

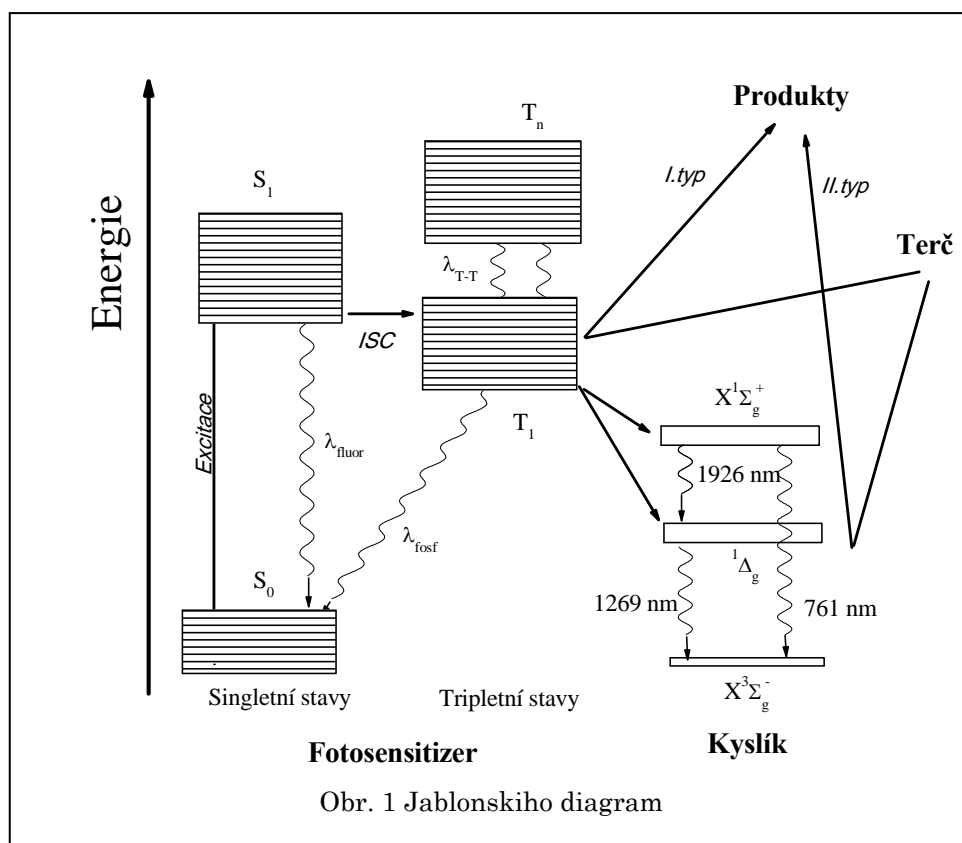
Laserová kinetická spektroskopie aneb laserová záblesková fotolýza

(Návod k praktiku)

Úvod

Jedním ze způsobů diagnostiky a léčení rakoviny je **fotodynamická terapie** [1]. Využívá vlastností některých sloučenin tzv. **fotosenzitizerů** především porfyrinů, schopných absorbovat záření laseru a získanou energii využít k ničení rakovinných buněk. Proces bývá zároveň doprovázen intenzivní emisí záření (zpravidla v červené oblasti spektra), na jejímž základě lze odlišit rakovinné buňky, ve kterých dochází k akumulaci fotosenzitizeru, od buněk zdravých a tak zároveň metodu použít pro diagnostiku zhoubných nádorů.

Mechanismus interakce fotosenzitizeru s terčem

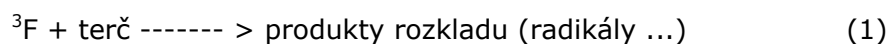


Absorpce fotonu fotosenzitizerem vede ke vzniku excitovaného singletního stavu $^1F^*$ (doba života jednotky až desítky ns). Následuje vnitřní přenos energie (intersystem crossing) za vzniku relativně dlouhožijícího tripletního stavu 3F (doba života stovky ms až ms). Zjednodušené schéma znázorněno je na **Jablonskiho diagramu** (obrázek 1).

