

Mikroskopi med singlet oxygen

Oxygen og singlet oxygen er vigtige dele af utallige biologiske og kemiske systemer. Der er udviklet spektroskopiske metoder til direkte observation af oxygen og singlet oxygen, med både tidslig og rumlig opløsning, i en lang række systemer

Af Jacob Arnbjerg, Mette Johnsen, Nickolass Bitsch Schack og Peter R. Ogilby, Kemisk Institut, Aarhus Universitet

Oxygen er et af de vigtigste molekyler på jorden og spiller en enestående rolle i opretholdelsen af liv hos både planter, dyr og mennesker. Det indgår også i en række mekanismer, der fører til tilintetgørelse af liv og nedbrydning af materialer. Til trods for at oxygen er særdeles velstuderet, er der fortsat mange udfordringer at løse i studiet af oxygen og oxygenafhængige processer.

Særligt interessante er systemer, hvor den laveste eksiterede elektrontilstand af oxygen indgår. Denne tilstand, der betegnes »singlet oxygen« grundet parringen af valenselektronernes spin, kan genereres på flere måder, dog oftest ved at et oxygenholdigt system bestråles af lys. Da både oxygen og lys (sollys, lys fra lamper og lasere m.m.) er allestedsnærværende, er singlet oxygen også allestedsnærværende, og dets unikke reaktivitet er derfor vedkommende for en lang række systemer.

Singlet oxygen er bl.a. involveret i nedbrydning af en række

industrielt vigtige polymerer, og i biologiske systemer kan det aktivere processer, der kan resultere i celledød. Der er mange indikationer på, at singlet oxygen kan spille en afgørende rolle for den type celledød, der kaldes apoptose. Det udnyttes og udvikles i fotodynamisk terapi, hvor lys bruges som medicinsk redskab til bl.a. at bekæmpe nogle kræftformer.

I mange systemer afhænger singlet oxygens aktivitet og opførsel i høj grad af den heterogene karakter, systemet har på et mikroskopisk niveau. Det ses eksempelvis i de faseseparerede områder, der karakteriserer mange biologiske og polymeriske systemer. Metoder til direkte tids- og rum-opløst detektion af singlet oxygen i et system, singlet oxygen mikroskopi, vil være et stærkt og værdifuldt redskab til at forstå molekylets opførsel og egenskaber. Udviklingen af sådanne mikroskopiske metoder er et af vores primære forskningsmål.

Eppendorf Mastercycler ep gradient S

RADIOMETER
COPENHAGEN

Spar
10.800,-

... markedets hurtigste heating rate

Ekstrem hurtig, præcis og brugervenlig - det er definitionen på Eppendorf Mastercycler ep gradient S. Mastercycleren programmeres via et grafisk display, hvilket gør det nemt, hurtigt og overskueligt at opsætte de rigtige parametre.

- Programmerbar temperaturgradient
- Heating rate 6°C/s
- Cooling rate 4,5°C/s
- Op til 24°C gradient
- Sælvblok

Tilbud
61.200,-

Pris uden grafisk display
51.850,-



Tilbuddet er excl. moms og gælder d.t.m. 31.12.04

RADIOMETER DANMARK A/S

VALBUUS ALLÉ 176
SØNEN FRICHVEL 42A

2610 RÅDVHOL
8230 ÅBYHØJ

TEL: 66 27 25 23
TEL: 66 75 25 00

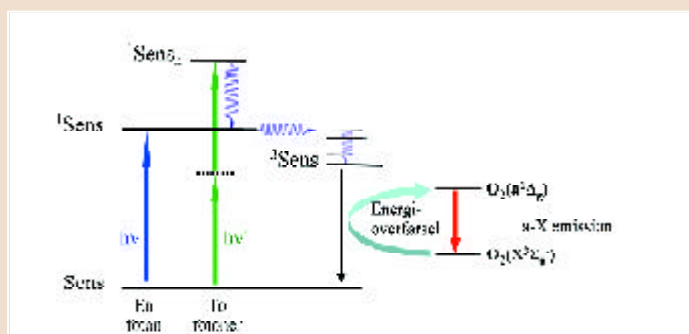
www.radiometerdenmark.dk
rdan@radiometer.dk

