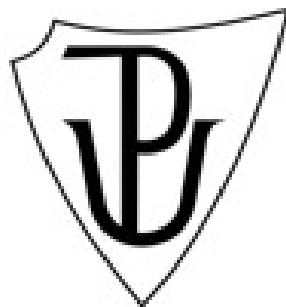


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Chemiluminiscenční excitace fotosenzibilizátorů

Chemiluminescent excitation of photosensitizers

Vypracoval:

Martin Drong

Studijní obor:

Ekochemie

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martina Bancířová, Dr.

Děkuji vedoucí bakalářské práce, Mgr.Martině Bancířové, Dr., za ochotu, laskavou pomoc a za čas, který mi během experimentální i teoretické části práce věnovala.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Martiny Bancířové, Dr., za použití literatury uvedené v seznamu v závěru práce.

V Olomouci dne 15. 8. 2010

.....

Souhrn

Podstata fotodynamického jevu je založena na principu excitace fotosenzitivní látky světelným zářením za přítomnosti kyslíku. Excitovaná fotosenzitivní látka pak předá svou energii kyslíku, který pak může přejít do několika reaktivních forem. Tyto formy se v organismu běžně nacházejí, avšak jejich koncentrace je kontrolována enzymy a jinými antioxidačními látkami. Při fotodynamickém jevu se vyprodukuje takové množství těchto reaktivních forem, z nichž je nejreaktivnější singletní kyslík, že způsobuje destrukci mnohých bílkovin, lipidových membrán, DNA a celých buněčných struktur. Tohoto jevu se využívá v medicíně k cílenému ničení tumorů nebo i méně závažných nemocí. V současnosti je běžnou praxí excitace fotosenzibilizátorů lasery či jinými externími zdroji. Tato práce se týká chemiluminiscenční excitace těchto fotosenzibilizátorů, která má řadu výhod, jako je třeba lepší dostupnost k hluboko napadené tkáni. Chemiluminiscence je chemická reakce, při které určitá sloučenina získá přebytek energie a tento pak vyzáří v podobě světla. Pro tuto práci byla chemiexcitace provedena pomocí luminolu a jeho katalytických reakcí, které patří k z nejznámějším a nejpoužívanějším sloučeninám. Chemiexcitační směsi luminolu pak byly využity k excitaci fotosenzibilizátorů. Chemiluminiscence těchto směsí v různých kombinacích směsí a fotosenzibilizátorů byla měřena na přístroji Berthold Sirius 2C. Tento přístroj je schopen luminiscenci měřit prostřednictvím tzv. relativní luminiscence. Výsledky poukázaly na to, že chemiluminiscence byla v některých případech silně ovlivněna přítomností fotosenzibilizátoru a katalyzátory měly vliv na způsob jakým reakce probíhá. Jaké reaktivní formy vznikají a zda bude možné chemiluminiscenční excitace využít k destrukci živých buněk bude studováno v navazující práci.

Abstract:

The principle of photodynamic effect is based on excitation of photosensitizer by light in the presence of oxygen. Excited state of photosensitizer transfers its energy to oxygen. This act leads to forming oxygen reactive species. These reactive forms generally occur in organism but its concentrations are under the control of enzymes and antioxidants. Photodynamic effect produces enormous concentration of ROS, singlet oxygen is the most reactive, which can lead to destruction of protein, lipide membranes, DNA and cellular structures. This effect is used for tumor a diseases treatment. Photosensitizers are generally excited by lasers or other similar external sources of light. The aim of this work is chemiluminescent excitation of photosensitizers which has a lot of advantages like availability to treat tumors located deeper in the human body. Chemiluminescence is chemical reaction when certain compound acquire excess energy which subsequently emit as a visible light. In this work was as a light emitter used luminol and its oxidations which are the most known and most widely used. Its chemiexcitation systems were used to excite photosensitizers. Combined reaction systems were subsequently measured using Berthold Sirius 2C luminometer. This instrument measures chemiluminescence in relative luminescence using photon counting detector. Results refered that chemiluminescence were in some cases induced by photosensitizers and type of used catalyst induced reaction way. What reactive oxygen species forms and the possibility of destructive effect on living organisms will be studied in consequential work.

Obsah:

SOUHRN	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM ZKRATEK	VII
ÚVOD	VIII
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Kyslík	10
2. Reaktivní formy kyslíku z pohledu živého organismu	11
2.1. Radikálové reaktivní formy kyslíku.....	12
2.1.1. Superoxidový aniont radikál.....	12
2.1.2. Hydroxylový radikál.....	14
2.2. Reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy.....	15
2.2.1. Peroxid vodíku.....	15
2.2.2. Singletní kyslík.....	15
3. Fotodynamický jev	17
3.1. Chemiluminiscence.....	19
3.2. Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí.....	19
3.3. Fotodynamická terapie.....	22
3.4. Fotosenzibilizátory a luminofory.....	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4. Cíl práce	26
5. Materiál a metody	26
5.1. Chemikálie.....	26
5.2. Přístrojové vybavení.....	27
5.3. Pracovní postupy.....	28
6. Výsledky a diskuze	32
7. Závěr	43
8. Summary	44
SEZNAM LITERATURY	45

Seznam zkratek

BL.....	bioluminiscence
CL.....	chemiluminiscence
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
EY.....	eosin yellowish, žlutý eosin
HRP.....	horseradish peroxidase, křenová peroxidasa
lumper...	směs luminolu $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ a peroxidu vodíku 0,1M
MB.....	methylene blue, methylenová modř
P.....	fotosenzibilizátor
PACT...	photodynamic antimicrobial chemotherapy
PBS.....	phosphate buffer saline, fosfátový pufr pH 7,4
perlum...	směs peroxidu vodíku 0,1M a luminolu $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$
RB.....	rose bengal, bengálská červeň
ROS.....	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SOD.....	superoxiddismutase, superoxiddismutasa

1. Úvod

Luminiscence je samovolné světelné záření, které na sebe poutalo pozornost lidí odpradáвна. Tento jev byl pozorován již před více než 2000 lety. Ve většině případů se jednalo o bioluminiscenci, čili luminiscenci pocházející ze živých organismů. Postupem času a vývojem zkoumání byla luminiscence rozdělena do několika kategorií podle zdroje, který jí způsobuje - například externí světelný zdroj, průchod elektrického proudu, tepelné záření a další. Dnes již tedy známe např. fotoluminiscenci, elektroluminiscenci, nebo termoluminiscenci. Tato práce ale bude věnována chemiluminiscenci, což je emise světelného záření, způsobená chemickou reakcí. Je-li světlo absorbováno určitými látkami tzv. fotosenzibilizátory, za přítomnosti kyslíku dochází k fotodynamickému jevu. Při tomto jevu dochází k oxidaci nejruznějších molekul (včetně biomolekul), což způsobují reaktivní formy kyslíku, které při fotosenzibilizované reakci vznikají. Fotodynamický jev našel uplatnění při fotodynamické terapii, která je neinvazivní metodou léčby nádorů, včetně některých druhů rakoviny. Tato práce bude zaměřena na studium vzniku světla chemickými reakcemi a následnou senzibilizaci některými známými organickými barvivy. Tato barviva již v praxi podobné uplatnění našla, avšak poprvé bude provedena snaha o jejich excitaci chemiluminiscencí.

Teoretická část

1. Kyslík

Kyslík je nejrozšířenějším prvkem na Zemi. Nachází se v hydrosféře, litosféře, atmosféře a biosféře. V atmosféře se nachází ve formě dvouatomových a tříatomových molekul O_2 respektive O_3 . Obě sloučeniny jsou plynného skupenství, zkapalněný kyslík má světle modrou barvu. Jeho přítomnost je nezbytná pro existenci živých organismů [1].

Kyslík jako chemický prvek se nachází v VI. hlavní skupině periodické tabulky prvků, tzn. má 6 valenčních elektronů. Elektronová konfigurace je $1s^2, 2s^2, 2p^4$. Molekula dikyslíku - složka vzduchu, který dýcháme je řazen mezi volné radikály, protože má dva nepárové elektrony. Elektrony mají paralelní spin, každý elektron se nachází v jiném protivazebném orbitalu. Celkové spinové číslo molekuly je $S=1$ podle vztahu (1)

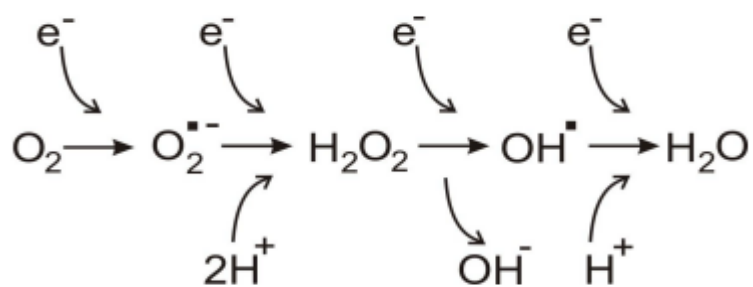
$$S = (m \cdot (+1/2) + n \cdot (+1/2)) \quad (1)$$

$+1/2$ značí spinová kvantová čísla, u obou znaménko $+$, protože se jedná o spiny stejné orientace. Multiplicita $(2S + 1) = 3$ - tzn. základní stav molekulárního kyslíku, který dýcháme je tripletní a je zodpovědný za to, že neshoříme. Konkrétně se jedná o pravidlo zachování spinu nebo také spinový zákaz, který říká, že spinově zakázané jsou všechny reakce, při nichž se mění celkový počet nepárových elektronů v systému. Podle termodynamiky mohou komplexní organické sloučeniny lidského těla ihned spalovat kyslík ze vzduchu. Avšak pokud by měl kyslík oxidovat molekulu přímo přijetím jejího elektronového páru, oba tyto elektrony by musely mít spiny opačné ke spinům nepárových elektronů v molekule kyslíku, tak aby se hodily do volných míst v orbitalech O_2 [2]. Oxidace kyslíkem se nazývá hoření a kyslík samotný se přímo slučuje s většinou prvků za vzniku oxidů. Kyslík je přítomen v široké škále sloučenin mezi nimiž je nejznámější voda, peroxid vodíku či organické alkoholy. V laboratoři se kyslík připravuje tepelným rozkladem anorganických sloučenin následujícími reakcemi (2,3,4).

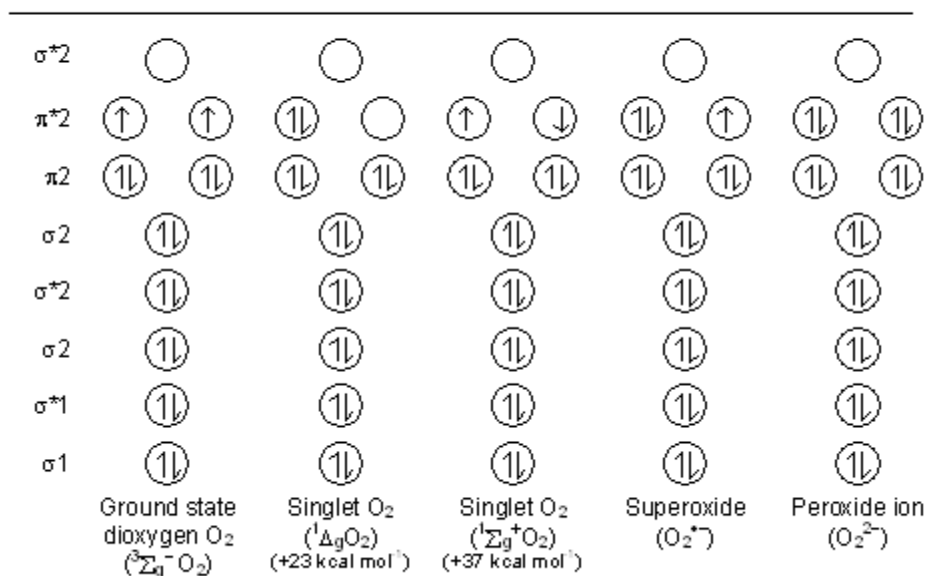


2. Reaktivní formy kyslíku z pohledu živého organismu

Reaktivní formy kyslíku (ROS) nás denně obklopují, nachází se v našem organismu, aby plnily některé důležité funkce. Mohou regulovat, urychlovat nebo zpomalovat mechanismy v živých organismech, mohou však také působit destruktivně. Člověk se jim brání díky enzymům a endogenním antioxidantům, existují však také další (vitaminy C, E, β -karoten, resveratrol, katechiny, bílkoviny a chelátotvorné látky vázající přechodné kovy, aj.). Porušení rovnováhy mezi ROS a antioxidanty se nazývá oxidativní stres, který je příčinou mnoha nemocí [3]. Reaktivní formy kyslíku odvozujeme od reakce redukce kyslíku na vodu (Obr.1). V dýchacím řetězci mitochondrií se kyslík účinkem cytochromoxidasy přemění přijetím čtyř elektronů a čtyř vodíkových protonů na dvě molekuly vody, pokud však dojde pouze k částečné redukci kyslíku (dostane méně elektronů), vznikají reaktivní formy kyslíku s názvy superoxidový anion radikál, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál. Tyto se mohou vytvářet při všech reakcích přenosu elektronu na kyslík. Přibližně 1-3% kyslíku spotřebovaného organismem se následně přemění na reaktivní formy [4]. Reaktivní formy kyslíku dělíme na radikálové a neradikálové. Radikálové reaktivní formy pak můžeme definovat jako jakékoli formy schopné samostatné existence mající jeden nebo více nepárových elektronů [1]. Některé z reaktivních forem jsou zobrazeny na obr. 2 [5].



Obr. 1 Postupná redukce kyslíku na vodu



Obr.2 Příklady některých reaktivních forem kyslíku a jejich elektronové konfigurace

2.1. Radikálové reaktivní formy kyslíku

Radikály jsou reaktivní formy, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Mezi jejich zástupce patří superoxidový anion radikál $O_2^{\bullet-}$, hydroxylový radikál OH^\bullet , peroxy ROO^\bullet , alkoxy, RO^\bullet a hydroperoxy, HO_2^\bullet , oxid dusnatý NO^\bullet

2.1.1. Superoxidový anion radikál

Přijetím jednoho elektronu kyslíkem se vytváří superoxidový anion radikál, který má jeden nepárový elektron. Jeho protonizovaná forma se nazývá hydroperoxylový radikál HO_2^\bullet . Je silným oxidačním činidlem, ale může působit také redukčně za ztráty jednoho elektronu a vzniku molekulárního kyslíku. McCord a Fridovich objevili enzym, který se zdá být specifickým akceptorem elektronů superoxidového radikálu - superoxidodismutasa. To pak vedlo k předpokladu, že superoxidový radikál je hlavní faktor zodpovědný za toxicitu

kyslíku a že superoxidodismutasa je důležitou antioxidační obranou [1], [6]. SOD katalyzuje dismutaci $O_2^{\bullet -}$ za vzniku molekulárního kyslíku a peroxidu H_2O_2 , což zobrazuje rovnice (5).



Tato antioxidační role superoxidodismutasy je podporována širokou škálou důkazů včetně výsledků dosažených za použití technik moderní molekulární biologie. Superoxid se tvoří v těle několika cestami [1], [6].

Hlavním zdrojem $O_2^{\bullet -}$ je elektronový transportní řetězec v mitochondriích a endoplasmatickém retikulu. Některé elektrony z řetězce uniknou přímo z nosiče na kyslík, a protože kyslík přijímá elektrony postupně po jednom, vzniká superoxidový radikál. Těchto elektronů unikne méně než 5%, ale číslo roste při zvýšené koncentraci kyslíku. Toxicita nadbytku kyslíku tedy může být přičiněna zvýšenou produkcí superoxidového radikálu. Superoxidový radikál je produkován také fagocytujícími buňkami a hraje důležitou roli v mechanismu, který zabíjí nadbytečná množství bakterií [1], [2].

Nadměrná aktivita fagocytujících buněk může vést k ničení radikálů za přítomnosti NADPH oxidasového komplexu, který katalyzuje reakce vzniku superoxidového anionu. Z $O_2^{\bullet -}$ se pak tvoří další reaktivní formy, jako je peroxid vodíku a z něj se následně uvolňuje za působení dalšího enzymu kyselina chlorná, singletní kyslík a hydroxylový radikál, který napadá všechny biomolekuly včetně DNA. Při těchto reakcích stoupá spotřeba kyslíku ve fagocytující buňce a tomuto procesu říkáme oxidativní vzplanutí.

Důkazy podporující superoxidovou teorii o toxicitě kyslíku jsou značné, ale přesný mechanismus, kterým by údajná zvýšená produkce superoxidového radikálu při nadbytku kyslíku mohla vést k uplatnění toxických účinků, není kompletně znám. Superoxidový radikál je také schopen inaktivace NADH dehydrogenasového komplexu mitochondriálního elektronového transportu *in vitro*, ačkoli *in vivo* ještě demonstrována nebyla [1], [2]. Proto také počet cílů u savčích buněk, které by byly citlivé na superoxidový radikál je malý. Za určitých okolností je kontrolovaná produkce superoxidového radikálu užitečný proces, například ve dříve zmiňovaném mechanismu zabíjením fagocytů. Je prokázáno, že několik typů buněk jako fibroblasty, lymfocyty a vaskulární endotelové buňky

produkují a uvolňují malá množství superoxidového radikálu ve fyziologických reakcích. $O_2^{\bullet -}$ tak patří mezi tři hlavní reaktivní formy společně s peroxidem vodíku a hydroxylovým radikálem [4].

2.1.2. Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál vzniká při reakci železnatých iontů s peroxidem vodíku tzv. Fentonovou reakcí (6):



Hydroxylový radikál zřejmě není jediným ničivým radikálem, který se touto reakcí utváří, ačkoli jeho vznik je dobře popsán. Iniciujícím produktem je zřejmě další vysoce oxidující forma ferryl, železo-kyslíkový komplex, který se následně rozkládá a pak teprve vzniká hydroxylový radikál. S peroxidem také reagují měďnaté ionty, které formují hydroxylový radikál $\bullet OH$. Ten reaguje obrovskou rychlostí s téměř každou molekulou nacházející se v živém organismu, včetně DNA, membránových lipidů a uhlovodíků. Toxické působení na většinu, ne-li na všechny savčí buňky, se týká i poškození DNA. V závislosti na typu studované buňky mohou být některá nebo všechna z těchto poškození v DNA nebo její blízkosti zprostředkovaná reakcí peroxidu s železnatými nebo měďnatými ionty za vzniku hydroxylového radikálu. Cytotoxický účinek $\bullet OH$ spočívá v jeho schopnosti odtrhnout vodík z biomolekul, nebo v jeho adici na dvojně vazby. Primárním místem ataku jsou zejména aromatické kruhy aminokyselin. Další devastující účinek $\bullet OH$ je působení na membránové lipidy. Mnoho reaktivních forem, které vznikají kombinací superoxidového radikálu, peroxidu a železnatých nebo měďnatých iontů jsou schopné lipidové peroxidace [4].

2.2. Reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy

Neradikálovými kyslíkovými formami, tedy molekulami bez volného nepárového elektronu, jsou peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná HClO , ozon O_3 a singletní kyslík $^1\text{O}_2$

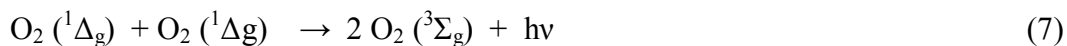
2.2.1. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku vzniká dvouelektronovou redukcí kyslíku nebo samovolnou dismutací superoxidového aniontu. Peroxid vodíku je jeden z hlavních oxidantů v buňkách, tkáních a sekretech, ačkoli ne nejreaktivnější. Má mnohé biologické funkce, místní koncentrace musí být pozorně kontrolovány, pro umožnění správné funkce systémů, aby nedošlo k nechtěným poškozením. Kontrola hladiny peroxidu je komplexní proces, který zahrnuje syntézu jeho prekurzoru – superoxidového radiálu. Superoxiddismutasa odstraňuje superoxidový radikál redukcí na peroxid vodíku, jak již bylo uvedeno výše. V těle se nachází také několik enzymů, které produkují peroxid vodíku. Peroxid může vystupovat jako oxidační činidlo. Na rozdíl od superoxidového radikálu může H_2O_2 dobře procházet buněčnými membránami. Peroxid vodíku není klasifikován jako radikál, protože nemá nepárové elektrony [7].

2.2.2. Singletní kyslík

Singletní kyslík se vyskytuje ve dvou excitovaných stavech $^1\Delta_g$ s nižší energií ($\lambda_{\text{max}} = 1268,7 \text{ nm}$) a $^1\Sigma_g$ s vyšší energií ($\lambda_{\text{max}} = 762,1 \text{ nm}$). $^1\Delta_g$ je látka diamagnetická, neboť dodáním excitační energie kyslíku v základním stavu dochází ke spárování valenčních elektronů. $^1\Sigma_g$ má dva nepárové elektrony opačného spinu v odlišných orbitalech [8].

Její doba života je v plynné fázi 3000 s u stavu $^1\Delta_g$ a asi 7 – 12 s u stavu $^1\Sigma_g$. Ve vodě asi 4 μs u stavu $^1\Delta_g$ $10^{-4} \mu\text{s}$ u stavu $^1\Sigma_g$. Doba života stavu $^1\Sigma_g$ ve vodném roztoku je tak krátká, že se předpokládá, že chemických reakcí se účastní pouze stav $^1\Delta_g$, který ihned vzniká ze stavu $^1\Sigma_g$. Při přechodu singletního kyslíku do základního stavu dochází k chemiluminiscenci, a to buď chemiluminiscenci bimolekulární emisí (7) a nebo mononukleární emisí (8):



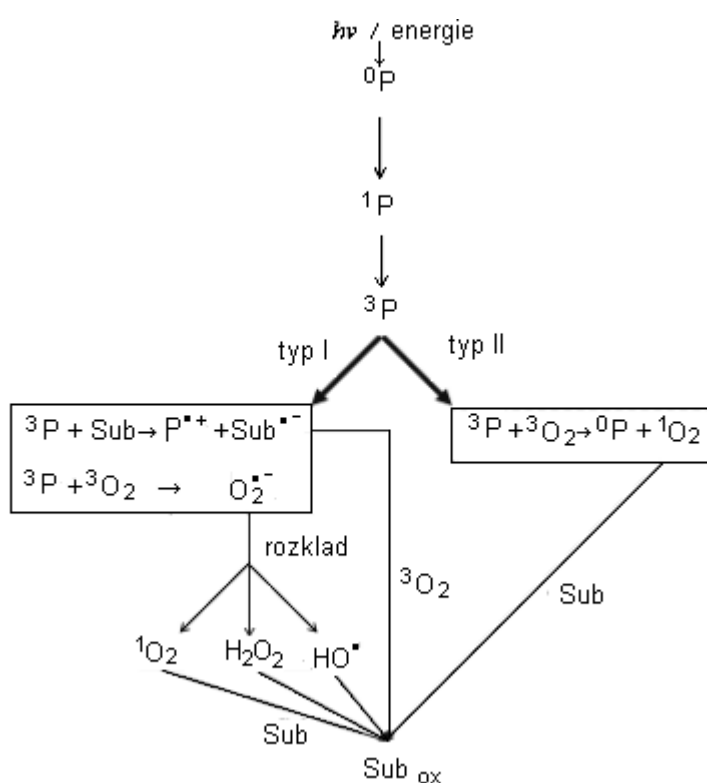
Jedná se o zakázané přechody, proto je doba života excitovaných stavů v plynné fázi, kde nedochází ke srážkám s dalšími molekulami, dlouhá. V roztocích je excitovaný kyslík díky srážkám s molekulami rozpouštědla mnohem více deaktivován nežádivou cestou [6]. Příkladem vzniku $^1\text{O}_2$ fyzikálním procesem je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je např. klasická reakce chlornanu s peroxidem vodíku. V biologických systémech produkují $^1\text{O}_2$ některé peroxidasy. Mimořádný význam pro tvorbu $^1\text{O}_2$ mají fotosenzitizované reakce, na něž se v naší práci soustředíme. Fotosenzibilizátor P (např. námi použitá methylenová modř, bengálská červeň, eosin Y, atd.) může být excitována ultrafialovým, viditelným a nebo vysokoenergetickým zářením a pak předá svou energii kyslíku v základním stavu [9], rovnice (9),(10):



Doba života excitovaného stavu fotosenzibilizátoru musí být dostatečně dlouhá, aby zhášení kyslíkem bylo hlavním deaktivčním procesem a uvolněná energie při zhášení fotosenzibilizátoru musí být dostatečná pro excitaci kyslíku. Senzibilizátory s absorpčním maximem ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti podporují vznik $^1\Sigma_g$ stavu kyslíku, zatímco barviva s absorpcí v dlouhovlnné oblasti poskytují převážně $^1\Delta_g$ stav. Senzibilizátory jsou účinné již při velmi nízkých koncentracích, protože jedna molekula senzibilizátoru může opakovaným přenosem energie produkovat mnoho molekul $^1\text{O}_2$ [10].

3. Fotodynamický jev

Role jednotlivých reaktivních forem v organismu byla popsána výše. K jejich cílenému vzniku dochází při fotodynamickém efektu, který probíhá reakcí světla a fotosenzibilizátoru za přítomnosti kyslíku. Děje se tak excitací fotosenzibilizátoru. Fotosenzibilizátor je excitován světlem a zpět do svého základního stavu se vrací dvěma možnými způsoby – mechanismy. Schéma tohoto jevu je znázorněno na obr. č.3 a dále je popsán.



Obr. č. 3 Fotosenzibilizovaná reakce

Jakmile fotosenzibilizátor 0P absorbuje energii nebo světlo, prochází excitovanými stavy 1P (singlet) a následně mezisystémovým křížením do nejnižšího tripletního 3P . Tento tripletní stav se následně může deaktivovat několika cestami, které si vzájemně konkurují. První z nich, typ I, je přenos elektronu z 3P na substrát s vhodnými oxidoredukčními vlastnostmi. Produkují se pak intermediáty

fotosenzibilizátoru a substrátu radikálového typu ($P^{\bullet+}$ a $Sub^{\bullet-}$ na obr. 4), které mohou reagovat s dalšími přítomnými substráty nebo molekulami rozpouštědla a kyslíku. Reakcí radikálu fotosenzibilizátoru nebo substrátu s kyslíkem vznikají konečné oxidované produkty. Zvláštní případ nastává, pokud je akceptorem elektronu kyslík. Ten poskytuje superoxidový anion radikál $O_2^{\bullet-}$, který je schopen reagovat s většinou molekul v organismu, ale chová se pouze jako slabý antioxidant. Reaguje však s některými enzymy, které zvyšují hladinu železa a dochází tak k Fentonově reakci (6), což zvyšuje oxidativní stres a další poškozování buněk. Ve vodném prostředí za vhodných podmínek navíc může superoxid přecházet v singletní kyslík, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál, což zvyšuje oxidativní účinek této reakce, reakce typu I. [11], [12].

Mechanismus typu II je považován za hlavní cestu způsobující fotooxidativní poškození buňky. Vyznačuje se přenosem energie z 3P na jakýkoliv substrát, jehož energie tripletního stavu leží na nižší hladině než tripletní stav reagujícího senzibilizátoru. