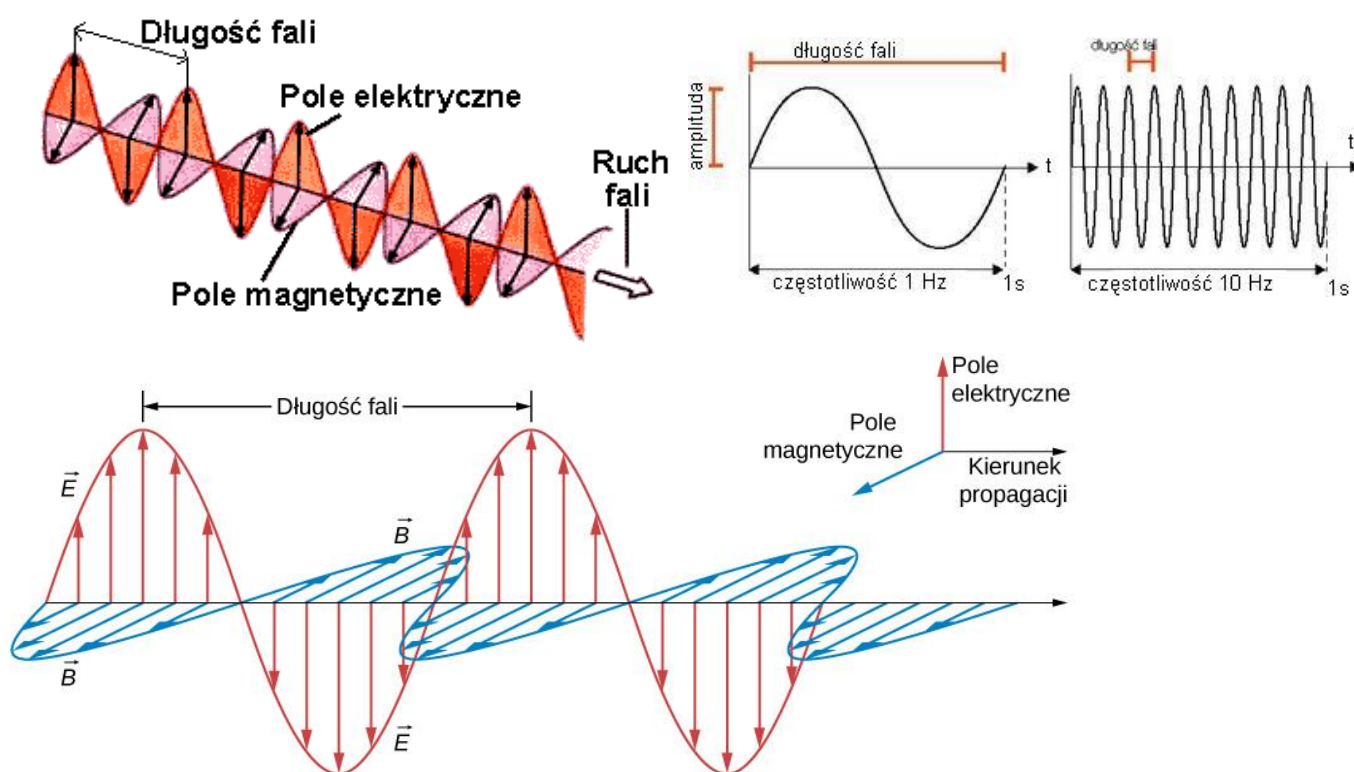


Ćwiczenie 21

Efekt 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, $\lambda = 380 - 780$ 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.



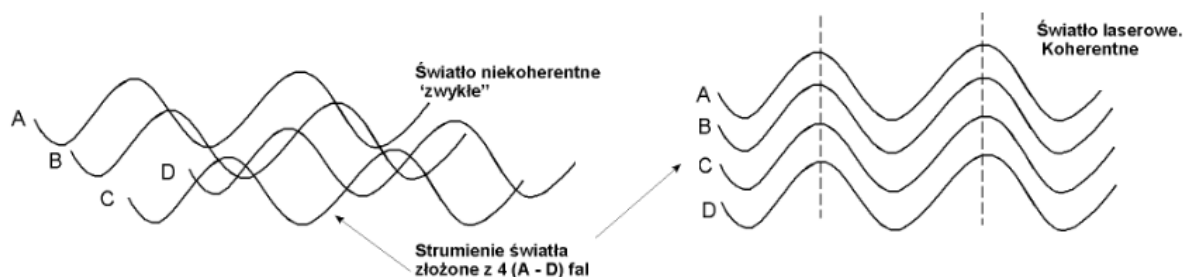
Ryc. 1. Fala elektromagnetyczna promieniowania