Produktion og detektion af singlet oxygen

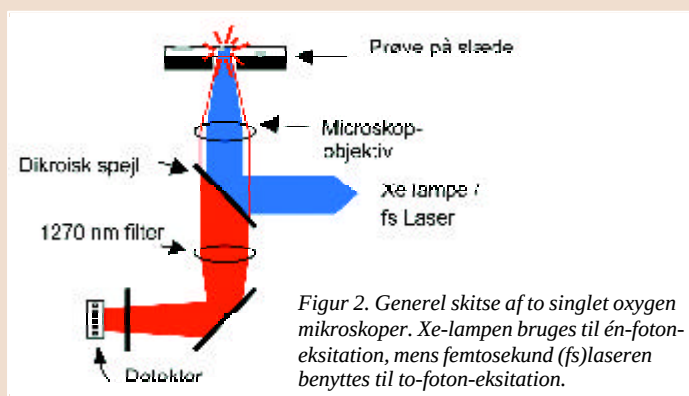
Ved vores fremgangsmetode dannes singlet oxygen vha. et sensitizer-molekyle. Sensitizeren fungerer som et hjælpe-molekyle ved initieringen af fotoprocesser. Det kendes fra mange steder i naturen, eksempelvis i fotosyntesen. I vores eksperimenter kan sensitizeren enten være en integreret del af det studerede system, eller et molekyle der tilsættes specifikt.

Sensitizeren eksiteres og medvirker herefter til at producere singlet oxygen i en proces, der involverer energioverførsel fra sensitizerens triplet-tilstand til oxygens grundtilstand. Processen er illustreret i figur 1, hvor de elektroniske tilstande af oxygen er angivet med de spektroskopiske betegnelser $O_2(X^3\Sigma_g^-)$ for grundtilstanden og $O_2(a^1\Delta_g)$ for singlet-tilstanden. Singlet oxygen kan omdannes til triplet oxygen, $O_2(X^3\Sigma_g^-)$, gennem såvel strålingsudsendende som ikke-strålingsudsendende processer. Ved førstnævnte udsendes IR-stråling ved 1270 nm (fosforescens) fra singlet oxygen. Den kan efterfølgende detekteres, selvom processen i sig selv er meget usandsynlig og signalet derfor meget svagt. Da singlet oxygen derudover er meget reaktivt, kan kemiske reaktioner konkurrere med ovennævnte fotoprocesser, hvilket bevirker, at fosforescenssignalet svækkes yderligere.

Der er udviklet flere mikroskoper baseret på processen skitseret i figur 1. I figur 2 ses en generel opstilling, der illustrerer princippet bag to af disse mikroskoper.



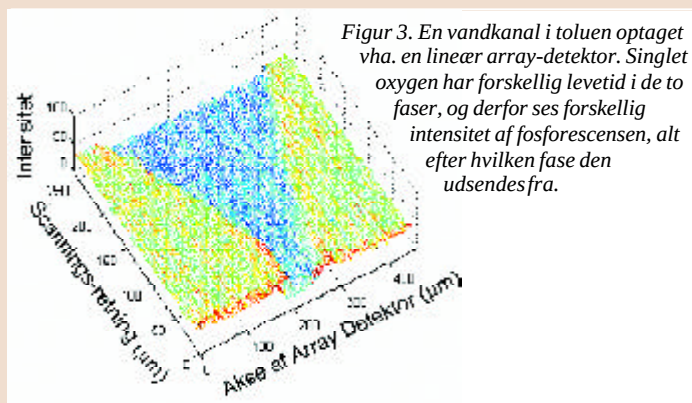
Figur 1. Sensitizer-molekylet eksiteres fra sin grundtilstand til en højtliggende singlet-tilstand via absorption af én eller to fotoner. Gode sensitizer-molekyler omdannes effektivt til triplet-tilstanden, og endvidere er deres energioverførsel til oxygen i grundtilstanden effektiv.



Figur 2. Generel skitse af to singlet oxygen mikroskoper. Xe-lampen bruges til én-foton-eksitation, mens femtosekund (fs)laseren benyttes til to-foton-eksitation.

Én-foton singlet oxygen mikroskopet

Prøven, der er monteret på en slæde i et inverteret mikroskop, belyses i dette tilfælde af en Xe-lampe, hvorved sensitizeren absorberer én foton (figur 1). Som tidligere beskrevet dannes der herved singlet oxygen, og intensiteten af fosforescensen fra de forskellige steder i prøven detekteres via et lineært array. For at opnå et 2D-billede af prøven benyttes en step-scan metode, hvor prøven flyttes trinvis vha. slæden. Herved opnås

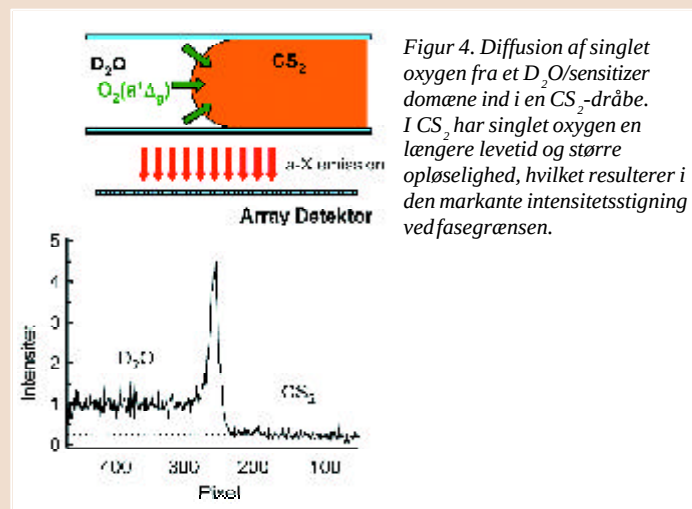


Figur 3. En vandkanal i toluen optaget vha. en lineær array-detektor. Singlet oxygen har forskellig levetid i de to faser, og derfor ses forskellig intensitet af fosforescensen, alt efter hvilken fase den udsendes fra.

en serie éndimensionale målinger, der til sidst samles og giver et fuldstændigt billede (figur 3).

Kvaliteten, dvs. opløsningen, af de opnåede billeder afhænger af de enkelte elementers størrelse i detektor-arrayet og af mikroskopobjektivets forstørrelsessevne. Den maksimale opnåede opløsning var 2,5 µm. Det er med den anvendte optik tæt på den nedre grænse på 1,94 µm, der er givet ved Rayleighs diffraktionskriterium for 1270 nm lys.

Metoden kan også benyttes til at betragte diffusion af singlet oxygen og oxygen gennem en prøve. Det er især nyttigt i heterogene prøver, hvor singlet oxygen møder forskellige fase-separerede områder, der enten sænker eller øger diffusionsprocessen. Specielt for biologiske systemer er det vigtigt at kunne følge singlet oxygens diffusion henover fasegrænser (figur 4).

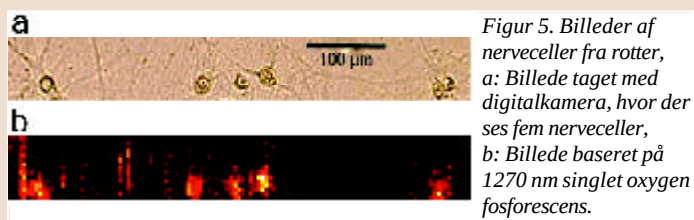


Figur 4. Diffusion af singlet oxygen fra et D_2O /sensitizer domæne ind i en CS_2 -dråbe. I CS_2 har singlet oxygen en længere levetid og større opløselighed, hvilket resulterer i den markante intensitetsstigning ved fasegrænsen.

Biologiske celler

Et vigtigt mål med mikroskopiteknikken er at producere billeder af biologiske systemer med subcellulær opløsning. Sådanne billeder kan være med til at give et detaljeret overblik over eksempelvis mekanismerne for singlet oxygen aktiveret celledød. Denne optiske detektion er dog vanskelig at opnå, idet man forsøger at detektere et signal fra en prøve, hvori der findes mange molekyler, der har mulighed for at svække signalets styrke. Det gælder eksempelvis proteiner, der deaktiverer singlet oxygen ved sammenstød. Også det biologiske miljø er en udfordring, da vand sænker både levetiden af singlet oxygen og effektiviteten af fosforescensdannelse. Et åbenlyst skridt på vejen mod subcellulær opløsning er at detektere fosforescens fra enkelte celler. Det er i sig selv en eksperimentel udfordring, men er lykkedes med ovennævnte mikroskop (figur 5).

Som det tydeligt fremgår af det fosforescensbaserede billede,



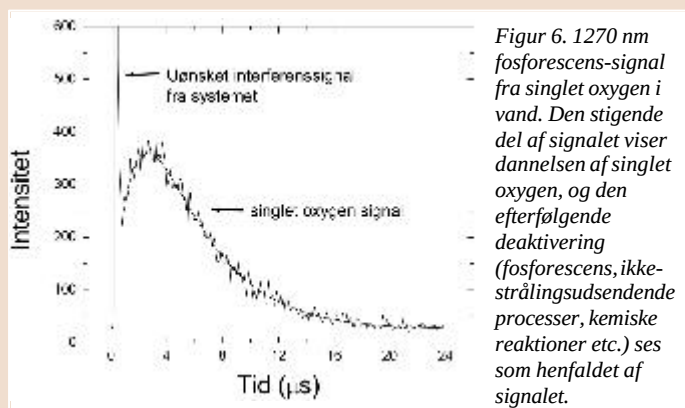
Figur 5. Billeder af nerveceller fra rotter, a: Billede taget med digital kamera, hvor der ses fem nerveceller, b: Billede baseret på 1270 nm singlet oxygen fosforescens.

er kvaliteten endnu utilstrækkelig til subcellulær opløsning. Ikke desto mindre er billedet et gennembrud, idet det gennem de sidste 20 år har været et uopnåeligt ønske for mange grupper inden for feltet.

Vi har nu taget et vigtigt skridt mod subcellulær opløsning.

To-foton singlet oxygen mikroskopi

Som alternativ til sensitizerens absorption af én foton kan to fotoner absorberes samtidig (figur 1). Fotofysikken, der følger to-foton-absorptionen, er identisk med den i én-foton-processen. I begge tilfælde måles der ultimativt på fosforescens-signalet fra singlet oxygen. Med to-foton-absorption har det været muligt at detektere signal fra singlet oxygen i en række solventer, heriblandt vand (figur 6).



Figur 6. 1270 nm fosforescens-signal fra singlet oxygen i vand. Den stigende del af signalet viser dannelsen af singlet oxygen, og den efterfølgende deaktivering (fosforescens, ikke-strålingsudsøsende processer, kemiske reaktioner etc.) ses som henfaldet af signalet.

På trods af ovennævnte lighed mellem de to absorptionstyper er der store forskelle. Det har såvel teoretiske som praktiske implikationer, der gør to-foton singlet oxygen mikroskopi til en unik og udfordrende teknik.

Absorptionssandsynligheden, W , afhænger af det pågældende sensitizer-molekyle samt laserens intensitet, I_L . I to-foton-tilfældet er W proportional med I_L^2 , i én-foton-tilfældet er sammenhængen lineær. Ved at fokusere hårdt kan absorptionen af to fotoner begrænses til et volumen i størrelsesordenen l^3 , hvor l er laserbølgelængden. De bølgelængder, der benyttedes, gav ekstremt små volumener på typisk under én femtoliter ($1 \text{ femtoliter} = 10^{-15} \text{ L}$) og en typisk rumlig opløsningsevne på et par hundrede nanometer. Det åbner for nye og mere detaljerede studier af singlet oxygen. Eftersom mange almindelige materialer kun absorberer i netop laserfokuset, er der mulighed for at trænge dybt ind i materialet.

Princippet bag vores to-foton singlet oxygen mikroskop er vist i figur 2 og er stort set identisk med én-foton-mikroskopet. Forskellen er, at der benyttes et fs lasersystem som lyskilde i

stedet for en Xe-lampe, og lyset fokuseres i et meget lille volumen. Prøven scannes punkt for punkt i det tredimensionelle rum, og intensiteten af singlet oxygen signalet måles i hvert punkt ved at tælle de enkelte fosforescens-fotoner, der udsendes fra det givne område.

Design af to-foton-sensitizer

Kravene til en god to-foton-sensitizer er bl.a., at molekylet effektivt kan absorbere to fotoner. Det kan imødekommes ved at designe store organiske molekyler med høj grad af konjugation i et π -system, der strækker sig over store dele af molekylet. Elektron-donerende og -accepterende substituentgrupper kan inkorporeres i molekylet. Det fremmer fotoinduceringen af intramolekylær charge-transfer, hvorved to-foton-absorptions-sandsynligheden øges. Endnu et krav til en god sensitizer er molekyllære egenskaber, der bidrager til effektiv dannelse af singlet oxygen. Praktiske hensyn går på stabilitet ved længerevarende belysning, uskadelig miljøpåvirkning og ikke mindst opløseligheden af sensitizeren i det ønskede område.

Konklusion

Vi har demonstreret, at man med de beskrevne mikroskoper med stor succes kan detektere singlet oxygen fra fase-separerede, heterogene systemer, inkl. biologiske celler. På baggrund af denne detektion kan der dannes billeder. Vi er således klar til at betragte mere komplicerede systemer og til snart at danne billeder af disse med forbedret opløsning. I denne forbindelse er det måske vigtigste perspektiv studiet af den rolle, singlet oxygen spiller i fotoinduceret celledød.

Det videnskabelige arbejde er støttet af Statens Naturvidenskabelige Forskningsråd gennem et legat bevilliget til The Center for Oxygen Microscopy samt et legat fra Villum Kann Rasmussen Fonden.

Nuværende medlemmer af The Center for Oxygen Microscopy der har bidraget til det beskrevne arbejde: Jacob Arnbjerg, Emiliano Cló, Elsa S. Gonçalves, Kurt V. Gothelf, Sonja Jensen, Mette Johnsen, Mikkel Jørgensen, Markus Klinger, John D.C. Lambert, Kurt V. Mikkelsen, Christian B. Nielsen, Lars Nikolajsen, Peter R. Ogilby, Nickolass B. Schack, Esben Skovsen og John W. Snyder.

E-mail adresse:
Peter R. Ogilby: progilby@chem.au.dk

Kilder

- J.W. Snyder, I. Zebger, Z. Gao, L. Poulsen, P.K. Frederiksen, E. Skovsen, S.P. McIlroy, M. Klinger, L.K. Andersen og Peter R. Ogilby, *Singlet Oxygen Microscope: From Phase-Separated Polymers to Single Biological Cells*, Acc. Chem. Res., in press, online på <http://pubs3.acs.org/acs/journals/toc.page?incoden=achre4>
L.K. Andersen, Z. Gao, P.R. Ogilby, L. Poulsen, I. Zebger, *A Singlet Oxygen Image with 2.5 μm Resolution*, J. Phys. Chem. A **2002**, 106, 8488-8490.
I. Zebger, L. Poulsen, Z. Gao, L.K. Andersen, P.R. Ogilby, *Singlet Oxygen Images of Heterogeneous Samples: Examining the Effect of Singlet Oxygen Diffusion across the Interfacial Boundary in Phase-Separated Liquids and Polymers*, Langmuir **2003**, 19, 8927-8933.
I. Zebger, J.W. Snyder, L.K. Andersen, L. Poulsen, Z. Gao, J.D.C. Lambert, U. Kristiansen, P.R. Ogilby, *Direct Optical Detection of Singlet Oxygen from a Single Cell*, Photochem. Photobiol. **2004**, 79, 319-322.

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Nu er vi her !
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

Thermo
ELECTRON CORPORATION

