



Życiodajny i Zabójczy Tlen oraz promieniowanie synchrotronowe

doc. dr hab. Wojciech M. Kwiatek

Instytut Fizyki Jądrowej
im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk



Plan

- Tlen – pierwiastek życia.
- Tlen – pierwiastek chorób i śmierci.
- Dlaczego tlen jest toksyczny?
- Reakcja Fentona.
 - Żelazo wskaźnikiem obecności tlenu.
- SRIXE – oznaczanie stężenia Fe
- XANES – oznaczanie Fe^{+3} , Fe^{+2}



Tlen – pierwiastek życia.

- Masa tlenu stanowi około:
- 75 % masy Ziemi
- 54 % skorupy Ziemi
- 89 % masy wody
- 75 % masy człowieka
- Objętość tlenu stanowi około 21 % powietrza
- Joseph Priestley
1.08.1774 rozkład
tlenku rtęci – tlen
- przyjemne oddychanie
- oddech – 100 ml tlenu,
1,6 dm³ tlenu/min
- głęboki wdech – 740
ml tlenu



Tlen – pierwiastek życia.

- Tlen rozpuszczony w wodzie umożliwia życie wielu gatunkom organizmów żyjących w środowiskach wodnych
 - w stanie równowagi gazowej w temperaturze 10 °C stężenie wynosi 0,284 mmol/dm³
 - w wodzie destylowanej 0,355 mmol/dm³
- Tlen jest 7 – 8 razy lepiej rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych niż w wodzie
 - istotne znaczenie dla błon biologicznych, których lipidowe wnętrze przypomina właściwościami r.o.

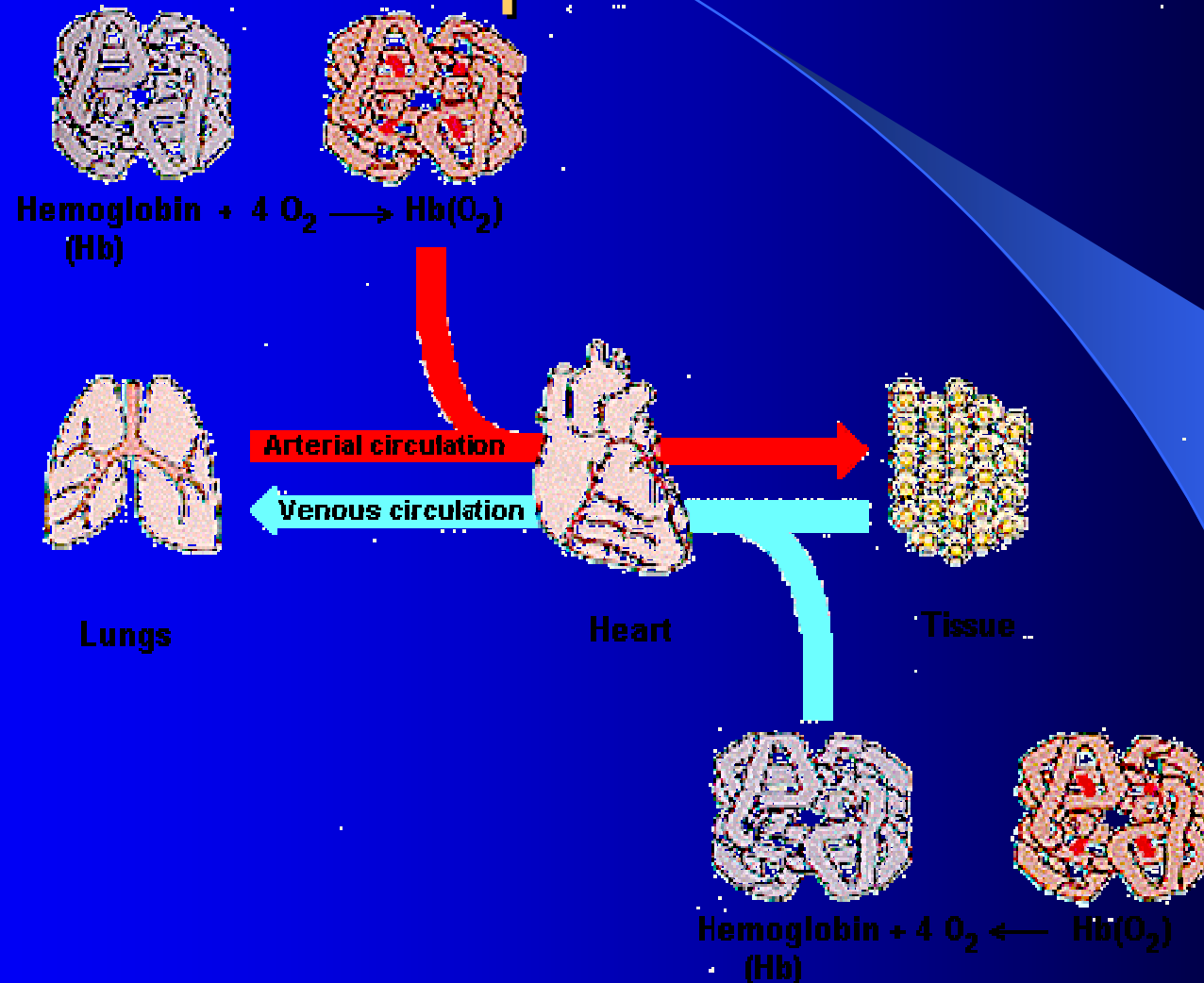


Tlen – pierwiastek życia.

- Bez pożywienia człowiek może przeżyć kilka tygodni.
- Bez przyjmowania płynów i pożywienia człowiek może przeżyć kilka dni.
- **Bez tlenu człowiek może przeżyć zaledwie kilka minut !!!**

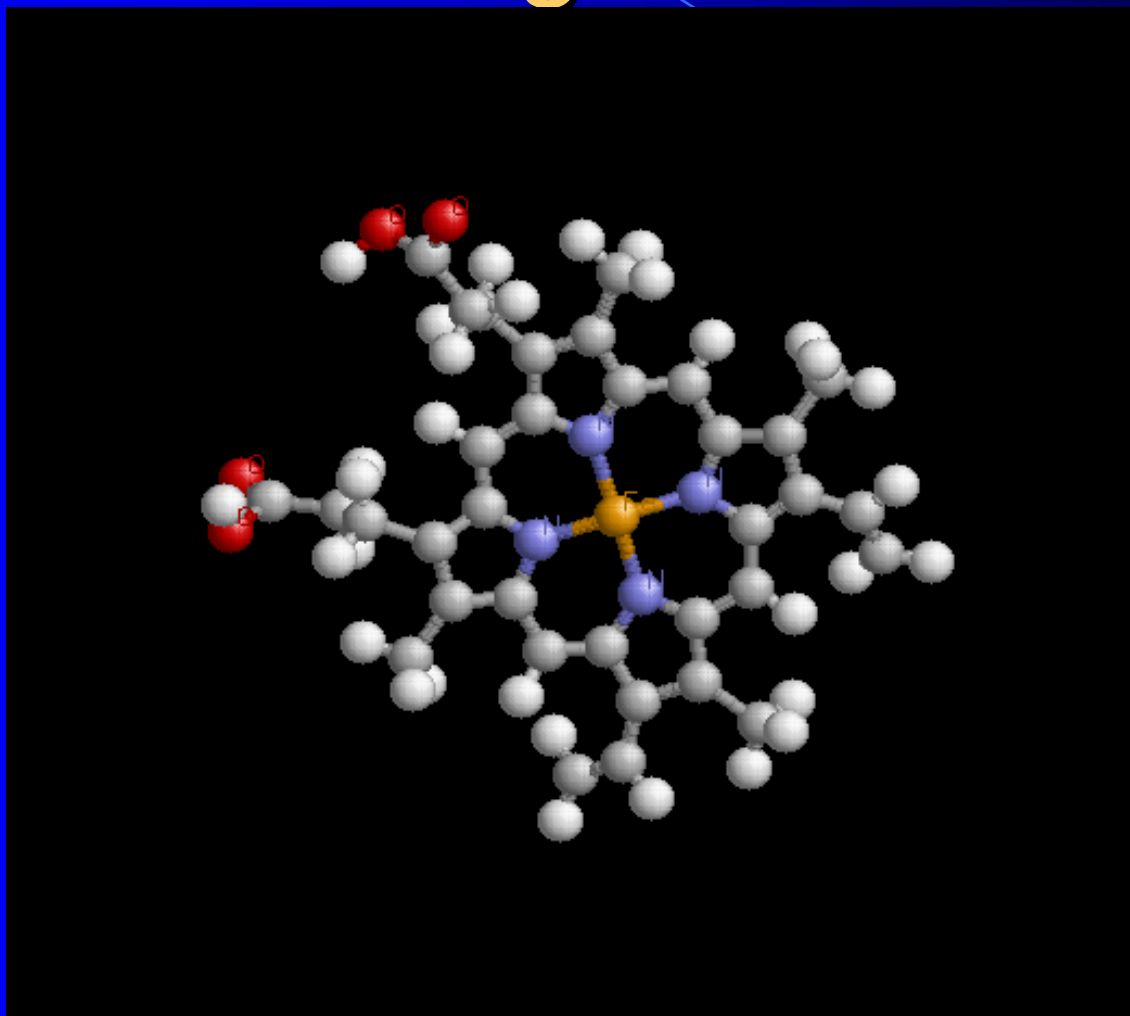


Transport tleny





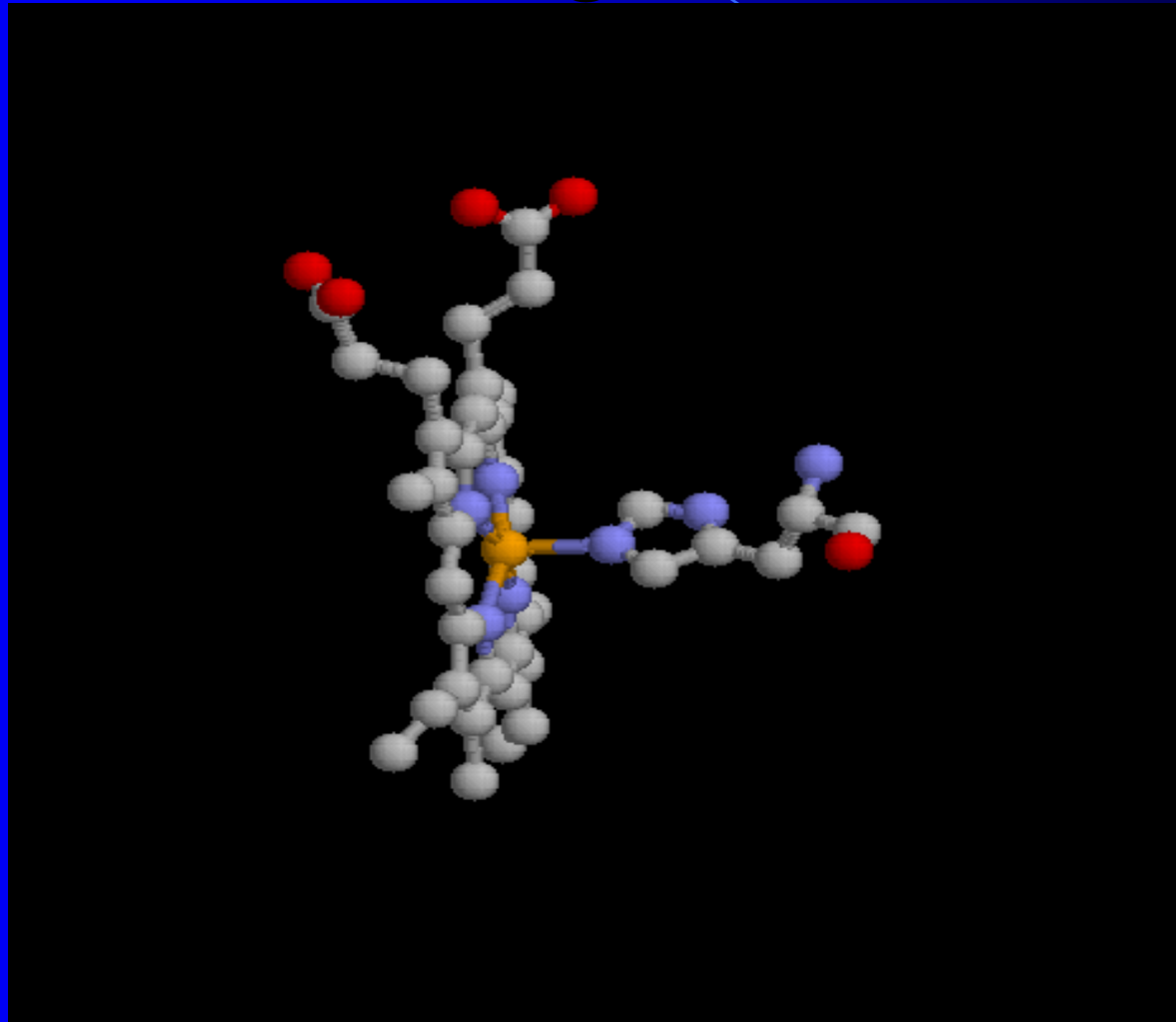
Hemoglobina



WMK



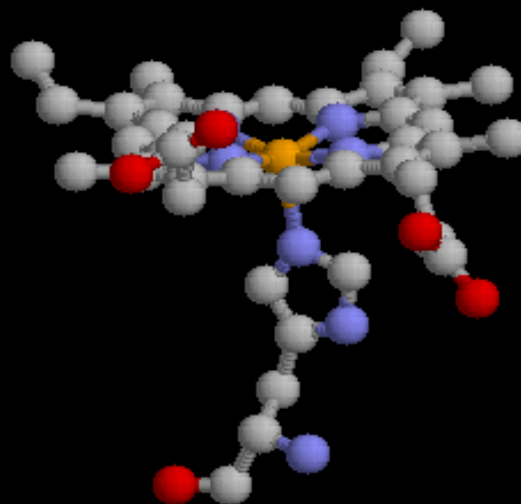
Hemoglobina



WMK



Hemoglobina



WMK



Tlen – pierwiastek chorób i śmierci. Rośliny

- Podwyższone stężenie tlenu w powietrzu:
 - hamuje rozwój chloroplastów u roślin,
 - zmniejsza żywotność nasion i rozwój korzeni
 - stymuluje opadanie liści
- Bakterie beztlenowe np. laseczka tężca (*Clostridium tetani*) - giną w obecności tlenu.



Tlen – pierwiastek chorób i śmierci. Człowiek

- Człowiek oddychając czystym tlenem:
 - po 6 godz. zaburzenia dróg oddechowych,
 - po 24 – 48 godz. uszkodzenie i obrzęk pęcherzyków płucnych prowadzące do ich zwłóknienia
- Nagłe narażenie na wysokie ciśnienia tlenu
 - trwałe uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego.



Tlen – pierwiastek chorób i śmierci. Człowiek

- Kontakt noworodka w inkubatorze przez 10 dni z atmosferą zawierającą 35 – 40 % tlenu prowadzi do zwłóknienia pozasoczewkowego.
 - (zweżenie naczyń krwionośnych doprowadzających krew do siatkówki, ich obumieranie, wykształcenie nowych naczyń, które wrastają w ciało szkliste oka – oderwanie siatkówki)

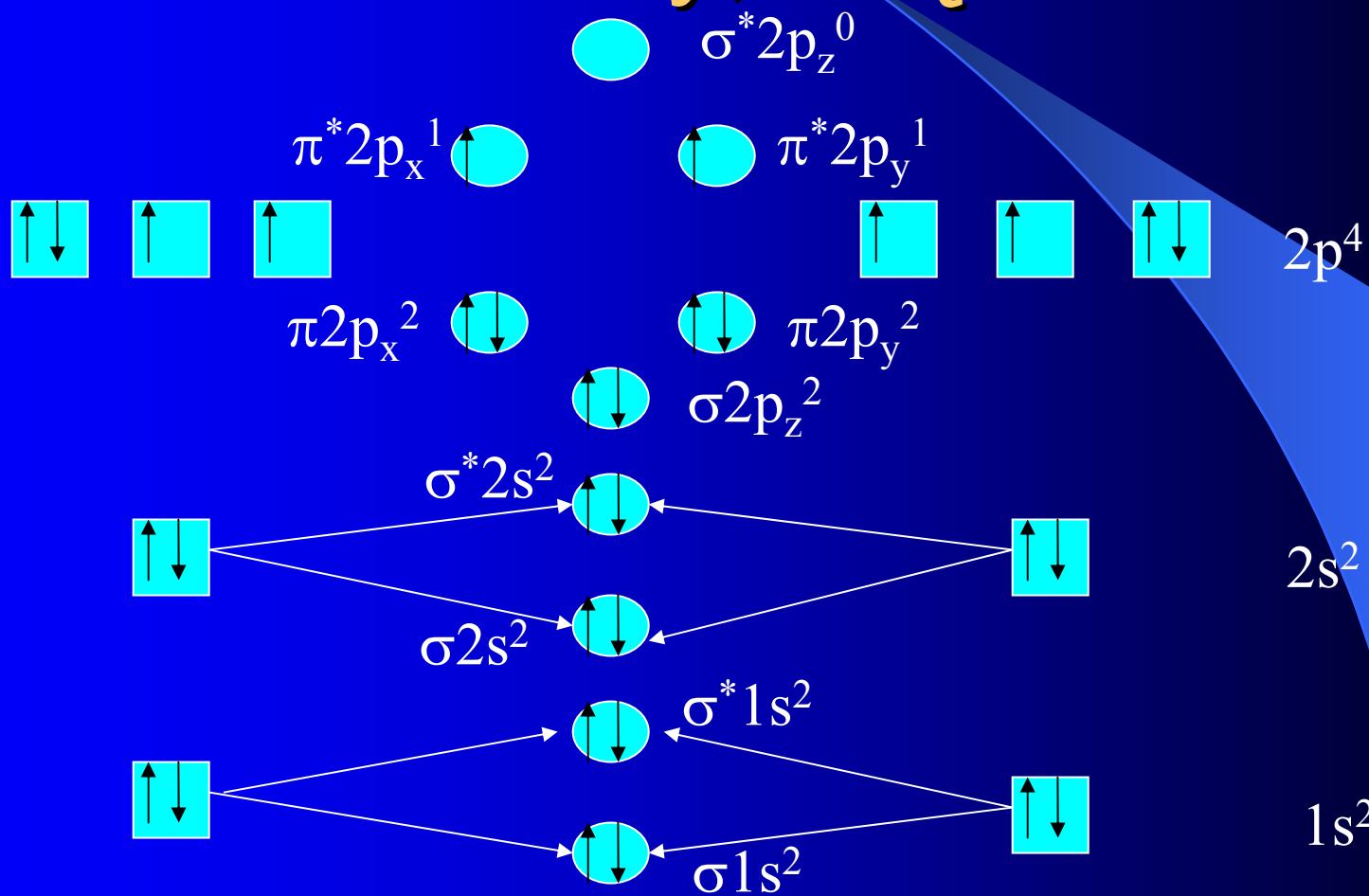


Dlaczego tlen jest toksyczny?

- W komórkach powstają Reaktywne Formy Tlenu i to one są odpowiedzialne za jego toksyczność.



Tlen – pierwiastek chemiczny, cząsteczka





Tlen cząsteczkowy – trzy różne formy

liczba kwantowa całkowitego spinu cząsteczki $S = \sum s_i$

natomiast liczba stanów energetycznych wynosi $2S+1$

Tlen singletowy  π^*2p  $S = \frac{1}{2} + (-\frac{1}{2}) = 0$; czyli $2S+1 = 1$

Tlen singletowy  π^*2p  $S = \frac{1}{2} + (-\frac{1}{2}) = 0$; czyli $2S+1 = 1$

Tlen trypletowy  π^*2p  $S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$; czyli $2S+1 = 3$
 p_x p_y



Wolne rodniki

Wolny rodnik – atom (cząsteczka) zdolny do samodzielnego istnienia mający jeden lub więcej niesparowanych elektronów (na orbicie walencyjnej).

Cząsteczka tlenu ma dwa niesparowane elektrony –
birodnik (dwurodnik)!



Wolne rodniki.

- Dążą do sparowania elektronów
 - Pozbycie się nadmiarowego elektronu lub przyłączenie elektronu od innej cząsteczki
- $\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{*-}$ anionorodnik ponadtlenkowy
- $\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \text{H}^* + \text{OH}^*$ rodnik wodorotlenowy
- $\text{O}_2^{*-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2^*$ rodnik wodoronadtlenkowy

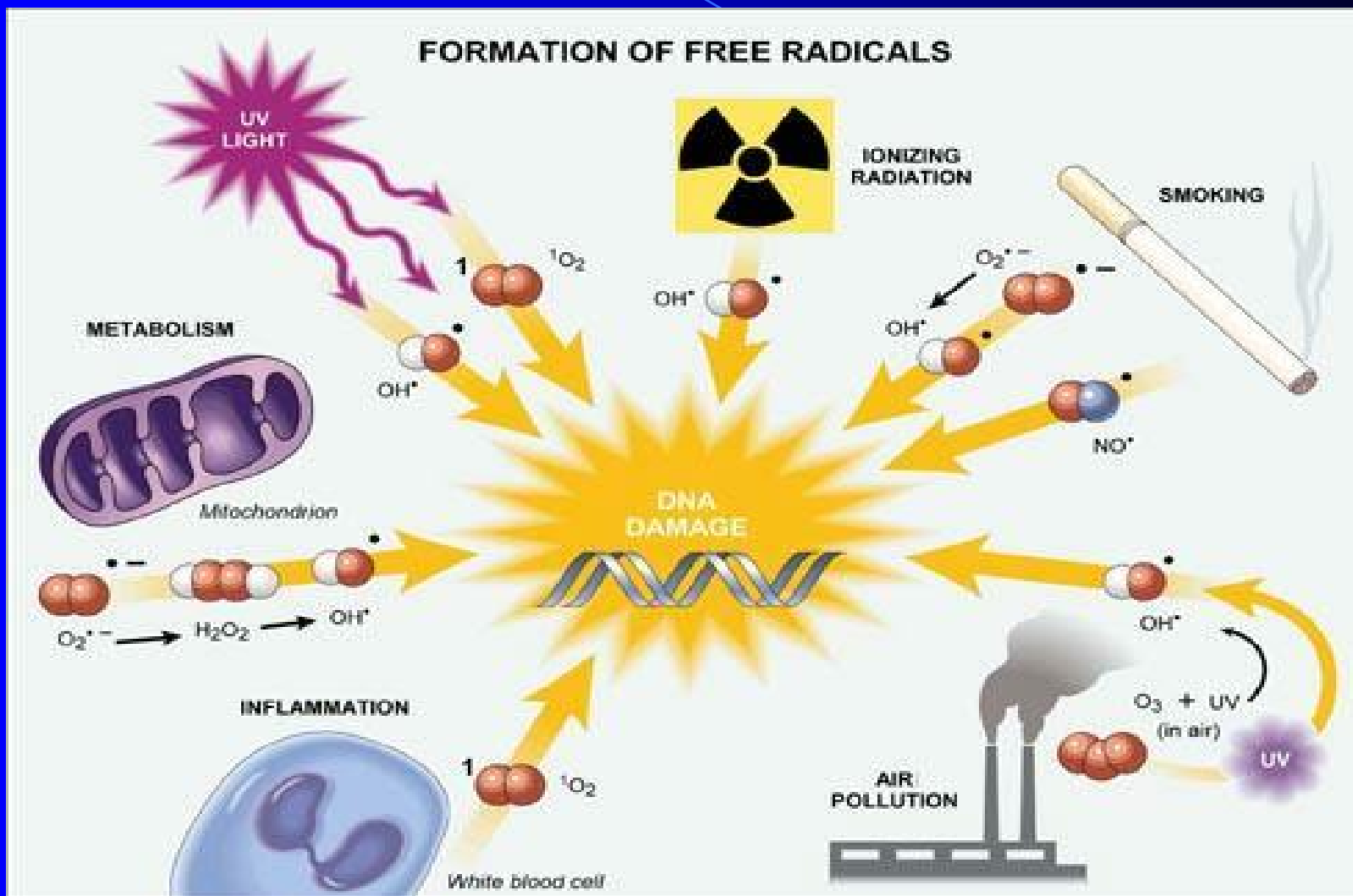


Inne aktywne cząsteczki

- $\text{O}_2 + 2\text{e} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \leftarrow \text{O}_2^{*-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+$
 - H_2O_2 Nadtlenek wodoru
- Alotropowa odmiana tlenu- ozon O_3
- Kompleksy tlenu i żelaza $\text{Fe} = \text{O}^{2+}, \text{Fe} = \text{O}^{3+}$



Czynniki ryzyka





Reaktywne Formy Tlenu (RTF).

- Produkty redukcji i wzbudzenia tlenu są bardziej reaktywne (aktywne) niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym, trypletowym. $\Rightarrow$ Reaktywne Formy Tlenu
- $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ Uszkodzenia komórek



Efekty działania RFT na komórki i ich składniki

- Utlenienie hemoglobiny
- Uszkodzenia chromosomów
- Uszkodzenia nici DNA
- Powstawanie mutacji
- Zaburzenia struktury cytoszkieletu
- Transformacja nowotworowa



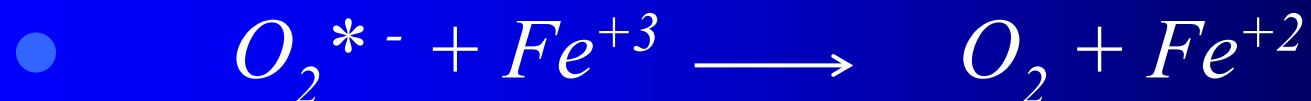
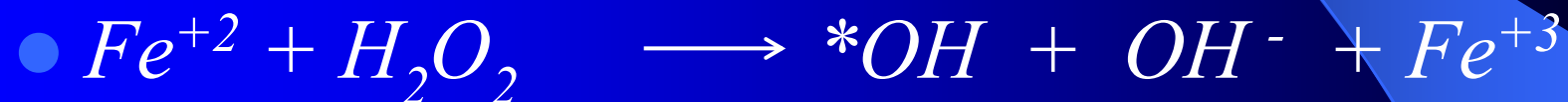
RFT a choroby (niektóre)

- Zapalenia
- Reumatoidalne zapalenie stawów
- Miażdżyca
- Cukrzyca
- Choroby ośrodkowego układu nerwowego
- Choroby układu oddechowego
- Choroby krwinek czerwonych
- AIDS
- Grypa
- Nowotwory

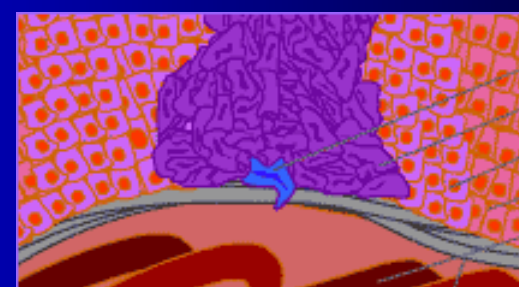
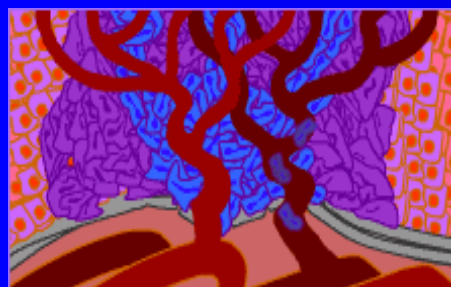
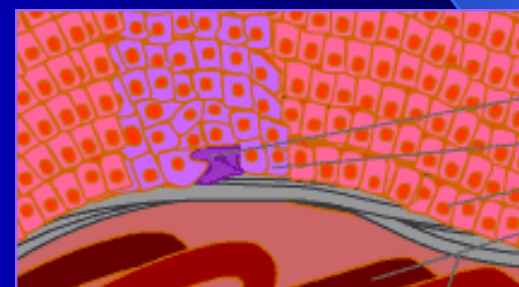
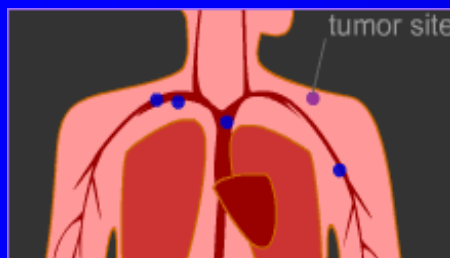
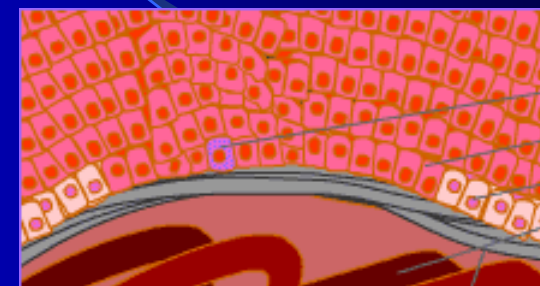
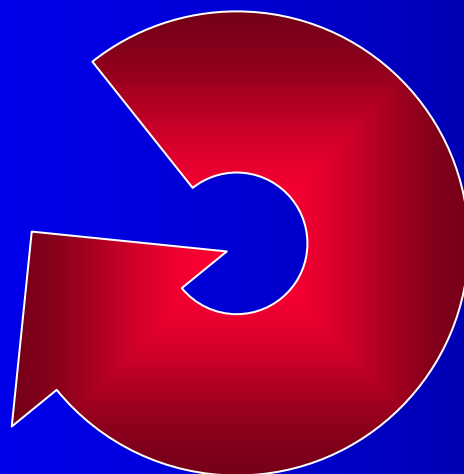
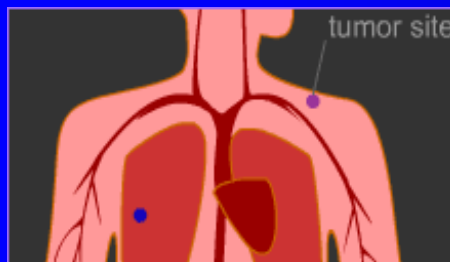
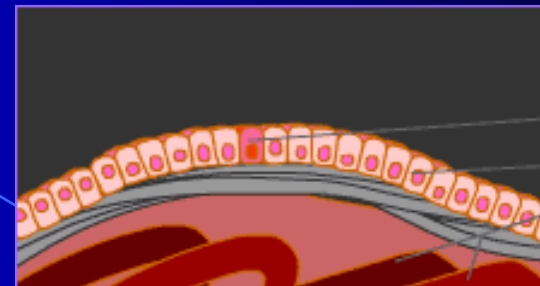
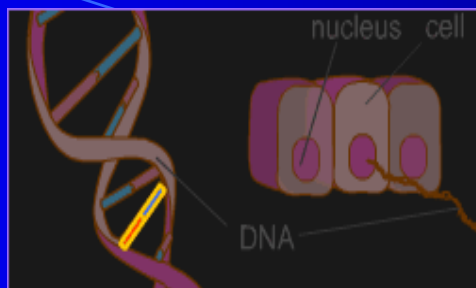
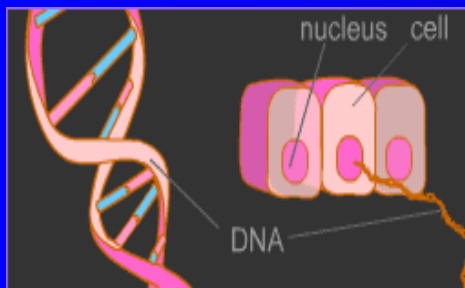


Reakcja Fentona.

- Reakcja składa się z dwóch cykli



Powstawanie raka





Material

- Rak prostaty PCa (Prostate Cancer)
- Prostatectomia
- Skrawki tkanek (14 μm)
- Stan patologiczny (TNM)
- Stopień Gleason'a (6-8)
- SRIXE – Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission
- XANES – X-ray Absorption Near Edge Structure



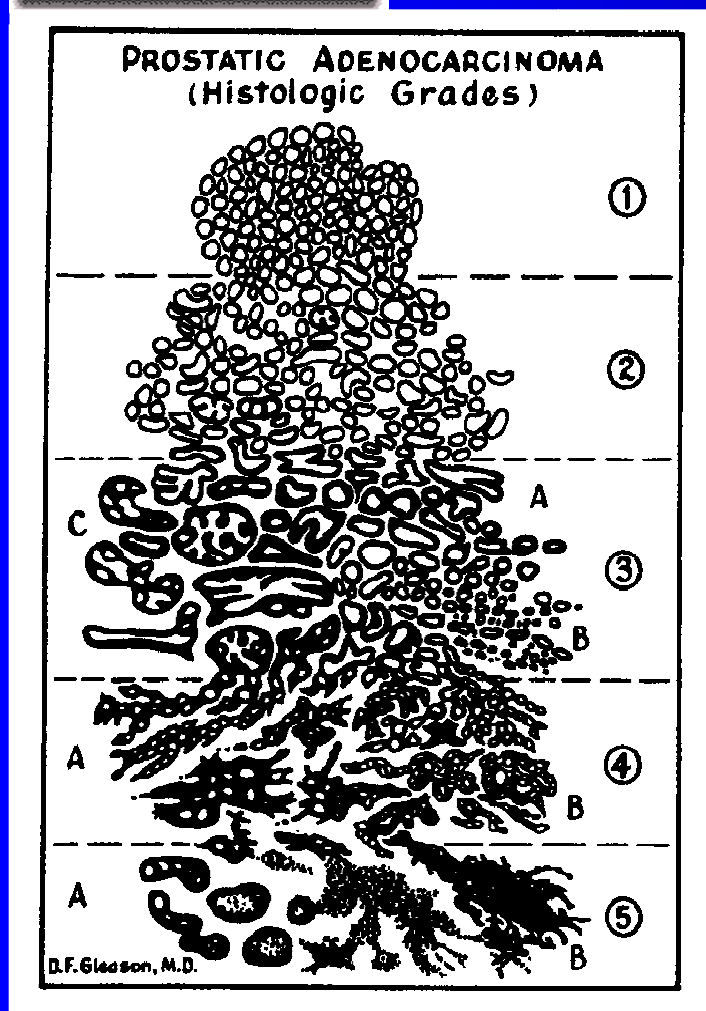
System klasyfikacji TNM

– stopień zaawansowania raka

- T – tumor (guz)
 - T1 – guz mikroskopowy ograniczony do prostaty, nie wyczuwalny palpacyjnie
 - T2 – guz wyczuwalny palpacyjnie ograniczony do prostaty
 - T3 – guz przechodzący poza torebkę gruczołu krokowego, zajęte pęcherzyki nasienne
 - T4 – guz naciekający sąsiednie narządy
- N – lymph nodes (węzły chłonne)
- M – metastases (przerzuty odległe)



Stopień Gleasona



- 1 Komórki dobrze zróżnicowane, małe o jednakowej wielkości, ułożone blisko siebie.
- 2 Komórki dobrze zróżnicowane o różnych kształtach i rozmiarach, ułożone luźno.
- 3 Komórki średnio zróżnicowane, nieregularne, rozproszone choć niektóre się łączą, błony komórkowe mniej wyraźnie zaznaczone
- 4 Komórki źle zróżnicowane, wiele jest połączonych w nieregularne twory, niektóre zaczynają naciekać tkankę łączną.
- 5 Komórki źle zróżnicowane, rak zbudowany z nieregularnych mas naciekających tkankę łączną.



PSA – Prostate Specyficzny Antygen

Wiek	Poziom PSA ng/ml
40 – 49 lat	0 – 2,5
50 – 59 lat	0 – 3,5
60 – 69 lat	0 – 4,9
70 – 79 lat	0 – 5,8



Co to jest promieniowanie synchrotronowe?

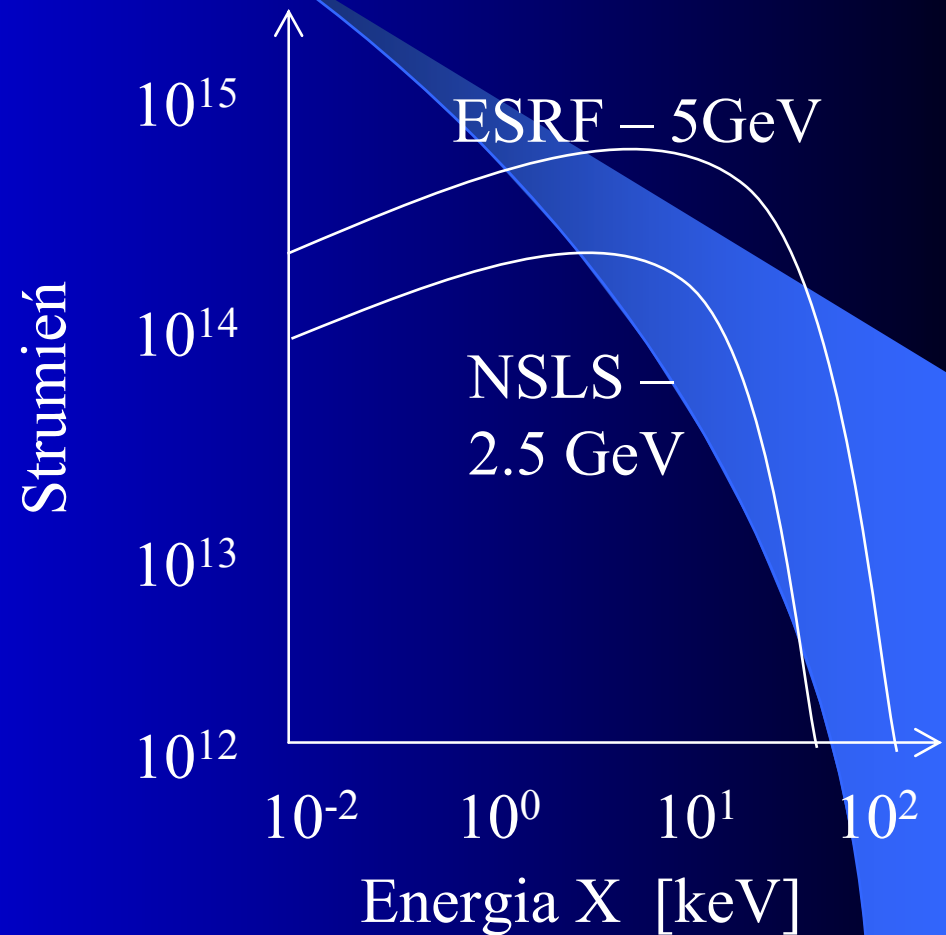
- Promieniowanie elektromagnetyczne emitowane w wąski stożek przez cząstki naładowane, przyspieszane w polu magnetycznym.





Zalety promieniowania synchrotronowego

- Szeroki zakres widma
- Duża intensywność
- Propagacja wiązki w kierunku emisji (mały kąt rozwarcia)
- Pulsacyjna struktura czasowa wiązki
- Wysoki stopień polaryzacji wiązki w płaszczyźnie krążących elektronów





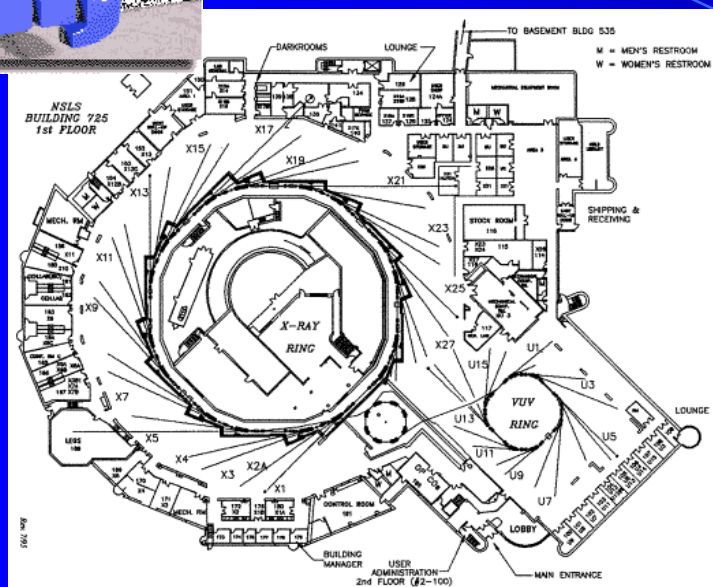
Synchrotron Radiation Source

National Synchrotron Light Source, BNL, Upton, New York, USA





NSLS

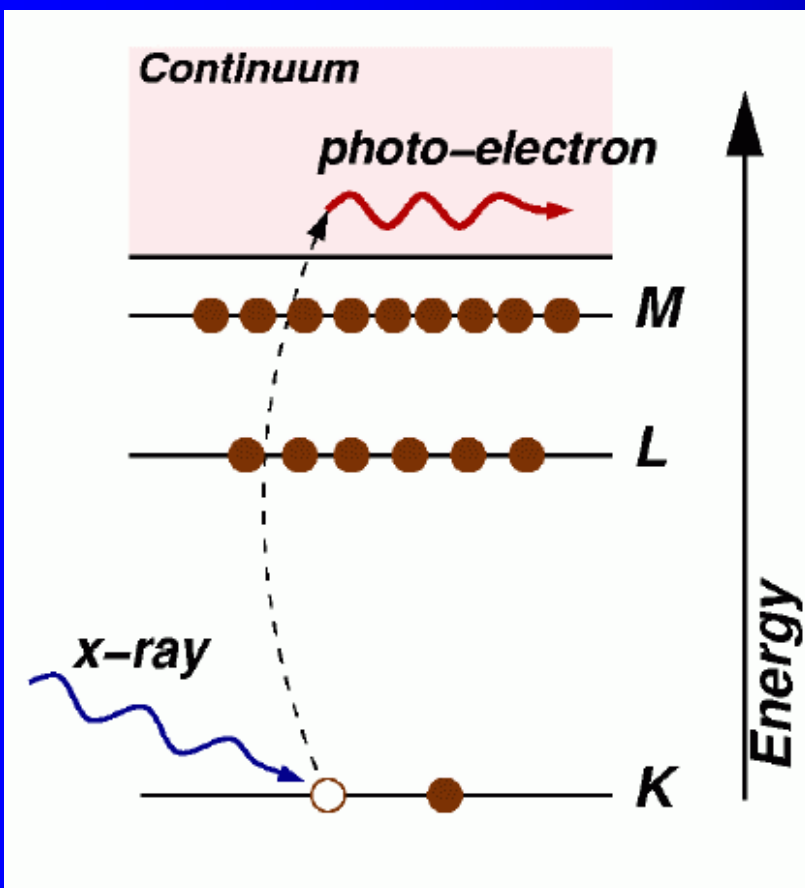


WMK

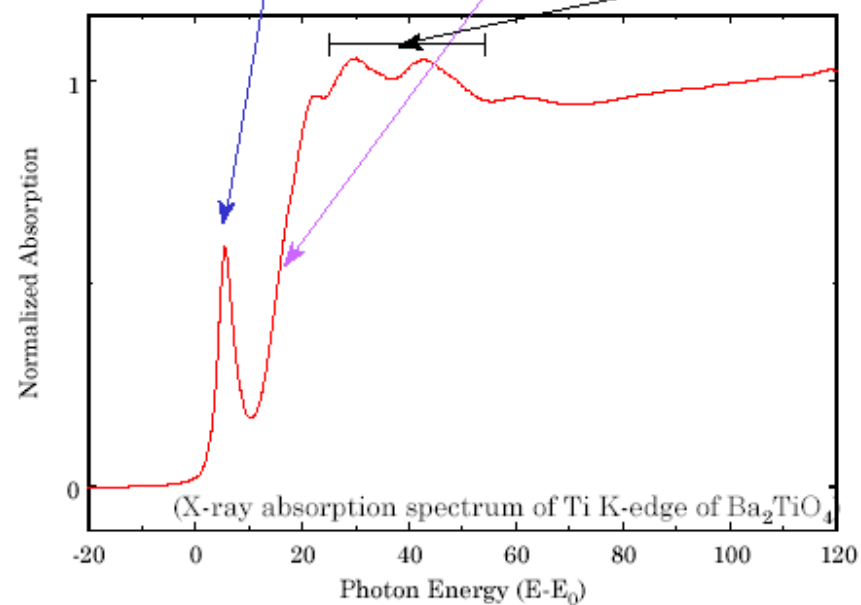
10.5.2001



Metody badawcze



XANES= Pre-edge + Edge + XANES



$K_{\alpha}: L \rightarrow K,$ $K_{\beta}: M \rightarrow K.$



SRIXE – Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission

- Wykorzystanie wiązki białej i monochromatycznej
- Próbka umieszczona jest pod kątem 135° do wiązki
- Próbki umieszczone są w komorze z podglądem TV sprzężonym z mikroskopem
- Próbki przechowywane są w atmosferze
- Czas akwizycji danych do 300 s/pixel
 - (5-10 s/pixel dla skanów 2D)
- Widma X rejestrowane detektorem Si(Li) o grubości 5 mm i zdolności rozdzielczej 140 eV dla 5,9 keV
- Rozmiar wiązki $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ /pixel
 - dla skanów 2D $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ i mniej.

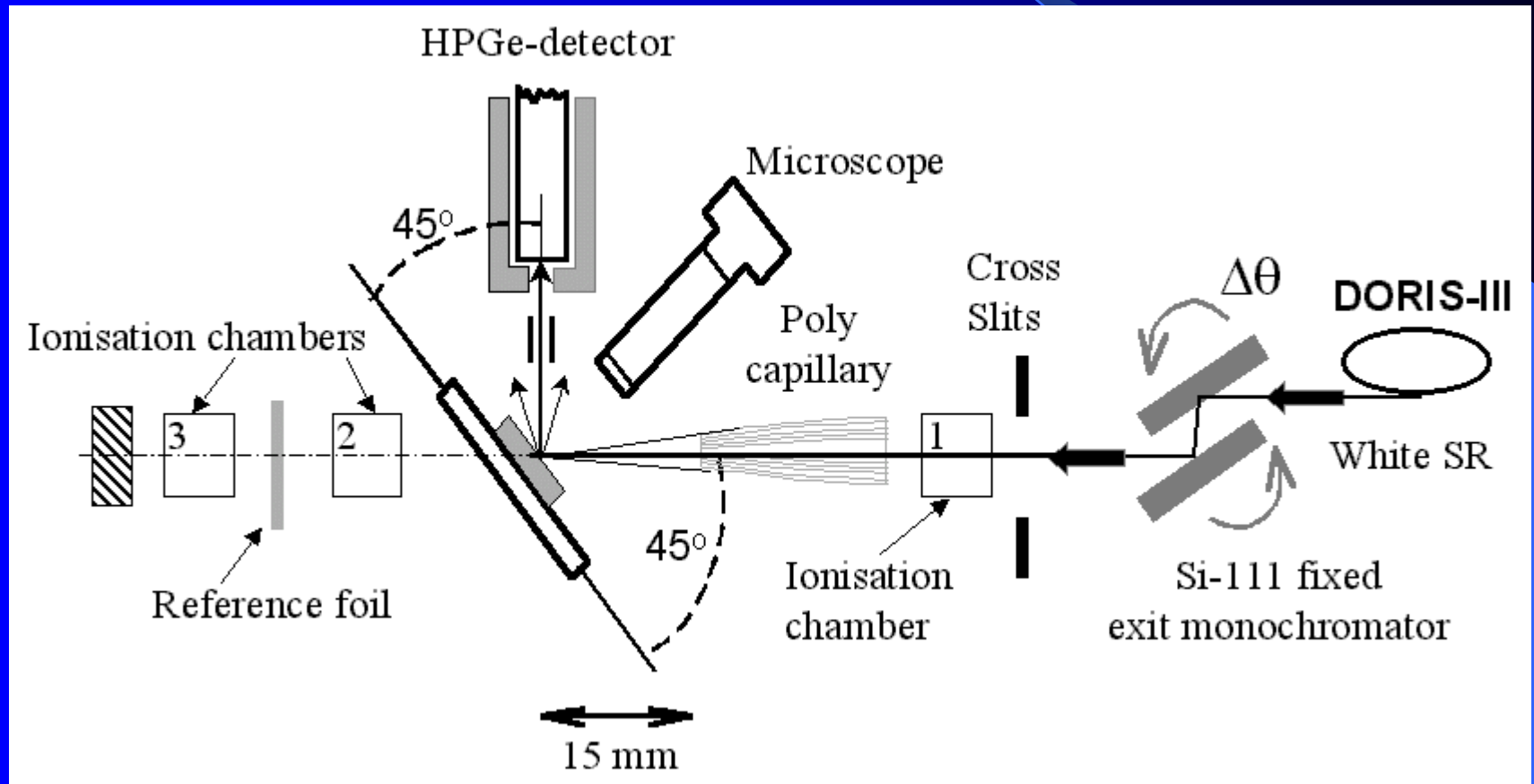


XANES – X-ray Absorption Near Edge Structure

- XANES – metoda absorpcyjna lub fluorescencyjna
- Wiązka monochromatyczna
- Krok skanowania energetycznego 0.3 eV w przedziale od -20 eV to +30 eV względem krawędzi absorpcji (dla żelaza - 7.112 keV)
- Czas akwizycji danych 10 s/krok monochromatora
- Rozmiar wiązki 16 mm x 14 mm oraz 1 mm²

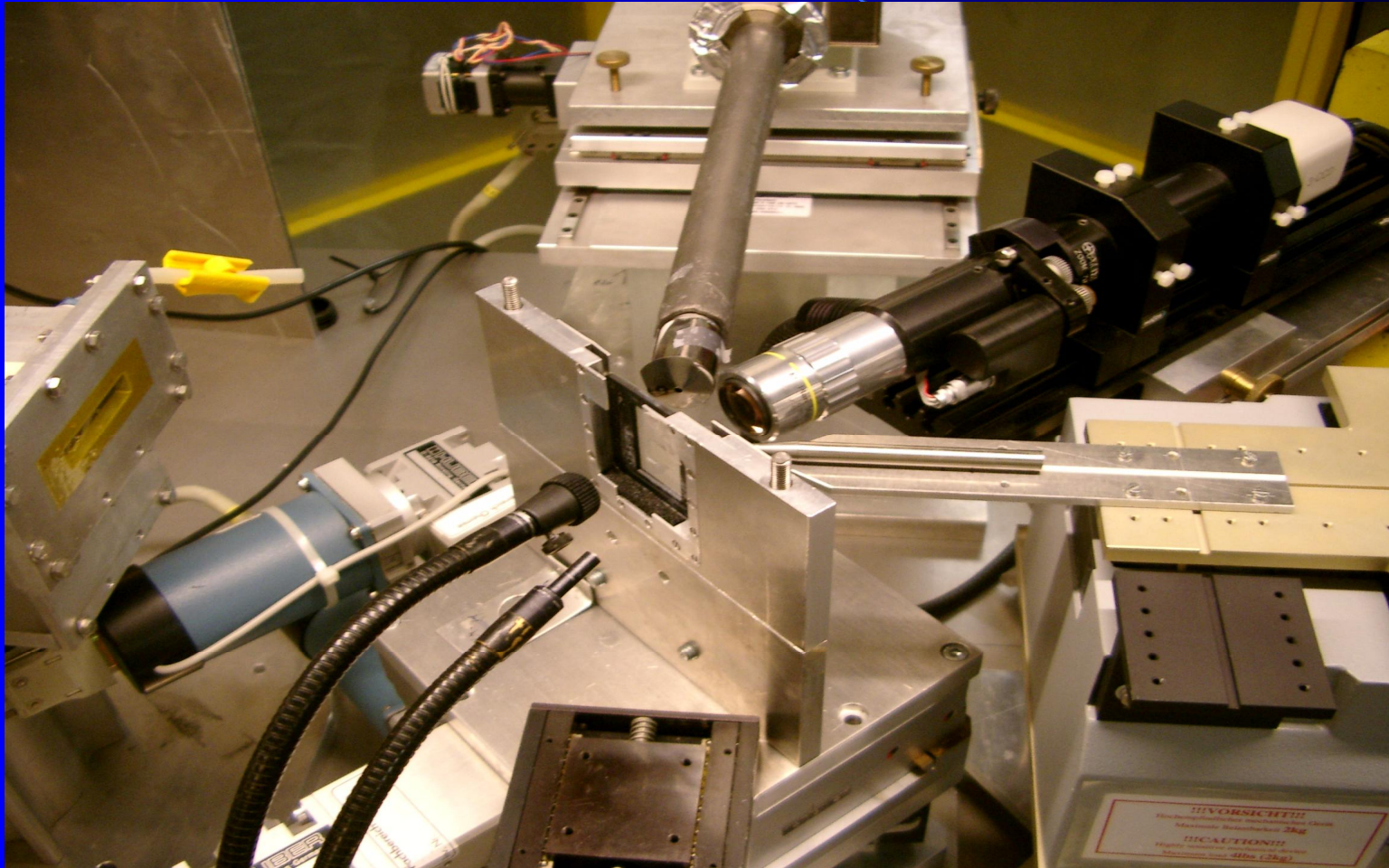


Układ eksperymentalny - HASYLAB



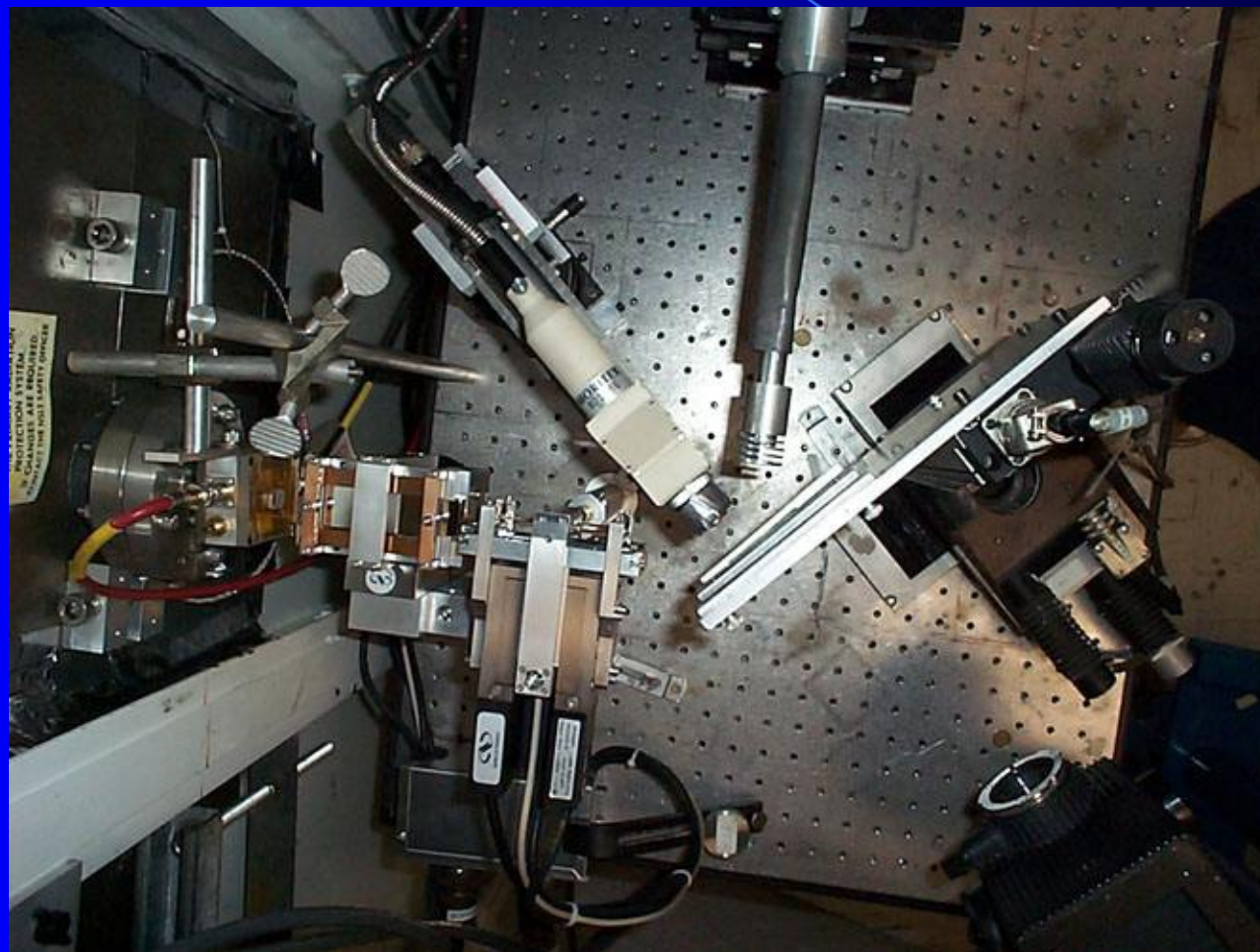


Układ eksperymentalny - HASYLAB





Aparatura pomiarowa - NSLS

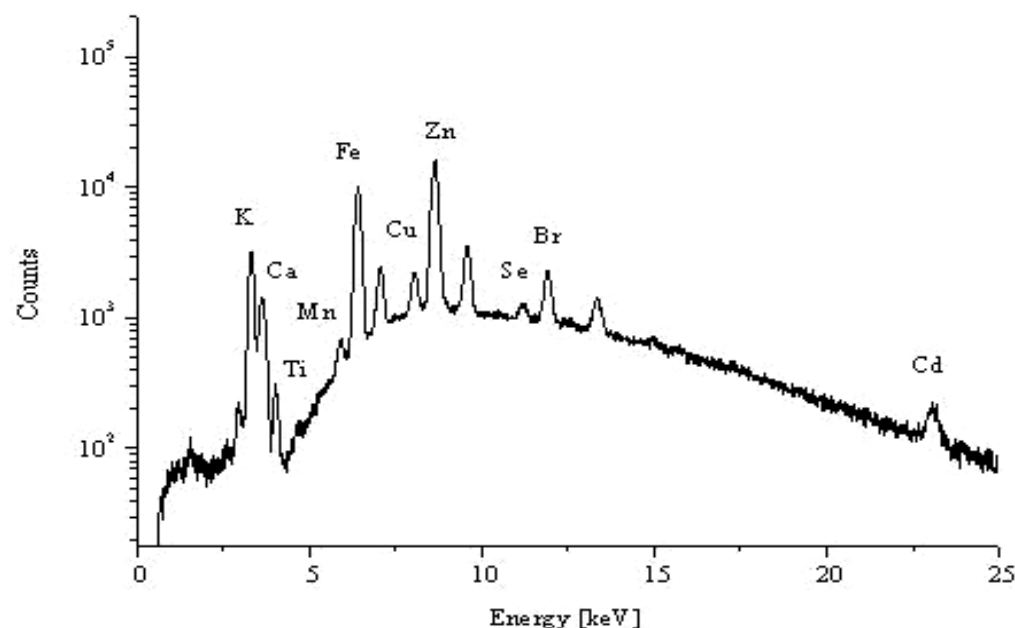




SRIXE

– oznaczanie stężeń pierwiastków śladowych

- SRIXE – Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission
 - analiza składu pierwiastkowego tkanek
 - Analiza rozkładu powierzchniowego stężeń pierwiastków

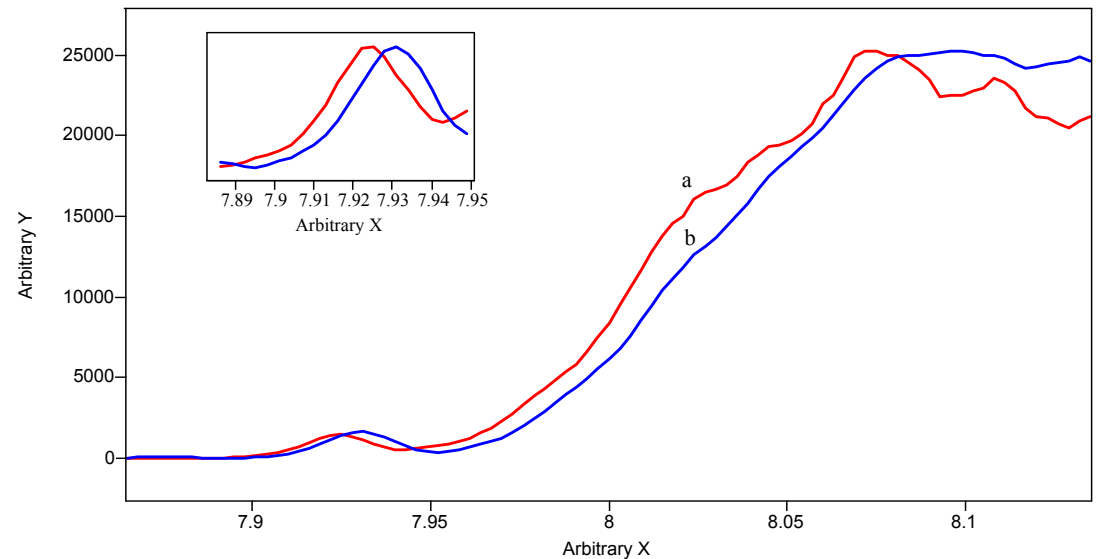




XANES

- oznaczanie Fe^{+3} i Fe^{+2}

- XANES – X-ray Absorption Near Edge Structure.
 - Badanie struktury krawędzi absorpcji
 - Analiza piku przedkrawędziowego (pre-edge-peak)

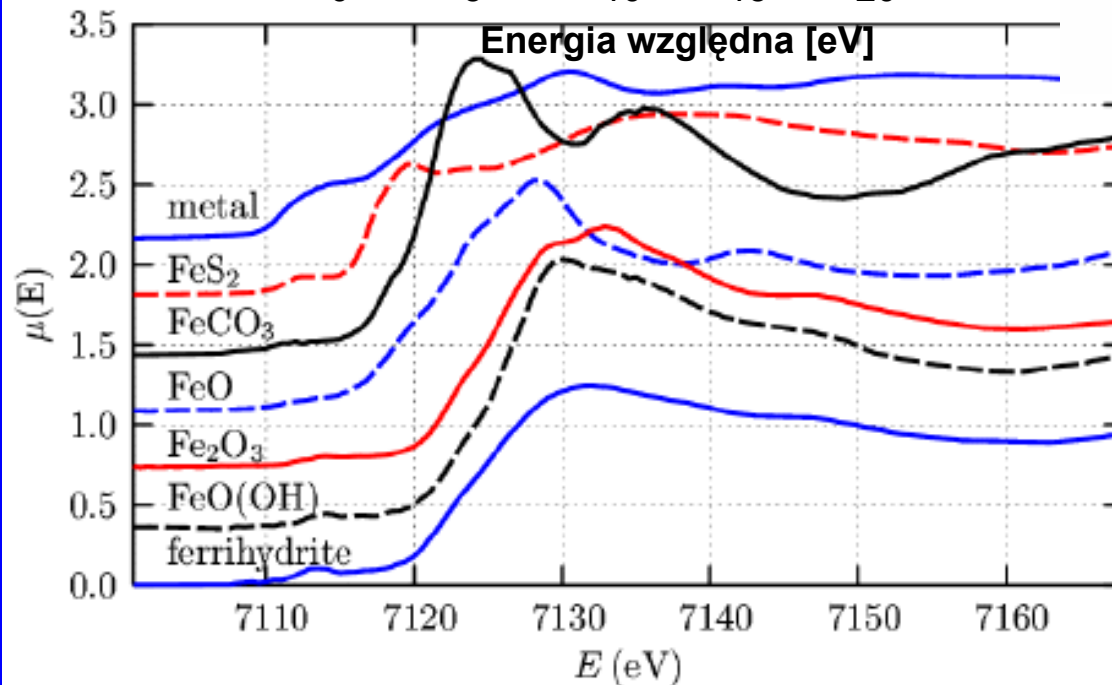
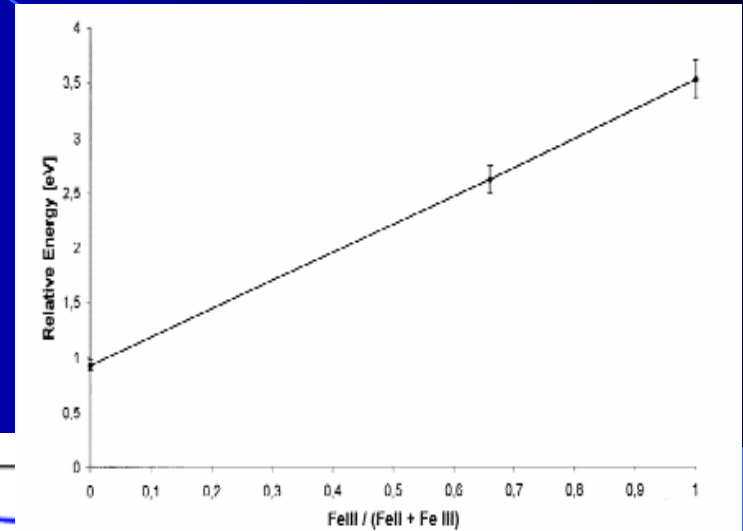
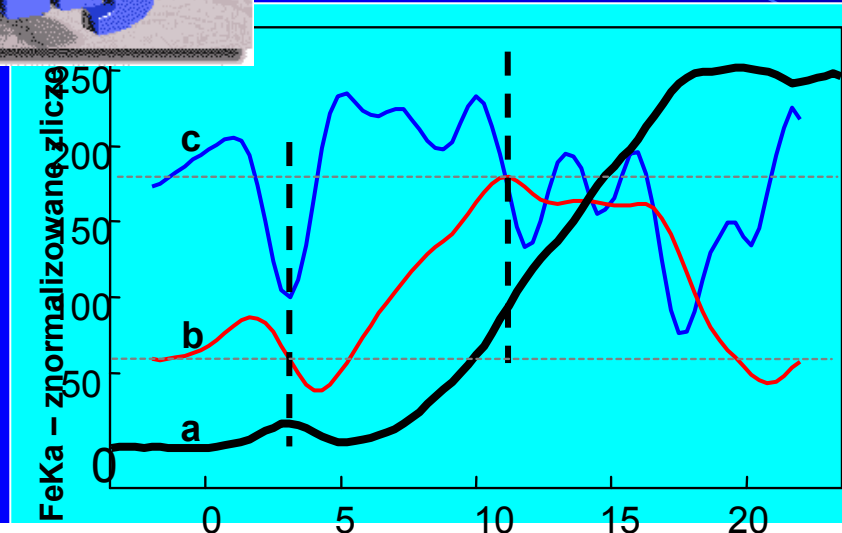


Compton Scattering - cancer 3/2 x=20.230 y=13.108 It 5s/p

View Mode: Realtime

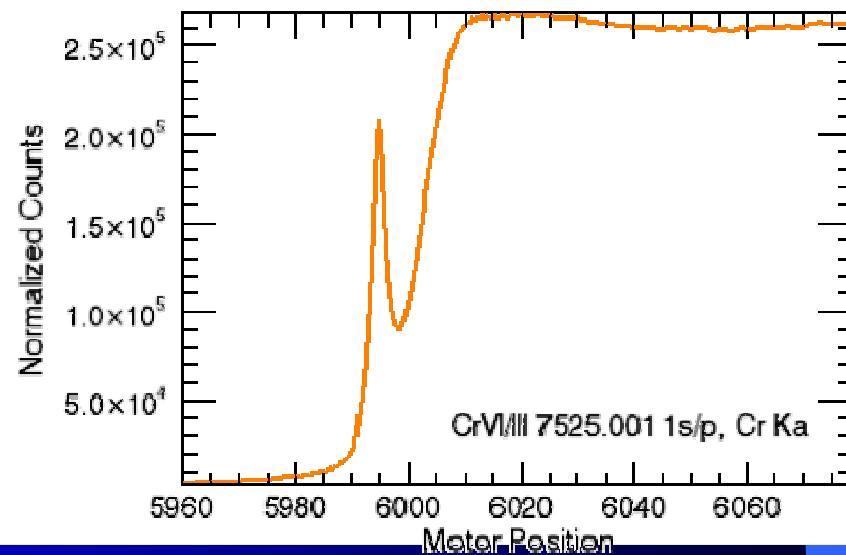
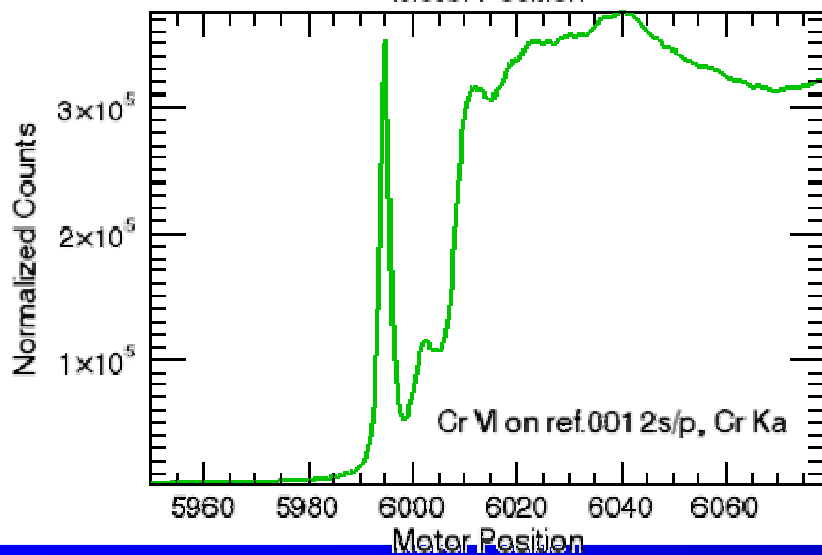
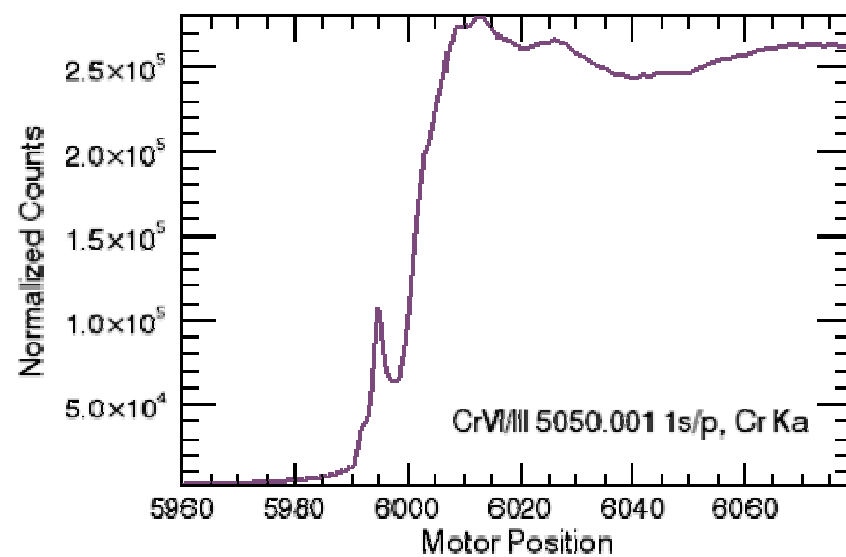
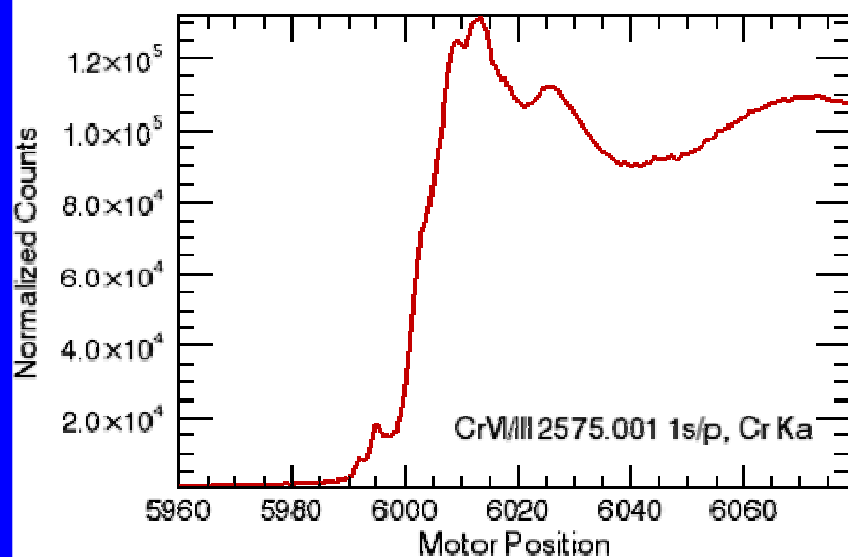


Wyznaczenie krzywej kalibracji



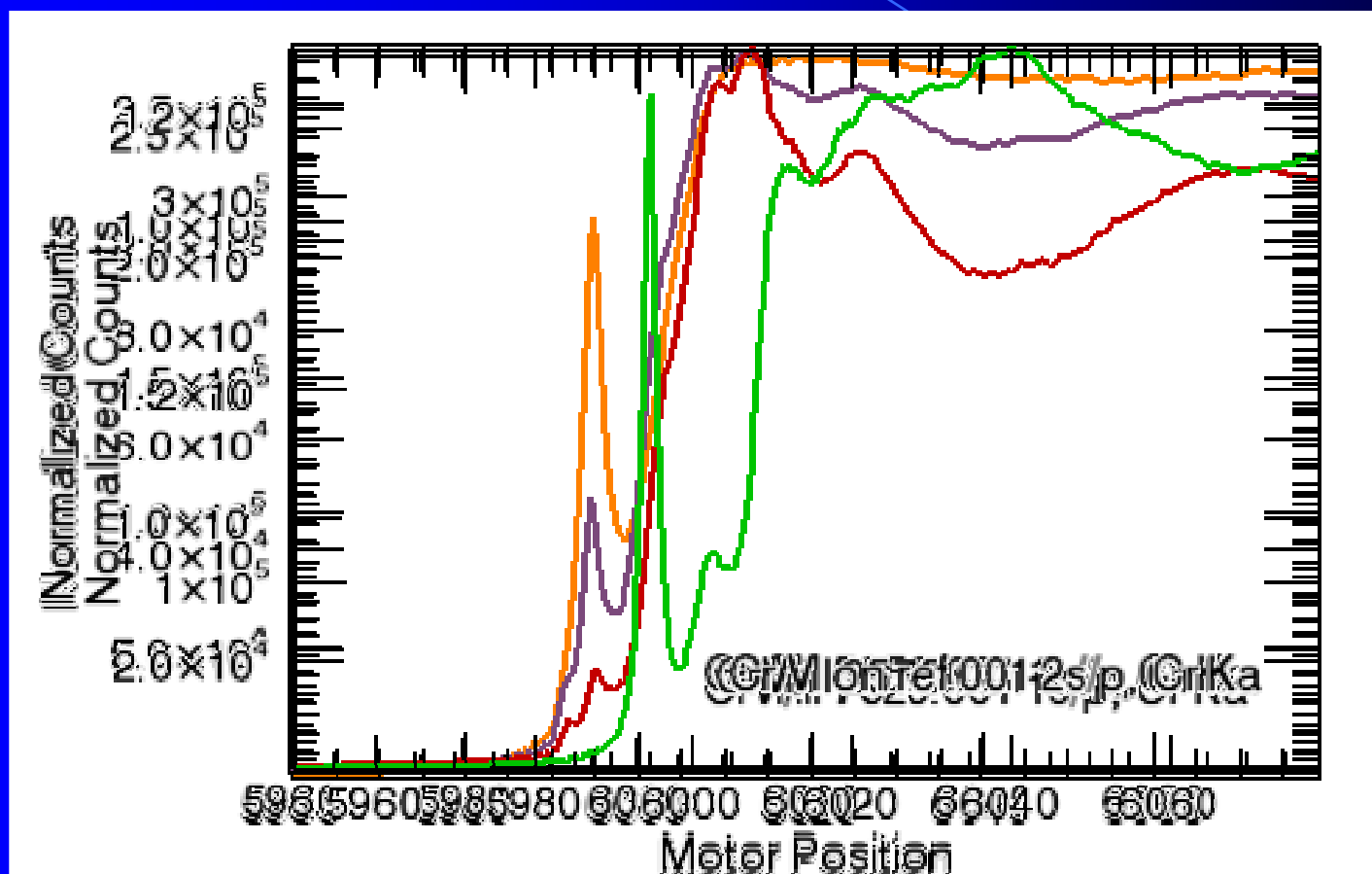


XANES dla Cr



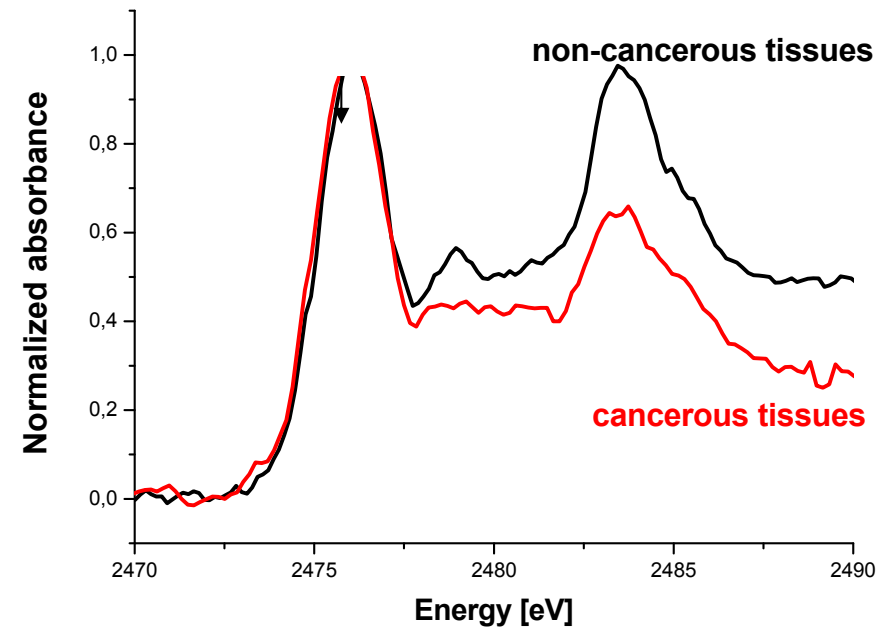
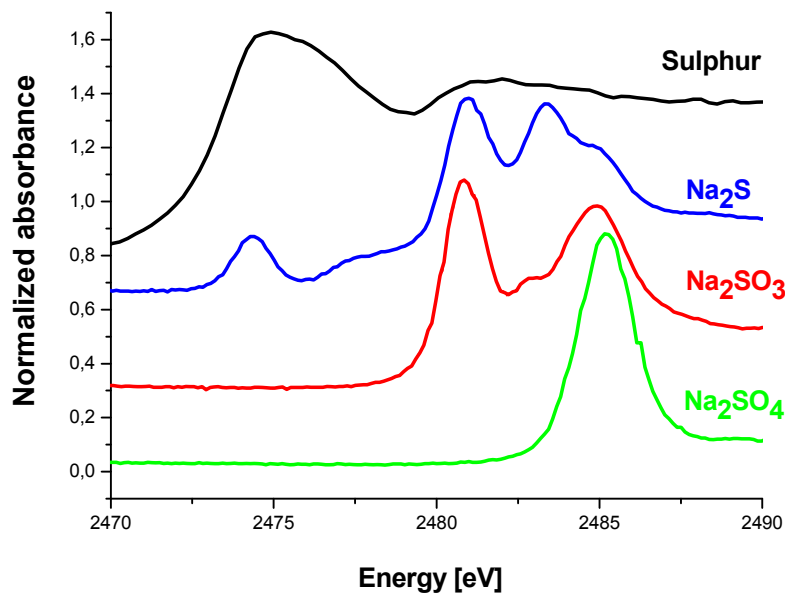


Porównanie krawędzi XANES dla Cr



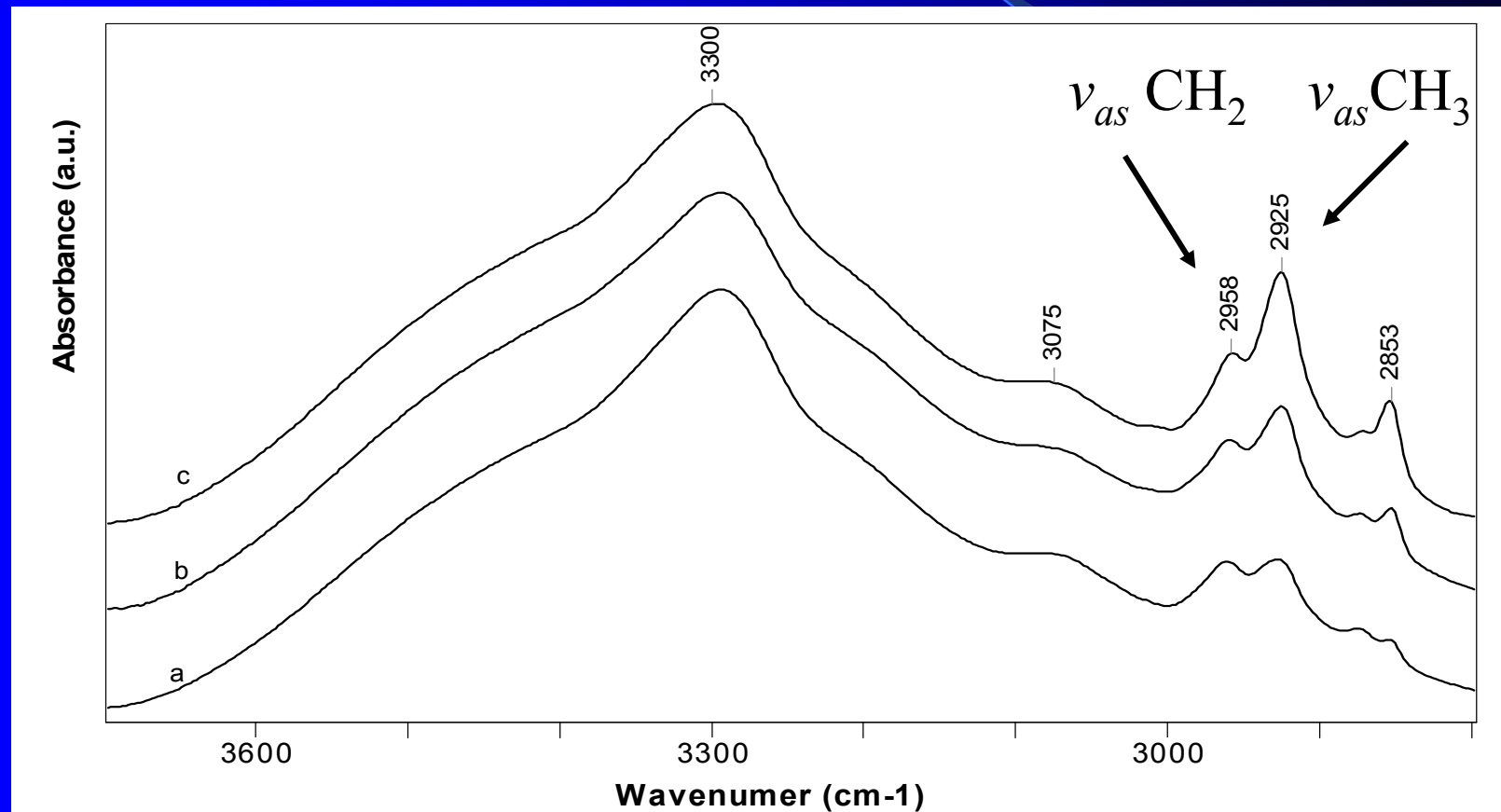


XANES dla krawędzi siarki



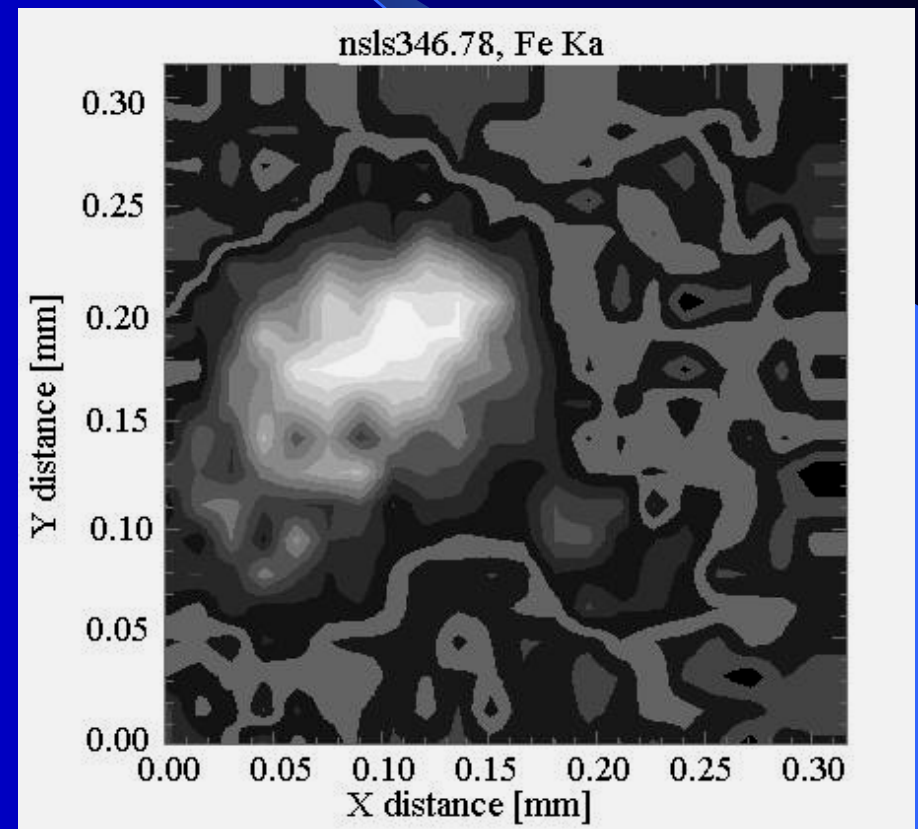
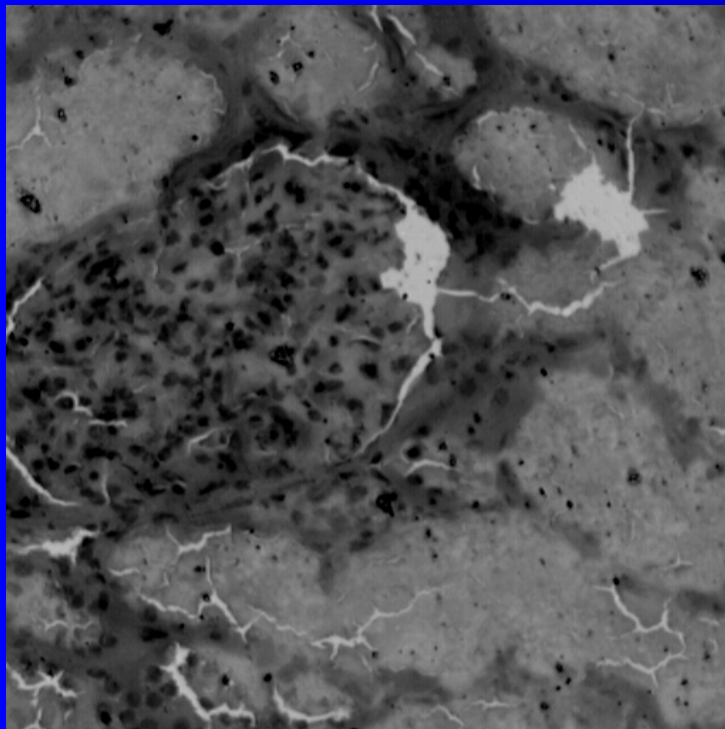


FTIR dla a) tkanki „zdrowej” b) hiperplastycznej c) nowotworowej



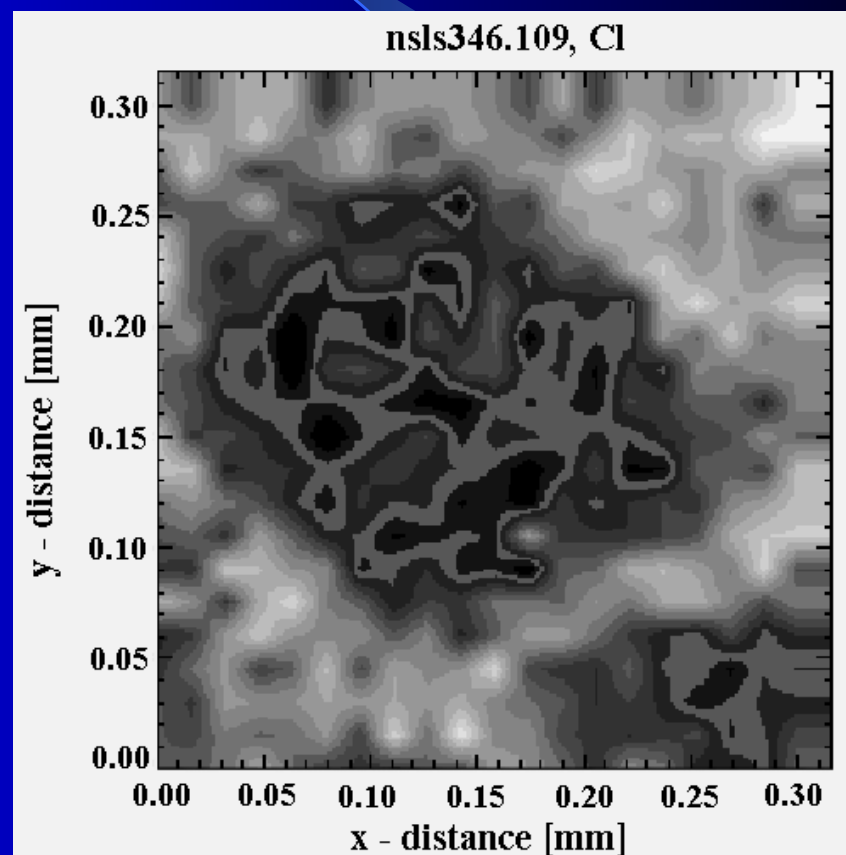
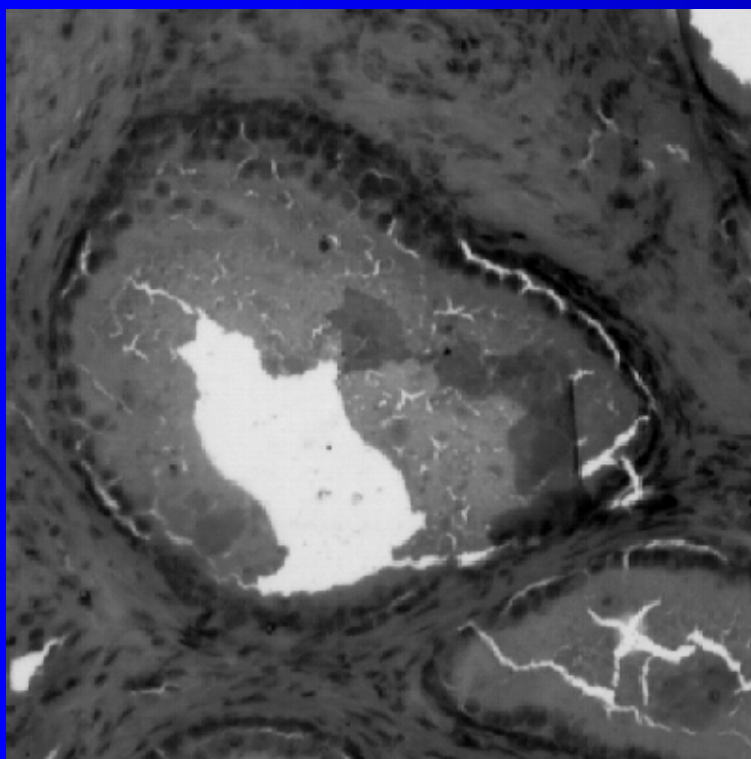


Obraz tkanki zdrowej nerki i rozkładu żelaza



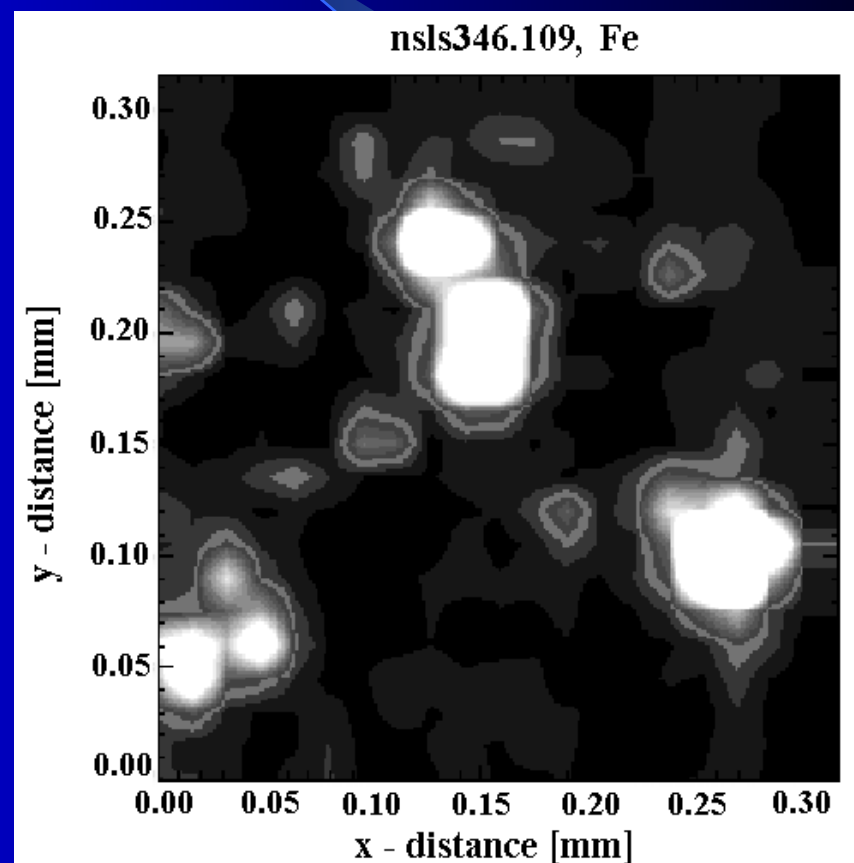
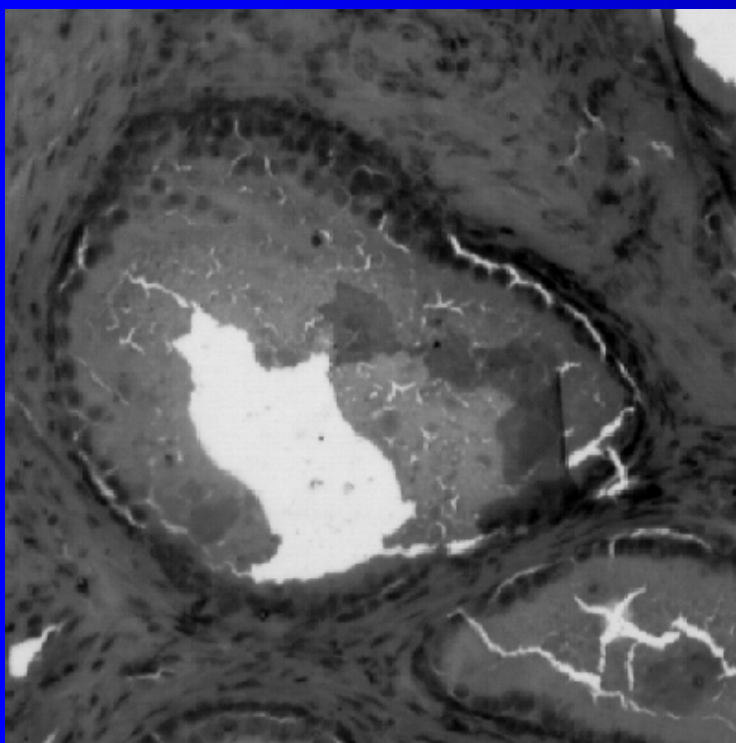


Obraz tkanki prostaty i rozkładu chloru





Obraz tkanki prostaty i rozkładu żelaza





Podsumowanie

- Możliwość analizy zmian zachodzących na poziomie tkankowym a nawet i komórkowym w procesach nowotworowych stanowi duży potencjał badawczy
- Metody fizyki zwłaszcza wykorzystujące promieniowanie synchrotronowe jako uzupełniające w badaniach diagnostycznych chorób nowotworowych pozwalających na lepsze zrozumienie procesów nowotworzenia, jednakże z uwagi na ich koszt nie będą metodami powszechnie stosowanymi.



Współpracownicy

- prof. dr hab. Tadeusz Cichocki – Coll. Med.
- dr Agnieszka Banaś – IFJ PAN
- dr Mariusz Gajda – Coll. Medicum
- dr Marek Gałka – Szpital G. Narutowicza
- dr Albert L. Hanson – BNL, USA
- dr inż. Czesława Paluszkiewicz – UJ/AGH



Podziękowania

- prof. dr hab. Jerzy Stachura – pomoc w określaniu typów nowotworów
- mgr Halina Strzałka – pomoc w wybarwianiu preparatów tkankowych