Existují dva typy mechanismu interakce tripletního stavu fotosenzitizeru 3F s živou hmotou:

-mechanismus I. typu, kdy molekula předává svoji energii přímo biologickému substrátu, což vede k přímé

destrukci vhodných terčů v buňkách :



-mechanismus II. typu, kdy interakcí tripletního stavu s kyslíkem v základním stavu vzniká reaktivní singletní kyslík využitelný k oxidaci biologického substrátu:



Nezbytným předpokladem pro pochopení procesu fotodynamické terapie nádorů a výběr vhodného senzibilizátoru je důležité znát jeho základní fotofyzikální a fotochemické parametry v daném prostředí (emisní spektra, doba života a kvantové výtěžky tripletních stavů a rychlostní konstanta jejich zhášení kyslíkem (rovnice (2), dobu života a kvantové výtěžky singletního kyslíku).

Definice doby života a rychlostní konstanty zhášení tripletních stavů

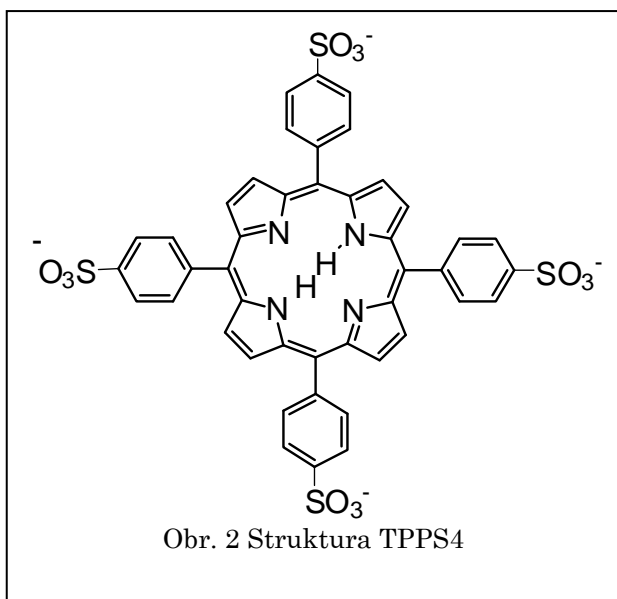
Koncentrace tripletových stavů fotosenzitizeru v čase t c_t je dána rovnicí (4):

$$c_t = c_0 \times \exp(-kt) \quad (4)$$

kde c_0 je počáteční koncentrace tripletních stavů fotosenzitizeru a rychlostní konstanta k je dána vztahem (5).

$$k = k_{et} [{}^3\text{O}_2] + k_p \quad (5)$$

kde k_{et} je rychlostní konstanta zhášení tripletního stavu kyslíkem (rovnice (2)), k_p rychlostní konstanta spontánní deaktivace (v nepřítomnosti kyslíku), která zahrnuje především výměnu energie mezi tripletním stavem fotosenzitizeru a okolním prostředím (např. rovnice (1)) a vyzáření fotonu za vzniku singletního stavu. Střední doba života tripletního stavu fotosenzitizeru je definována jako $t = 1/k_p$. Rychlostní konstantu k_{et} je možno spočítat jako směrnicí závislosti celkové rychlostní konstanty k pro úbytek koncentrace tripletních stavů fotosenzitizeru na koncentraci kyslíku $[{}^3\text{O}_2]$ (rovnice (5)).



Koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě $[{}^3\text{O}_2]$ lze nalézt v tabulkách:

$[{}^3\text{O}_2] = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ v roztoku nasyceném kyslíkem

$[{}^3\text{O}_2] = 2.8 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v roztoku nasyceném vzduchem

$[{}^3\text{O}_2] = 0 \text{ mol.l}^{-1}$ v roztoku nasyceném inertním plynem

Kvantové výtěžky tripletních stavů nebo singletního kyslíku resp. emise jsou definovány jako počet vznikajících částic resp. počet emitovaných fotonů na 1 absorbovaný foton. Jejich výpočty jsou obtížnější a zpravidla vyžadují velice přesné měření energie.