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. Według Plancka najmniejsza porcja energii fali elektromagnetycznej wyraża się wzorem $E = h\nu$ lub w odniesieniu do długości fali

jako $E = h \cdot c / \lambda$ gdzie h – uniwersalna stała - nazwana stałą Plancka ($h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J·s), ν - częstotliwość, c - prędkość światła ($c = 299\,792\,458$ m/s), a λ - długość fali). Zatem każda fala świetlna niesie ze sobą energię, która może oddziaływać na organizmy żywe. W przypadku gdy ilość energii jest tak duża, że doprowadza do jonizacji cząsteczek (promieniowanie gamma, rentgenowskie) może dochodzić do uszkodzania wielu cząsteczek biologicznych. Natomiast promieniowanie świetlne (promieniowanie niejonizujące) niesie znacznie niższe porcje energii i nie doprowadza do jonizacji cząstek, ale może powodować ich wzbudzenie co przejawia się zmianami w energii elektronowej, oscylacyjnej czy rotacyjnej cząsteczek.

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).

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 by przetłumaczyć jako: wzmacnianie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Światło emitowane przez laser jest **monochromatyczne** (tzn. że posiada tylko jedną długość fali (kolor)), **skoligowane** (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 mierzoną 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 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.

W przypadku stymulacji tkanek dobiera się promieniowanie dla którego dominują procesy aktywnej transmisji i absorpcji w tkance. Najczęściej dobiera się długości fal w przedziale 550-950 nm (zakres widzialny i bliskiej podczerwieni), które nie dociera do głębiej zlokalizowanych tkanek gdyż jest absorbowane w tkankach położonych bardziej powierzchniowo. Efektywna moc (energia) dostarczana do tkanek jest pomniejszana o część która uległa odbiciu od powierzchni tkanek lub przez nią przeniknęła. Stosowanie promieniowania laserowego o gęstościach mocy nie wyższych niż $50 mW/cm^2$ wywołuje wiele efektów fotobiochemicznych wśród których możemy wyróżnić: wzrost szybkości procesów transportu w komórkach, zmiany struktury błon biologicznych, wzrost aktywności enzymów, przyspieszenie mitozy, zwiększenie syntezy ATP i DNA, a także pobudzenie mikrokrążenia i angiogenezy, wzrost amplitudy pobudzeń nerwowych czy działanie immunomodulacyjne.

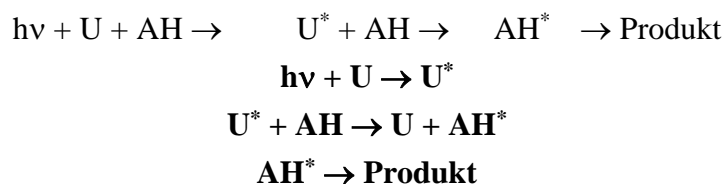
Fotosensybilizacja

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 zająć przypadkowo w wyniku niekorzystnego, ubocznego działania pewnych leków, w następstwie kontaktu zawodowego, lub w wyniku wewnątrzustrojowego wytwarzania fotouczulaczy.

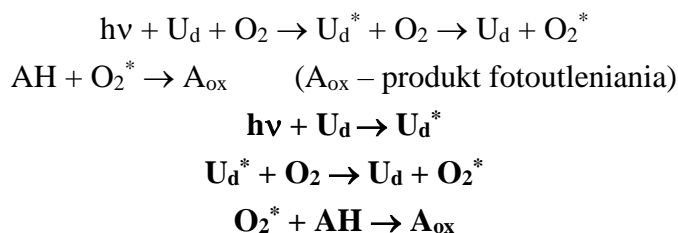
Światło inicjuje proces określany jako *fotosensybilizacja*, czyli fotouwrażliwienie polegające na pochłanianiu energii promieniowania świetlnego i przekazywania jej innym substancjom biorącym udział w reakcji świetlnej. W wyniku absorpcji światła sensybilizator, znajdujący się w stanie podstawowym, 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” 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.

