

Svetloba, radikali in fotodinamična terapija

Razširjen povzetek predavanja na simpoziju: Fotobiologija in bolezni ven

Slavko Pečar

1 Svetloba in nastajanje reaktivnih snovi v koži

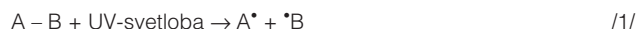
Svetloba je elektromagnetno valovanje, katerega energijo opišemo bodisi z valovno dolžino (λ) ali s frekvenco (ν). Energija (E) fotona svetlobe je opredeljena z enačbo: $E = h\nu$ ali $E = hc/\lambda$, kje je h Planckova konstanta ($6,62 \times 10^{-34}$ Js) in c hitrost svetlobe v vakuumu ($c = 2,997 \times 10^8$ m/s). Fotoni svetlobe ali krajše svetloba se na površini kože lahko odbije, lahko se v koži absorbira ali pa potuje skozi kožo. Kateri dogodek je prevladujoč je odvisno od valovne dolžine (λ) svetlobe in od lastnosti kože. Elektromagnetna valovanja s kratkimi valovnimi dolžinami (fotoni z visoko energijo) prodirajo v in skozi kožo, valovanja z dolgimi valovnimi dolžinami pa se odbijajo in le deloma absorbirajo.

V tem prispevku se bomo omejili le na ozek del spektra elektromagnetnega valovanja: na svetlobo z valovnimi dolžinami med 200 nm in 700 nm. To področje razdelimo na področje ultravijolične (UV) svetlobe (od 200 do 400 nm) in na področje vidne svetlobe (od 400 (vijolična) do 700 (rdeča) nm). Samo UV področje še naprej delimo na UVA (400 – 320 nm), UVB (320 – 280 nm) in UVC področje (280 – 200 nm). Fotoni UVA svetlobe imajo energijo: 71 – 89 kcal/mol, UVB: 89 – 101 kcal/mol in UVC: 101 – 141 kcal/mol. Navedene energije UV svetlobe postanejo pomembne ob dejstvu, da so energetske vrednosti enojnih kovalentnih vezi večine organskih spojin v območju: 70 – 105 kcal/mol. To pomeni, da imajo UV fotoni, še zlasti UVB in UVC, dovolj energije, da prekinjajo kovalentne vezi v molekulah vode, proteinov, lipidov, nukleinskih kislin ali v drugih sestavinah kože. UV svetloba v koži povzroča biokemične poškodbe zaradi nastajanja radikalov in posledično najrazličnejših sekundarnih, vendar še vedno kemično reaktivnih spojin. Poleg takojšnje vnetne reakcije so nadaljnje posledice delovanja UV svetlobe na kožo lahko zelo različne: od pospešenega staranja do mutacij in nastajanja rakavih celic v koži (1).

Fotoni vidne svetlobe imajo manj energije: od 71 kcal/mol (vijolična svetloba) do 40 kcal/mol (rdeča svetloba). Vidna svetloba pri večini organskih spojin ne more neposredno prekiniti enojne vezi, lahko pa po absorpciji povzroča prehod posameznih komponent v koži v različna vzbujena stanja. Lep dokaz za vpliv svetlobe na živo snov je fotosinteza v zelenih rastlinah in proces gledanja pri živalih. V večini primerov absorpcija vidne svetlobe nima škodljivih posledic, ker se večina absorbirane svetlobe pretvori v toplotno energijo. Samo v posebnih pogojih se lahko lahko zgodi, da tudi vidna svetloba lahko povzroča lokalne okvare, kar z uspehom izkoriščajo pri fotodinamični terapiji.

2 Radikali in singletni kisik (2,5)

Homolitska cepitev /1/ kovalentne vezi (skupen elektronski par), ki jo povzroči foton UV svetlobe z ustrezno energijo, vodi v nastanek radikalskega para, od katerih ima vsak fragment po en (nesparjen) elektron.