Nejčastěji se jako fotosenzitizery v medicíně používají deriváty hematoporphyrinu, v českém zdravotnictví se začal používat **meso-tetra(4-sulfofenyl)porfyrin** (TPPS₄), perspektivně se též uvažuje o sulfonovaných ftalocyaninech zinečnatém a chlorohlinitém (AISPC).

Spektroskopická detekce singletních a tripletních stavů fotosenzitizerů

Excitované singletní stavy

Kromě tvorby tripletových stavů mohou excitované singletní stavy emitovat fotony o vlnové délce závislé na struktuře fotosenzitizeru (vlnová délka fluorescence leží v červené oblasti spektra). Množství emitovaných fotonů je úměrné koncentraci senzibilizátoru v roztoku. Tato detekční metoda se nazývá laserem indukovaná fluorescence a ve speciálních případech umožňuje detekovat až jednotlivé molekuly.

Tripletní stavy

Zvýšení absorpce roztoku při interakci roztoku fotosenzitizeru s laserovým zářením je způsobena vznikem tripletních stavů, která absorbují záření UV lampy (vlnová délka T-T na obr. 1, T-T přechody). Vzhledem k tomu, že se jedná o nestabilní částice je i změna absorpce roztoku na vhodně zvolené vlnové délce (absorpční maximum nestabilní částice) závislá na čase. Pokud je záření UV lampy na zvolené vlnové délce silně absorbováno fotosenzitizerem v základním stavu může dojít účinkem laserového záření ke snížení absorpce roztoku. Intenzivním vybuzením částic laserovým zářením do excitovaných singletních a tripletních stavů se sníží obsazení základní energetické hladiny, které se projeví zmenšením absorpce na excitační vlnové délce. Tento jev se nazývá "bleaching".

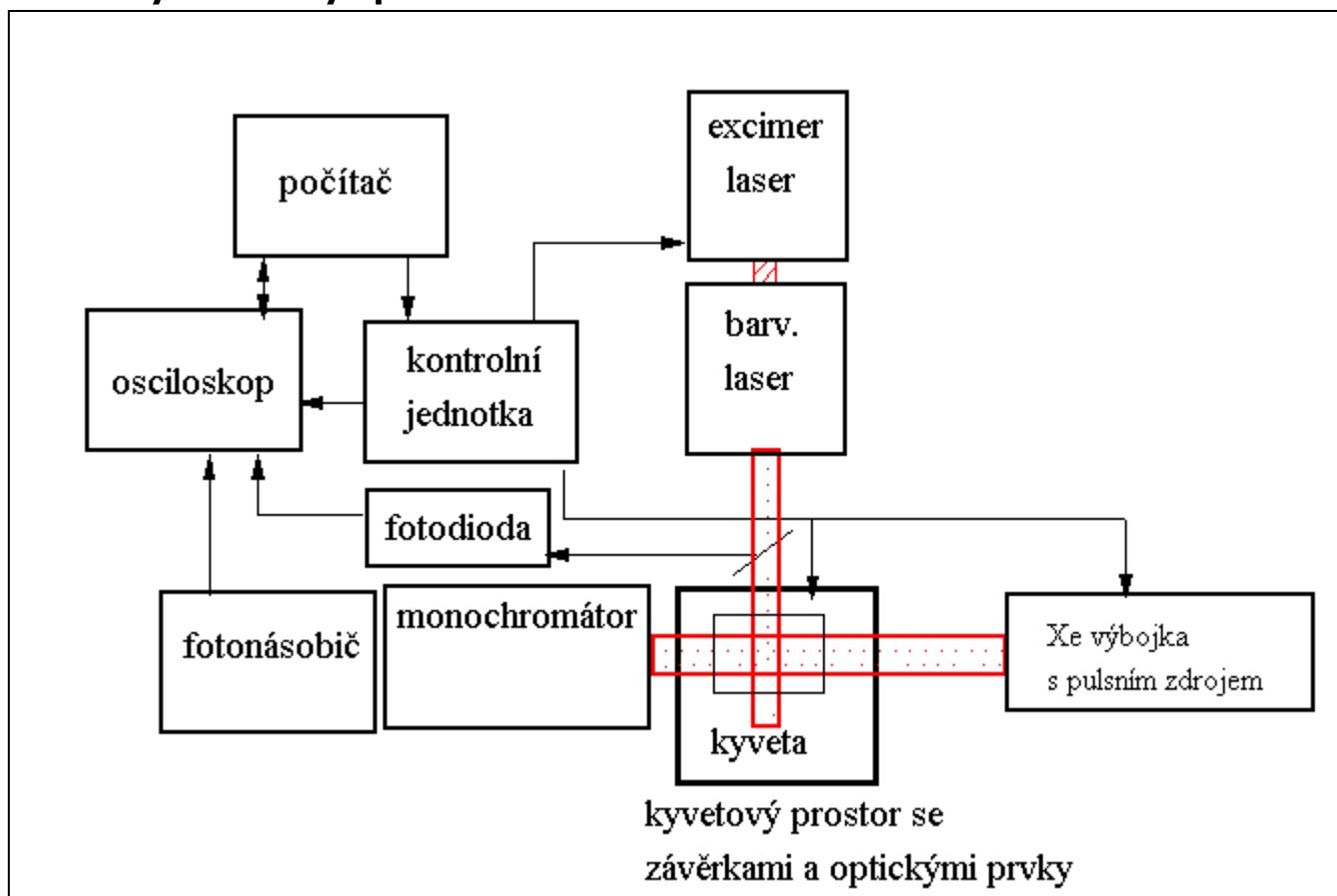
Singletní kyslík

Singletní kyslík je možno přímo monitorovat na základě jeho fosforescence na vlnové délce 1270 nm. Tento signál je však velmi slabý (kvantové výtěžky fosforescence jsou nižší než 10^{-4}). Doba života singletního kyslíku v H₂O je asi 2-4 μs a signál bývá překryt intenzivní červenou emisí ze singletních stavů fotosenzitizeru. Proto se často používá jako rozpouštědla D₂O, kde je doba života singletního kyslíku více 10 krát delší.

Experimentální vybavení

K dispozici je zásobní roztok TPPS₄, technické plyny (kyslík, dusík, helium), pro měření časově rozvinutých spekter laserový kinetický spektrometr řízený počítačem a čerpaný barvivovým laserem.

Laserový kinetický spektrometr



Účinkem laserového záření v roztoku vznikají excitované částice TPPS₄. Záření emitované vzorkem je monochromatizováno a detekováno fotonásobičem. Signál (časová změna počtu dopadajících fotonů na fotonásobič při dané vlnové délce) je snímán oscilopem. Měření se provede pro sekvenci různých vlnových délek a zpracuje se na počítači ve formě závislosti fluorescence (celkového počtu fotonů, které dopadnou na fotonásobič) na vlnové délce.

Princip měření absorpčních spekter je obdobný jako v předchozím případě, měříme pouze změnu počtu fotonů emitovaných Xe výbojkou o dané vlnové délce a dopadající na fotonásobič po průchodu vzorkem. Pro výpočet spekter v čase t po laserovém pulsu je třeba naměřit 10-100 časových závislostí absorbance při různých vlnových délkách. Pak vyneseme závislost změny absorbance v roztoku v příslušném čase na vlnové délce. Pro absolutní měření změn absorbance je nutno znát tyto body:

0 % transmittance - tzv. temný proud fotonásobiče, odezva fotonásobiče v případě, kdy na něho nedopadají žádné fotony

100 % transmittance - odezva fotonásobiče pouze na fotony z xenonové výbojky, je zamezen vstup laserového záření do kyvety

Pro měření singletního kyslíku se použije místo monochromátoru interferenční filtr se středem na 1270 nm a místo detektoru dioda Judson J16.