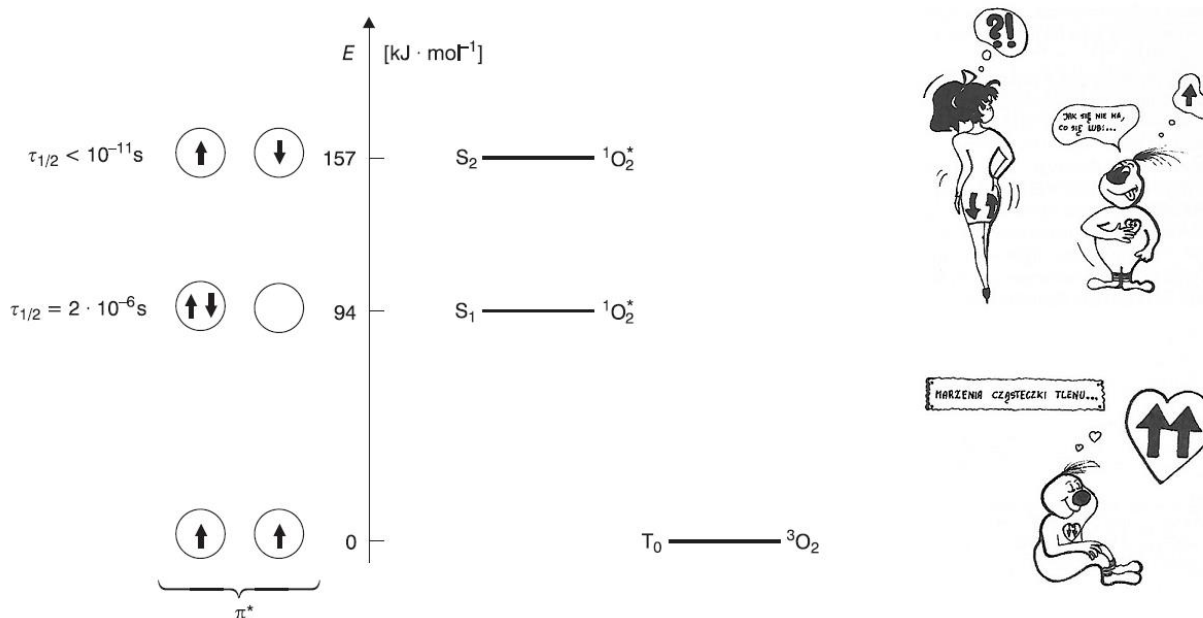
W żywych organizmach, na które działa promieniowanie (światło), „zwykłe” fotouczulacze odgrywają stosunkowo niewielką rolę, natomiast duże znaczenie mają uczulacze fotodynamiczne czyli te, których rola sprowadza się do generowania tlenu singletowego.

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, przy czym pod uwagę należy wziąć orientację spinów – najlepiej aby były one antyrównoległe. Zdecydowana większość cząsteczek organicznych, z którymi tlen mógłby wchodzić w reakcje w komórkach, ma sparowane elektrony, tzn. wypadkowy spin równy 0. Sprawia to, że możliwość wejścia tlenu w reakcję jest ograniczona, a nawet gdyby pojawiała się cząsteczka w stanie tripletowym to do zainicjowania reakcji może być wymagane dostarczenie dodatkowej energii (niezbędnej do odpowiedniego ustawienia cząstek - orientacji spinów).

Znacznie bardziej reaktywny jest tlen singletowy $^1O_2^*$. 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 $^1\text{O}_2^*$ 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 *tleniem singletowym*.



Rys. E. Jaruga - z książki Bartosz G. „Druza Twarz Tlenu” Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003

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.