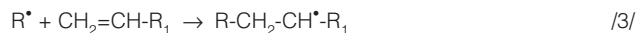


Atomi, ioni, molekule in kompleksi, ki imajo vsaj en nesparjen elektron se imenujejo radikali (angleško: free radical). Stanje snovi z nesparjenim elektronom je neobičajno, kemično reaktivno in zaradi tega kratkoživo. Radikal poskuša manjkajoči elektron pridobiti iz svoje okolice. Omenjena težnja se uresničuje v treh tipih kemičnih reakcij, značilnih za radikale:

1. odvzem vodikovega atoma /2/ neradikalni spojini, ki jo sreča radikal. Pri tem nastane nov radikal. Tovrstne reakcije postopoma pripeljejo do vse stabilnejših radikalov:



2. adicija radikala /3/ na dvojno vez. Tudi pri tej reakciji nastane nov radikal:



3. Srečanje in reagiranje dveh radikalov – obratna reakcija nastajanju radikalskega para - povzroči nastanek neradikalne spojine /4/, ki v večini primerov ni več kemično reaktivna:



Na tem mestu moramo v radikalske reakcije vpeljati še kisik (O_2), ki je sicer normalna sestavina atmosfere in ki se v različnih koncentracijah pojavlja tudi v tkivih. Koža je v primerjavi z drugimi tkivi v nekoliko posebni situaciji, ker je na svoji površini izpostavljena kar atmosferski koncentraciji kisika (21%), ki difundira tudi v globlje plasti kože, v spodnjih plasteh pa je oksigenacija odvisna tudi od prekrvavitve.

V molekuli kisika je energetsko ugodnejša takšna razporeditev elektronov, da sta v molekuli dva nesparjena elektrona (biradikal) s spinom usmerjenim v isto smer. Stanje, kjer sta elektrona v paru pa je energetsko bogatejše. Molekuli kisika z dvema nesparjenima elektronom pravimo tudi tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) za razliko od kisika, ki ima vse elektrone v parih in ga imenujemo singletni ($^1\text{O}_2$) kisik. Singletnega kisika običajno ni, nastaja le v posebnih pogojih in po različnih poteh. Zaradi različne razporeditve in orientacije spinov se $^3\text{O}_2$ in $^1\text{O}_2$ močno

razlikujeta tako v kemični reaktivnosti kot v samih reakcijah v katere sta vpletena.

Pri reakcijah oksidacije se kisik spaja z najrazličnejšimi snovmi. Nastajajo nove kovalentne vezi, ki so pravzaprav novi pari elektronov z nasprotnim spinom. V primeru $^3\text{O}_2$ je nastanek kovalentne vezi povezan z obratom spina elektrona. Ker je ta proces malo verjeten, obrat spina preprečuje (spinska restrikcija), da bi se $^3\text{O}_2$ brez težav spajal z različnimi organskimi spojinami. To je tudi glavni razlog, da kljub relativno visoki koncentraciji kisika v atmosferi, v tej atmosferi živijo bitja sestavljena iz organskih snovi, ki se samo pod določenimi pogoji lahko oksidirajo. V primeru $^1\text{O}_2$ ni spinske restrikcije, ki bi preprečevala $^1\text{O}_2$ spajanje z drugimi snovmi in $^1\text{O}_2$ lahko brez težav reagira z organskimi spojinami.

Tripletni kisik brez ustrezne aktivacije težko reagira z organskimi pojini v singletnem stanju. Čisto drugače je, če se $^3\text{O}_2$ sreča z radikalom. V tem primeru ni spinske restrikcije in reakcija radikala s $^3\text{O}_2$ /5/ je zelo hitra. Ker se $^3\text{O}_2$ obnaša kot biradikal, nastane v smislu reakcije /4/ peroksilni radikal /5/, ki vstopa v nadaljne pretvorbe /6/ in /7/:



Vidimo, da je teoretično dovolj že en sam radikal, da se sproži radikalna reakcija oksidacije. UV fotoni (reakcija /1/) zagotove radikale za sprožitev oksidacije, ki se nadaljuje in širi zaradi biradikalne narave $^3\text{O}_2$. Obseg in vrsta poškodb je odvisna od sposobnosti posameznih plasti kože, kako učinkovito in kako hitro lahko nastale radikale odstrani.

Če omenjeni proces oksidacije poteka v celični membrani, govorimo o lipidni peroksidaciji. Končni produkti lipidne peroksidacije so različni aldehidi in dialdehidi (malon dialdehid), ketoni, alkoholi, alkani, alkeni, epoksidi, itd in posledična sprememba ali porušitev membranske strukture. Za nekatere od teh produktov so ugotovili (nenasičeni aldehidi, malon dialdehid itd.), da so mutageni in tudi kancerogeni.

Pri izpostavljanju kože UV sevanju nastajajo primarni radikali naključno in povsod tam, kjer UV foton homolitsko prekine kovalentno vez. Reakcije oksidacije s $^3\text{O}_2$ lahko potekajo ne samo v membrani, kjer je koncentracija kisika največja, ampak tudi v jedru (poškodbe DNK molekule, mutacije, kancerogenost) ali kjerkoli drugje v celicah kože. Z UV svetlobo povzročeno nastajanje radikalov je v koži uvod v oksidacijo sestavin celic z najrazličnejšimi končnimi razpleti. Premik ravnotežja redoks reakcij v smeri oksidativnih procesov imenujemo oksidativni stres. Oksidativni stres sproži na eni strani bodisi nenadna pojava radikalov (UV obsevanje) ali povečanje koncentracije reaktivnih kisikovih (ROS) oziroma dušikovih (RNS) zvrsti. Med ROS in RNS uvrščajo tako radikale kot spojine, ki so bodisi nastale iz radikalov in so kemično še reaktivne, oziroma pod določenimi pogoji lahko iz njih nastanejo novi radikali. Tipični predstavniki ROS so:

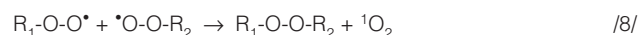
- radikali: superoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil ($\text{HO}^\bullet$), peroksil ($\text{ROO}^\bullet$), hidroperoksil ($\text{HOO}^\bullet$), alkoksil ($\text{RO}^\bullet$);
- neradikalne spojine: vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorid (ClO^-), $^1\text{O}_2$, peroksinitrit (ONOO^-), ozon (O_3), itd.

in RNS:

- radikali: dušikov oksid ($^*\text{NO}$), dušikov dioksid ($^*\text{NO}_2$)
- neradikalne spojine: peroksinitrit (ONOO^-), didušikov trioksid (N_2O_3), didušikov tetraoksid (N_2O_4), nitrozil kation (ON^+), nitrozil anion (ON^-), itd.

Do oksidativnega stresa pride tudi, če se zmanjša celična zaščita, ki sloni na antioksidantih (2,6). Ti po različnih mehanizmi in na različnih ravneh preprečujejo oksidativni stres oziroma skrbijo, da ostaja koncentracija posameznih predstavnikov ROS in RNS na obvladljivi ravni. V primeru obsevanja kože z UV svetlobo nastali radikali sprožijo oksidativni stres, ki je intenzivnejši ter obsežnejši tudi zaradi neposrednih in škodljivih vplivov UV svetlobe na encime, ki so nosilci antioksidativnega delovanja v celici.

Ko je proces lipidne peroksidacije v razmahu (verižna radikalna reakcija) začne kemično nastajati še $^1\text{O}_2$ predvsem v reakciji med dvema peroksilnima radikaloma:



Neugodna situacija (radikalno sprožene oksidacije) se s pojavom $^1\text{O}_2$ še poslabša. Nastali $^1\text{O}_2$ ne potrebuje več »radikalne« aktivacije ampak oksidira celične sestavine v svoji neposredni okolici po neradikalnih poteh. Primarno nastajajo hidroperoksidi in ciklični endoperoksidi (Slika 1). Oboji se lahko ob prisotnosti ionov železa ali bakra (Fe^{2+} , Cu^+) pretvorijo v hidroksilne in alkoksilne radikale, ki sprožijo nov val oksidacij s $^3\text{O}_2$.



Slika 1. Oksidacija s $^1\text{O}_2$ do cikličnega endoperoksida (A) in hidroperoksida (B)

Vsako nenadzorovano nastajanje radikalov v koži, ki preseže celično antioksidativno kapaciteto, pahne celico v oksidativni stres, kjer potekajo najprej radikalne reakcije s $^3\text{O}_2$, v kasnejši fazi pa se v oksidacije vmeša tudi $^1\text{O}_2$. Od množine absorbirane UV svetlobe je odvisno, kakšen obseg biokemičnih poškodb bo UV svetloba povzročila. Koža je v evolucijskem razvoju razvila mnoge obrambne sisteme (pigmentacija, antioksidanti) pred UV sevanjem in čeprav človeštvo proizvaja zaščitne pripravke, ki UV svetlobi preprečijo prodor v živa področja kože, se ljudje še premalo zavedamo vseh nevarnosti pri izpostavljanju kože UV sevanjem.

3 Fotodinamična terapija (7, 8)

Singletni kisik nastaja v celici po različnih poteh. Poleg nastajanja iz peroksilnih radikalov /8/ je pomembno še fotokemično nastajanje, kjer se v proces vključi posrednik: fotosenzibilizator. Vidna svetloba (400 do 700 nm) lahko po absorpciji v snovi povzroča prehod molekul v različna vzbujena stanja. Ponavadi se iz vzbujenega stanja molekula vrne v osnovno stanje z izsevanjem fotona svetlobe (fluorescenca) ali pa se energija vzbujenega stanja pretvori v toploto. V nekaterih posebnih primerih se energije vzbujenega stanja lahko uporabi za obrat enega izmed spinov elektronov. Slednje se v različnem obsegu dogaja pri spojinah, ki jih imenujemo fotosenzibilizatorji. Iz osnovnega

singletnega stanja molekula fotosenzibilizatorja po absorpciji vidne svetlobe preide v vzbujeno stanje, to stanje pa lahko preide v osnovno tripletno stanje, ki je stabilnejše in se počasneje vrača (fosforescenca) nazaj. Obstaja pa še možnost, da fotosenzibilizator v tripletnem stanju izmenja usmeritve spinov z okolišnim $^3\text{O}_2$ pri čemer nastane $^1\text{O}_2$ in molekula fotosenzibilizatorja v osnovnem singletnem stanju (Shema 1). Fotokemično nastajanje $^1\text{O}_2$ si predstavljamo kot proces, ki poteka v treh stopnjah:

1. fotoekscitacija B $B(\uparrow\downarrow) + h\nu \leftrightarrow B'(\uparrow\downarrow)$
2. prehod B v tripletno stanje $B'(\uparrow\downarrow) \rightarrow B'(\uparrow\uparrow)$
3. rakcija s $^3\text{O}_2$ $B'(\uparrow\uparrow) + ^3\text{O}_2(\downarrow\downarrow) \rightarrow B(\uparrow\downarrow) + ^1\text{O}_2(\downarrow\uparrow)$

Shema 1. Fotokemično nastajanje singletnega kisika ($^1\text{O}_2$), kjer je B fotosenzibilizator, B* vzbujeno stanje fotosenzibilizatorja, $\uparrow\downarrow$ je singletno stanje, in $\uparrow\uparrow$ tripletno stanje.

Vidna svetloba lahko ob posredovanju molekule fotosenzibilizatorja preskrbi dovolj energije (22,5 kcal/mol), ki je potrebna za obrat spina elektrona tripletnega kisika in prehod v singletno stanje, ki je pri kisiku (izjema) energetsko višje kot tripletno stanje. Če v topilu raztopimo fotosenzibilizator in tako raztopino obsevamo z vidno svetlobo, potem bo v raztopini fotokemično nastajal $^1\text{O}_2$. Ugotovili so, da v tkivu molekula $^1\text{O}_2$ zaradi velike reaktivnosti zreagira z okolišnimi organskimi snovmi v kroglici s polmerom 0,1 mm od mesta svojega nastanka. Fotokemično nastajanje $^1\text{O}_2$ in njegova velika kemična reaktivnost sta osnova za fotodinamično terapijo, ki izkorišča možnost lokaliziranega nastajanja $^1\text{O}_2$ za doseganje terapevtskega učinka. Nastali $^1\text{O}_2$ namreč poškoduje samo molekule v neposredni bližini svojega nastanka, kar pomeni, da lahko z usmerjenim obsevanjem pričakujemo zelo lokalizirane učinke.

Znani so številni fotosenzibilizatorji za lokalno ali sistemsko aplikacijo. Po aplikaciji fotosenzibilizatorja z lokaliziranim obsevanjem z ozkimi snopi koherentne (laserske) ali nekoherentne svetlobe dosežemo nastajanje $^1\text{O}_2$ samo v tanki plasti področja obsevanja in s tem zelo lokalizirane učinke. Današnja fotodinamična terapija je primerna za posege na koži in sluznicah povsod tam, kjer je možna osvetlitev z žarki svetlobe iz vidnega področja spektra. Pogoj za uspešnost fotodinamične terapije je zadostna prisotnost $^3\text{O}_2$ v tkivu. Uspeh je nadalje odvisen od uporabljenega fotosenzibilizatorja in od svetlobnega vira. Fotosenzibilizator mora biti farmakološko inertna spojina z uestezno farmakokinetiko, porazdeljevanjem po tarčnih tkivih in s primerno visokim izkoristkom tvorbe $^1\text{O}_2$. Zelo pomembna lastnost fotosenzibilizatorja je, da absorbira svetlobo v področju valovnih dolžin, ki jih tkivo ne absorbira. Temu morajo biti prilagojeni tudi viri svetlobe

