

Role singletního kyslíku ve fotosyntéze a ve fotodynamické terapii

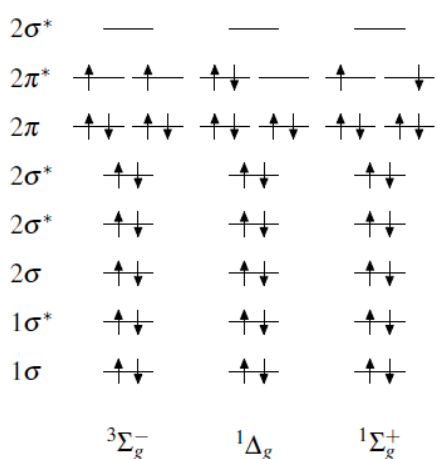
Šárka Gregorová, 2013

Singletní kyslík

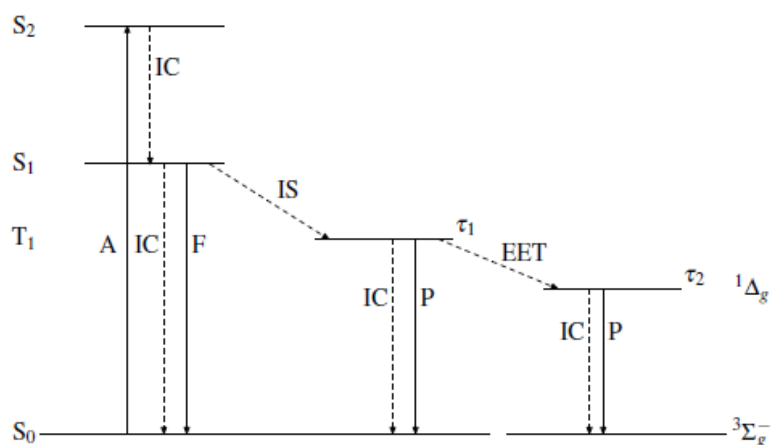
Kyslík má v základním stavu dva nespárované elektrony, jeho celkový spin je tedy roven jedné – jedná se o **tripletní** stav a vykazuje paramagnetické chování. Další dva nejnižší excitované stavy jsou **singletní**. Umístění elektronů v orbitalech v základním stavu a ve dvou nejnižších excitovaných stavech je zobrazeno na obrázku 1 (z návodu na praktikum Měření emise fotogenerovaného singletního kyslíku u Dědice).

Naopak většina molekul je v základním stavu singletní. Jsou-li takové molekuly excitovány do vyššího singletního stavu, mohou díky spin-orbitální interakci mezisystémovou konverzí zrelaxovat do tripletního stavu (viz obrázek 2), a v tomto stavu jsou relativně stabilní (přibližně 10^{-6} s), neboť přechod z tripletního stavu do základního singletního stavu je spinově zakázaný. Interaguje-li taková molekula s kyslíkem, může s vysokou pravděpodobností dojít k spinově povolené **triplet-tripletní anihilaci**, kyslík se tak dostane do excitovaného singletního stavu a molekula do základního singletního stavu.

Singletní kyslík je zhruba tisíckrát reaktivnější než kyslík v základním stavu. Vyskytne-li se singletní kyslík v živé buňce, napadá její důležité organické molekuly (lipidové membrány, DNA...). To může vést k buněčné smrti – **apoptóze** (programovaná buněčná smrt, kdy buňka umírá tak, aby co nejméně poškodila organismus) či **nekróze** (neprogramovaná smrt, dochází k zánětu a šíření do další tkáně), v živém organismu se tedy jedná o jev negativní, hrozící zejména je-li v přítomnosti kyslíku a zároveň zdroje excitace, tedy zejména při **oxygenní fotosyntéze**. Naopak s výhodou lze tohoto jevu využít pro tzv. **fotodynamickou terapii**.