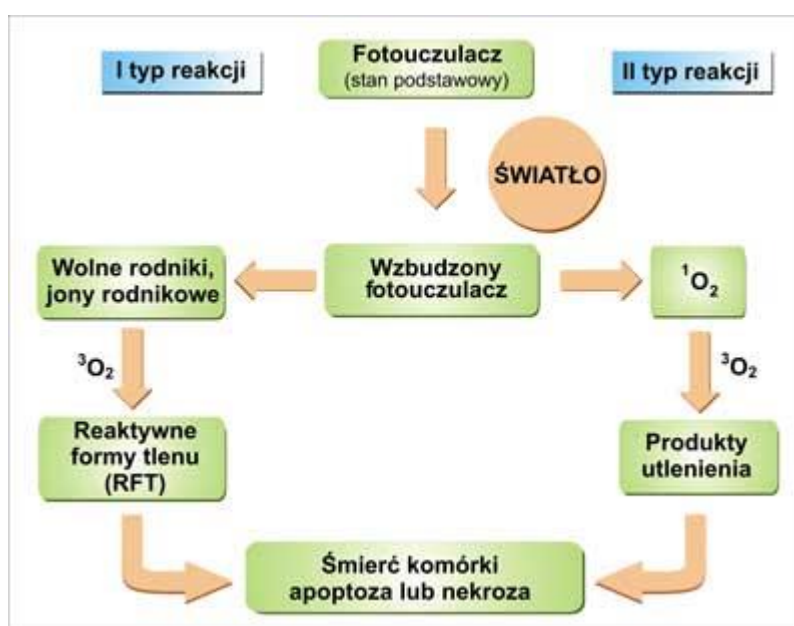
Terapia fotodynamiczna

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.

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}), nadtlenek 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 .



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 II wzbudzony sensybilizator (znajdujący się w stanie trypletowym) przenosi swoją energię bezpośrednio na tlen i tworzy tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), będący bardzo reaktywną formą tlenu:



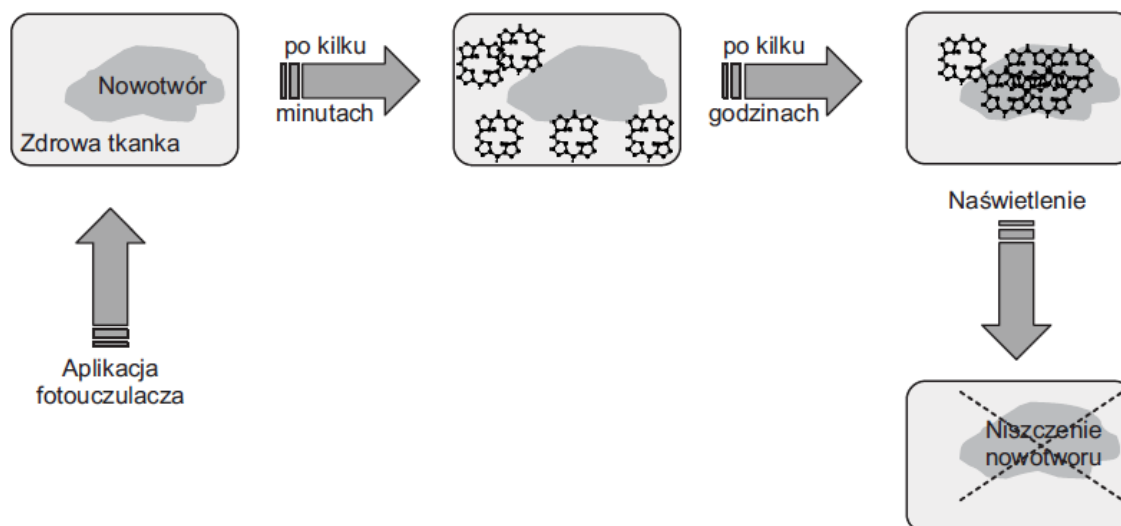
Ponieważ tlen singletowy jest bardziej elektrofilowy niż ${}^3\text{O}_2$, to może znacznie szybciej reagować z bogatymi w elektrony biocząsteczkami, dając utlenione pochodne (hydroksynadtlenki, endonadtlenki, sulfotlenki). Oba typy reakcji (I i II) zachodzą równocześnie, a stosunek pomiędzy tymi procesami 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) 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 cytosylniczne 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 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. Mierząc 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). Prawdopodobnie zbudowana, niezmodyfikowana chemicznie błona krwinek czerwonych zapewnia im stosunkowo dużą oporność na działanie hiposmotycznych 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 uszkodzeniu błony krwinek czerwonych (hemolizie).