Excitační zdroj

Barvivový laser FL 3002 (Lambda Physics) čerpaný excimerovým laserem. Doba pulsu cca 30 ns, energie v pulsu do 10 mJ, vlnová délka 413.5 nm

Programové vybavení

Program pro řízení počítače a výpočet časově rozvinutých spekter Řídící počítač pracuje v operačním systému RISC. Změřená data je možno si k dalšímu zpracování odnést na vlastní disketě ve formě ASCII souborů, které jsou vhodné pro další zpracování na běžném PC.

Doporučená literatura

Fotofyzikální a fotochemické procesy probíhající při fotodynamické terapii nádorů

[1] Bonnett R.: Chem.Soc.Rev. 24, 19-33(1995) .

Spektroskopické metody používané pro studium fotosenzitizerů

[2] Bensason R.V., Land E.J., Truscott T.G. Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York (1993).

[3] Kubát P.: Chemické Listy 90, 515-522 (1996).

Literární údaje o fotofyzikálních parametrech měřených fotosenzitizerů

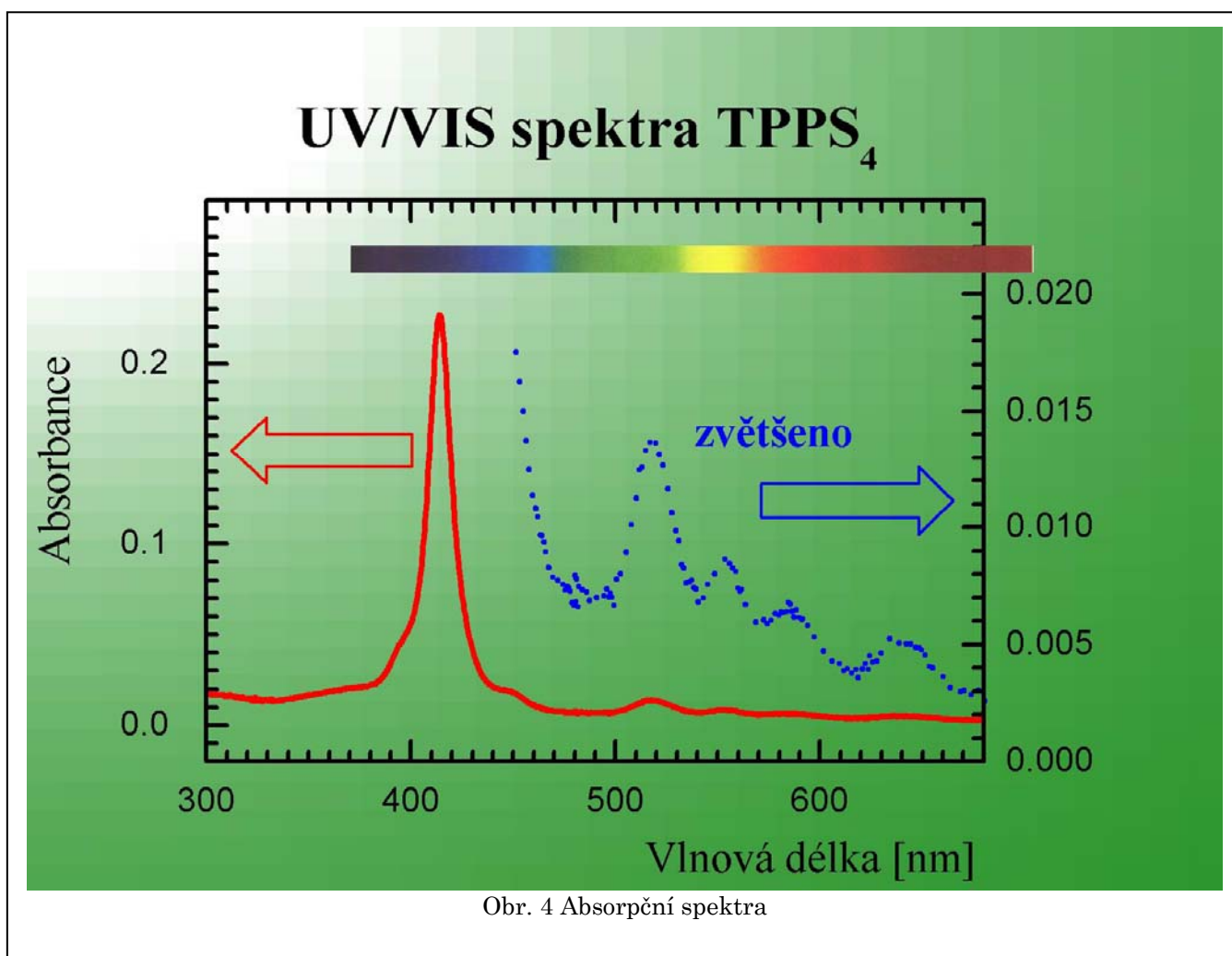
[4] Engst P., Kubát P., Jirsa M.: J. Photochem. Photobiol A 78, 215-219 (1994).