Obrázek 1: Obsazení molekulových orbitalů základního (tripletního) stavu a dvou nejnižších (singletních) stavů molekuly kyslíku



Obrázek 2: Jablonskiho diagram fotosenzibilizátoru (vlevo) a singletního kyslíku (vpravo): A, IC a F jsou absorpce, vnitřní konverze a fluorescence fotosenzibilizátoru, IS a P jsou mezisystémová konverze a fosforescence fotosenzibilizátoru resp. singletního kyslíku, EET je přenos energie na kyslík

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie je diagnostická a léčebná metoda založená na vzniku singletního kyslíku v poškozené tkáni přenosem energie z tzv. **fotosenzibilizátoru**, tedy látky excitované světlem. Využívá se k léčbě určitých typů nádorů zejména kůže, dále k léčbě lupénky a v estetické medicíně k vyhlazování jizev například po akné.

Fotosenzibilizátor se pacientovi podá injekcí buď do žíly nebo přímo do postižené tkáně, případně je postižené místo potřeno mastí obsahující fotosenzibilizátor. Po určitém čase, závislém na typu fotosenzibilizátoru, způsobu podání a typu postižení, se fotosenzibilizátor zakoncentruje v postižených buňkách.

Pro **diagnostické účely** jsou postižená místa osvětlena UV lampou a je možné pozorovat fluorescenci fotosenzibilizátorů a velmi přesně tak určit hranice postižené a zdravé tkáně, viz obrázek 3. Pro **léčebné účely** jsou postižená místa ozářena laserem o výkonu zhruba 100 až 600 mW/cm² a vlnové délce na níž fotosenzibilizátor absorbuje. Molekuly fotosenzibilizátoru se tak excitují a postupem popsaným výše vzniká singletní kyslík, dochází k apoptóze či nekróze buněk v závislosti na koncentraci fotosenzibilizátoru a typu nádoru. Po aplikaci fotosenzibilizátoru je pacient zpravidla několik hodin až dní fotocitlivý, neměl by se vystavovat silnému světlu. Jinak zpravidla nemá fotodynamická terapie žádné vedlejší účinky.

Nejčastěji jsou fotosenzibilizátory látky odvozené od **chlorofylů, bakteriochlorofylů a porfyrinů**. Dále je používána například kyselina **δ-aminolevulová (ALA)**, prekurzor biosyntézy porfyrinů. Obecně by fotosenzibilizátory měly být stabilní netoxické látky, které by se měly hromadit v postižených buňkách a nikoliv ve zdravých. V případě nádorů se využívá toho, že se jedná o nejrychleji rostoucí tkáň v těle, fotosenzibilizátor se tedy dostává i do zdravých buněk, ale v mnohem nižší koncentraci.

Tripletní stav fotosenzibilizátorů musí mít dostatečnou energii, aby dokázal vytvořit singletní kyslík, zároveň ale světlo o delší vlnové délce lépe proniká do tkáně, nejčastěji používané excitační lasery tak emitují na hranici červeného a IČ záření, které se dostane přibližně 1 cm do tkáně.

Fotodynamickou terapii lze využít všude tam, kam lze dostat světlo z excitačního laseru optickým vláknem, tedy například v plicích, žaludku, střevech apod., ovšem nejčastěji se využívá v léčbě kožních nádorů, zejména basaliomu (nejčastější typ rakoviny kůže, vyskytuje se zejména na hlavě a krku, protože souvisí s vystavením slunečnímu záření. Tento nádor sice sice nemetastázuje, ale může infiltrovat do okolních tkání).

Singletní kyslík ve fotosyntéze

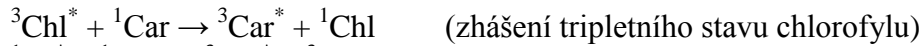
Ve fotosyntéze je výskyt singletního kyslíku negativní, neboť napadá molekulární aparát buňky. Zároveň je pravděpodobnost jeho výskytu zvýšena tím, že fotosyntetický aparát přijímá velké množství světelné energie. Pokud tato energie není dostatečně rychle zpracována odvedením do reakčního centra a přeměnou na chemickou energii, může dojít buď k fluorescenční nebo termální ztrátě této energie, ale též k mezisystémové konverzi za vzniku tripletního stavu pigmentu, zejména chlorofylu, který triplet-tripletní anihilací s kyslíkem vytváří singletní kyslík.



Fotosyntetický organismus tedy musí regulovat, kolik světla bude absorbovat, například pomocí tvorby nebo degradace přídavných světlosběrných antén. Nemělo by ho být ani příliš

málo (protože pak získá málo energie), ale ani moc, protože pak hrozí jeho oxidativní poškození.

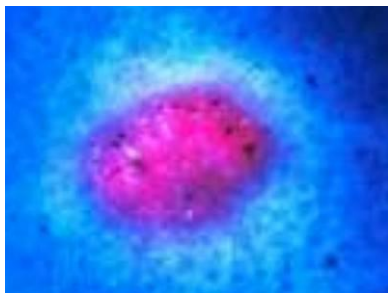
Ochrannou roli ve fotosyntetickém aparátu mají karotenoidy – zháší tripletní stav chlorofylu a singletní stav kyslíku.



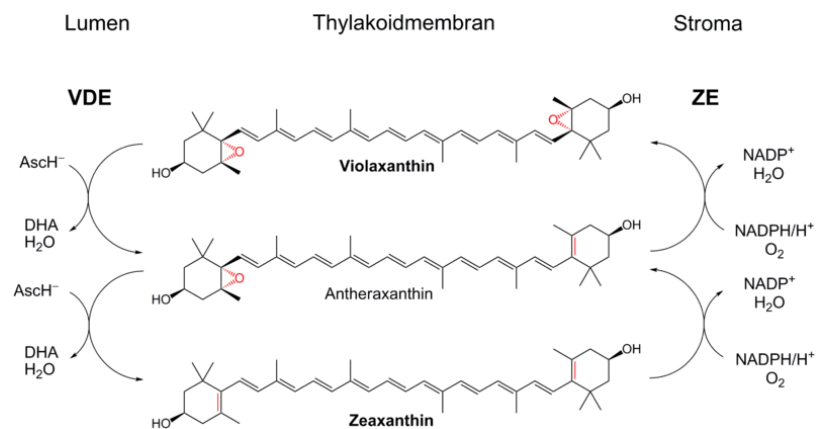
Tripletní karotenoid má příliš málo energie na tvorbu singletního kyslíku a do základního stavu přejde za vzniku tepla.

Nejvíce je oxidativnímu stresu vystaven **fotosystém 2 oxgyenních organismů**, neboť obsahuje *oxygen evolving complex* (OEC), který oxiduje vodu za vzniku O₂. Nejen, že je tedy v jeho blízkosti vyvíjen kyslík, ale aby mohl oxidovat vodu, musí být chlorofyl speciálního dimeru fotosystému 2 velmi silným oxidačním činidlem. Jako takový nemůže být dobře chráněn před singletním kyslíkem karotenoidy, protože by je rychle oxidoval. Protein D₁, tedy ta část heterodimeru D₁ D₂ reakčního centra fotosystému 2 eukaryot a sinic, po níž s větší pravděpodobností běží reakce, musí být zhruba každou půlhodinu degradován a nahrazen novým.

Zhášení přebytečné excitační energie se nazývá **nefotochemické zhášení** (*non-photochemical quenching*, NPQ, tedy zhášení vším ostatním než fotochemií = separací náboje). Ve fotosystému 2 se ho účastní protein PsbS, který provádí tzv. **xantofylový cyklus**. Je-li hodně světla, je karotenoid violaxanthin zbaven epoxidové vazby za vzniku antheraxanthinu a ten je dále deepoxidován na zeaxanthin, viz obrázek 4. Přesný mechanismus zhášení pomocí této reakce ale není znám.



Obrázek 3: Nádor po ozáření UV světlem růžově fluoreskuje



Obrázek 4: Xantofylový cyklus při nefotochemickém zhášení ve fotosystému 2.

Zdroj: Návod k praktiku Měření emise fotogenerovaného singletního kyslíku (R. Dědic), prezentace k přednášce Fotosyntéza (J. Pšenčík), Internet