Który z czynników (UV, fotouczulacz) jest bardziej hemolityczny? Czy nałożenie 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 ?

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 należy zachować szczególną ostrożność podczas wykonywania wszystkich czynności z udziałem krwi.

- 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 (PBS). Ostrożnie wymieszać za pomocą pipety automatycznej powoli aspirując i wypuszczając płyn – tak aby go nie spenić. Następnie uzyskany roztwór należy odwirować na wirówce laboratoryjnej (12 min., 200 g). Korzystając z wirówki MPW-211 lub MPW-2 ustawiamy czas wirowania na **12 min**, a szybkość wirowania w zakresie **1200 - 1600 obrotów/min**. (jeżeli chcemy zmienić szybkość wirowania bardzo delikatnie przekręcić pokrętkę i chwilę odczekać na stabilizację obrotów)

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 (górną 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), a do osadu erytrocytów dodać 10 ml PBS (jeśli korzystamy z dwóch probówek – dodajemy po 5 ml/próbę). Wymieszać jak w poprzednim punkcie i procedurę powtórzyć. Po usunięciu supernatantu ponownie dodać po 5 ml buforu PBS (do każdej z probówek) i delikatnie wymieszać za pomocą pipety automatycznej i odwirować. Jeżeli ponownie zlany supernatant był przezroczysty (brak jakiegokolwiek czerwonego zabarwienia) można przejść do punktu 3. Jeżeli widoczna była czerwona barwa – procedurę zawieszania i wirowania należy powtórzyć.



- 3) Do uzyskanego osadu erytrocytów dodać 15 ml PBS-u, aby uzyskać zawiesinę zawierającą nie więcej niż 40 % erytrocytów (sugeruje się dodać po 5 ml PBS do każdej z probówek, wymieszać i przenieść ich zawartość do większej plastikowej probówki o pojemności 50 ml, a następnie dodać kolejne 5 ml PBS do połączonej zawiesiny komórek). Wymieszać delikatnie, po czym do czterech przezroczystych *kuwet „makro”* – o pojemności 3 ml spektrofotometrycznych (posiadających wszystkie ścianki przejrzyste! – fot. obok) dodać po 2 ml



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

uzyskanej zawiesiny erytrocytów. Ponumerować kuwety.

- 4) Do pierwszych dwóch kuwet dodać po 5 μl soli fizjologicznej, a do pozostałych (numer 3 i 4) po 5 μl fotouczulacza (oksoalenu). *Dodawanie małych objętości (poniżej 25 μl) 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 μl .* Po pobraniu 5 μl odczynnika wprowadza się końcówkę pipety do zawiesiny erytrocytów i delikatnie naciska tłoczek do oporu aby wprowadzić dodawaną substancję. Przytrzymując wciśnięty tłoczek pipety wyjąć końcówkę (nie zwalniając uchwytu/tłoczka pipety!). Dopiero po wyjęciu końcówki zwolnić (puścić) wciśnięty tłoczek pipety, zmienić końcówkę i dodać kolejną porcję odczynnika do następnej próby

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. Przetawienie na 90/120 s – spowoduje automatyczne wyłączenie lampy po określonym czasie.

- 5) Kuwety z numerami 1 i 3 zostawić na stole laboratoryjnym (wystawione będą na działanie światła widzialnego), a drugą (2) i czwartą (4) wstawić pod lampę ultrafioletową (2) na okres 20 minut.

W trakcie oczekiwania można zacząć wykonywać część eksperymentalną opisaną na stronie 14 (ćwiczenie 21B).

- 6) Po 20 minutach roztwory erytrocytów przenosimy do probówek Eppendorf'a (fot. obok, podpisać probówki zgodnie z przyjętą numeracją) i wirujemy przez **6 minut** na wirówce MPW-55 (**2000 obr/min**). Roztwory przelać bezpośrednio z kuwet do probówek Eppendorfa lub przenieść je za pomocą pipety.



Próby o takiej samej masie wstawiamy do wirówki naprzeciw siebie.

- 7) Znad każdego osadu erytrocytów bardzo delikatnie zbieramy supernatant (górna część roztworu jest potrzebna do dalszych badań!), w którym określamy ilość uwolnionej hemoglobiny (patrz 8c). Ostrożnie nie naruszać granicy pomiędzy roztworem, a osadem erytrocytów



- 8) Pomiar wolnej hemoglobiny:

- a) Włączyć spektrofotometr przynajmniej 10 minut przed przystąpieniem do pomiarów i przygotować 5 kuwet (semi-mikro o poj. 1,5 ml, z przewężonymi ściankami – fot. obok) o podobnej przepuszczalności światła – można sprawdzić czy wyniki pomiarów przy jednej długości światła (np. 405 nm) w przypadku

poszczególnych kuwet nie różnią się o więcej niż 0,008.

b) Do jednej kuwety wlać 1 ml wody lub soli fizjologicznej. Próba ta służy do kalibracji spektrofotometru (zerowania – „blank”).

c) Do drugiej kuwety wlać 800 μ l (0,8 ml) 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).

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 (np. 415 nm), i po wyzerowaniu pomiar absorbancji przy tej długości fali.

	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): 200 μ l próby:800 μ l rozpuszczalnika (2:8 daje nam stosunek 1:4 – czyli nasza próba stanowi 1/5 całego roztworu)

Zastosowanie tych wyliczeń umożliwia nam korekcję wyników, z względu na fakt, że w osoczu/krwi obecne są również inne substancje (np. bilirubina, lipidy), które mogą absorbować światło o badanej długości fali (415 nm).

Wyliczyć ilość uwolnionej hemoglobiny w próbach kontrolnych, wystawionych na działanie światła ultrafioletowego i fotouczulacza. Wyciągnąć wnioski o wpływie światła i fotouczulacza na uszkodzenie erytrocytów.

*) 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.

Ćwiczenie 21B

Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na uszkodzenie komórek/białek

Wśród czynników, które mogą doprowadzać do uszkodzania komórek możemy wyróżnić zarówno czynniki fizyczne, jak i chemiczne. Aby przekonać się o podatności erytrocytów na uszkodzenie przez różnego rodzaju czynniki wykonajmy prosty eksperyment. Wykorzystamy zawiesinę erytrocytów uzyskaną w ćwiczeniu 21A. Do 3 probówek Ependorfa wprowadzić po 1,5 ml zawiesiny erytrocytów, dodatkowo do 4 próbówki wprowadzić 1,5 ml dowolnego płynu (np. wody). Następnie wstawić do wirówki MPW-55 jedną probówkę z zawiesiną erytrocytów i jedną z wodą. Odwirować je przez 10 minut z prędkością 600 g (3000 obr/min), po czym usunąć probówkę z erytrocytami. Następnie wstawić kolejną próbówkę z erytrocytami (nadal stosując wodę jako przeciwwagę w wirówce) i odwirować ją z prędkością 7300 g (10 000 obr/min), a kolejną z prędkością 14 000 g (14 000 obr/min)². Ustawić probówki obok siebie i porównać zabarwienie supernatantu nad osadem erytrocytów. Wyciągnąć wnioski o szybkości wirowania i jej wpływie na erytrocyty.

W kolejnym doświadczeniu używamy 3 probówek zawierających po 980 μ l zawiesiny erytrocytów, do których kolejno dodajemy po 20 μ l:

- a) soli fizjologicznej
- b) roztworu tritonu X-100 lub SLS (szczegóły ustala prowadzący)
- c) chloroformu/alkoholu metylowego lub innego odczynnika organicznego wskazanego przez prowadzącego

Czwartą probówkę (1 ml) wstawić na 10 minut do zamrażarki (-20°C), po czym ogrzać ją trzymając w dłoni przez 5 minut lub wstawić do naczynia z ciepłą wodą (~40°C)

Ostawić je na 30 minut i wyciągnąć wnioski o wpływie dodawanych czynników na trwałość erytrocytów – prowadzący ćwiczenia może wskazać aby skrócić czas oczekiwania – sugeruje się odwirowanie próbek z prędkością 1500 – 3000 obr/min, przez 5 minut.

² Można wykorzystać wirówkę MPW-53, która pracuje tylko przy jednej prędkości – powyżej 11 000 g (13 tys obrotów/min)