tako po valovni dolžini, kot po možnosti obsevanja samo določenih predelov kože ali sluznice. Največ se uporabljajo laserski viri koherentne svetlobe z valovno dolžino iz vidnega območja (valovne dolžine nad 600 nm) in z močjo od 1 do 4 W. Taka svetloba prodira v tkivo nekaj mm globoko in pozroča nastajanje $^1\text{O}_2$.

V uporabi je več fotosenzibilizatorjev, razvijajo pa številne nove z boljšimi lastnostmi. Najpogostejši so derivati porfirina. Uporabljajo pa tudi 5-aminolevulinsko kislino, ki sama sicer ni fotosenzibilizator, vendar celica lahko iz nje sintetizira protoporfirin IX (Slika 2), ki po osvetlitvi pretvarja $^3\text{O}_2$ v $^1\text{O}_2$. Trenutno se s fotodinamično terapijo zdravijo vsa tista lokalizirana rakava in druga obolenja kože ter sluznic, ki jih lahko dosežemo z sistemi za obsevanje z vidno svetlobo. Izkorišča se tudi protibakterijski učinek $^1\text{O}_2$, še zlasti v dentalni medicini.

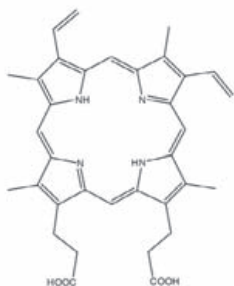
4 Zaključek

UV in vidna svetloba povzročata v koži različne učinke. UV svetloba je energetsko dovolj bogata, da povzroči nastanek radikalov na posameznih sestavinah celic kože. Primarni radikali sprožijo oksidativne procese in s tem pojav oksidativnega stresa, ki v koži v procesih lipidne peroksidacije, poškodbe proteinov in nukleinskih kislin vodi bodisi v pospešeno staranje, v degenerativne spremembe, v nastanek raka ali neposredno v celično smrt. Od količine absorbirane UV svetlobe ter od zaščitne kapacitete kože (antioksidanti) je odvisno, kakšen bo razplet dogodkov po obsevanju.

Vidna svetloba neposredno ne more povzročiti nastajanje radikalov, lahko pa preko vzbujenih stanj fotosenzibilizatorjev povzroča nastajanje singletnega kisika v obsevanem tkivu. Singletni kisik kot zelo reaktiven oksidant prav tako povzroča prostorsko omejene oksidativne poškodbe in smrt celice. Z uporabo primernih fotosenzibilizatorjev in sistema za lokalizirano obsevanje dosežemo, da singletni kisik nastaja samo v področju, kjer želimo doseči terapevtski učinek. V tem primeru omenjeno lokalizirano nastajanje izrabljamo za fotodinamično terapijo, ki je uporabna pri obravnavi površinskih patoloških sprememb na dostopni površini kože ali sluznic.

5 Literatura

1. Fossel M. B.: *Cells, Aging, and Human Disease*, Oxford University Press, 2004, 140-160 (The Skin);
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Ed. Oxford, 2007.
3. Pečar S.: *Radikali v našem okolju*, Kemija v šoli: (2006), 18(2), 1-5;
4. Pečar S.: *Radikali v našem življenju*, Kemija v šoli: (2006), 18(3), 13-19;
5. Byrne-Habič B., Mravljak J., Pečar S.: *Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost*
6. Jurkovič P., Šentjerc M., Gašperlin M., Kristl J., Pečar S.: *Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions*, Eur. J. Pharm & Biopharm: (2003), 56, 59-66; *in nastajanje NO v organizmu.*, Farm Vest. (2004), 55, 469-478;
7. Bonnett R.: *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Brech Science Publishers, Amsterdam 2000;
8. Japelj B., Pečar S.: *Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja*, Farm Vest (2006), 57, 131-139.



Slika 2. Struktura fotosenzibilizatorja protoporfirina IX