[5] Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B. J.Phys.Chem.Ref.Data 24, 663-1036 (1995).

Úkoly

Úkolem je změřit některé fotofyzikální vlastnosti TPPS₄ ve vodném roztoku.

- Připravte 5 mM roztok TPPS₄ a změřte jeho emisní spektra. K excitaci použijte barvivový laser o vlnové délce 413.5 nm (maximum absorpčního pásu TPPS₄ ležící v oblasti UV a viditelného spektra). Na jaké vlnové délce lze pomocí laserem indukované fluorescence zjišťovat přítomnost molekul TPPS₄ v roztoku.
- Změřte změnu absorbance roztoku TPPS₄ v časech 100, 500, 1000 a 2000 ns po laserovém pulsu v oblasti 300 - 550 nm.
- Nalezené absorpční spektra interpretujte - přiřadte jednotlivé pásy T-T přechodům v molekule TPPS₄ ? Vysvětlete, proč v jedné části spektra dochází k poklesu absorbance roztoku po laserovém pulsu. K vysvětlení použijte UV/VIS spektra TPPS₄ .



- Vypočtěte rychlostní konstantu deaktivace a střední dobu života tripletních stavů.
- Z roztoku odstraňte kyslík, změřte časové závislosti absorbance v maximech. Vypočtěte rychlostní konstantu deaktivace tripletního stavu a střední dobu života tripletních stavů t

- Roztok nasýťte kyslíkem, změřte časové závislosti absorbance v maximech. Vypočtěte bimolekulární konstantu pro zhášení tripletních stavů kyslíkem k_{et} ze závislosti rychlostní konstanty deaktivace tripletních stavů na koncentraci kyslíku .
- Naměřené hodnoty porovnejte s literárními údaji ($t = 200\text{-}400 \mu\text{s}$, a $k_{et} > 10^9 \text{ l.mol s}^{-1}$) (literatura [4]). Vysvětlete případné rozdíly.
- Připravte 5 mM roztok TPPS₄ v D₂O a změřte časovou závislost koncentrace singletního kyslíku na čase na základě jeho luminiscence na 1270 nm.
- Vypočtěte dobu života singletního kyslíku a porovnejte ji s literárními údaji (literatura [5]).
- Roztok zbavte kyslíku a proveďte opět detekci singletního kyslíku. Naměřený signál interpretujte.
- **Rozhodněte, zda a proč je TPPS₄ z fotofyzikálního hlediska vhodný pro diagnostiku a fotodynamickou terapii nádorů.**

Modře značené úkoly jsou volitelné.

Po domluvě je možno provést měření i s jiným fotosenzitizerem.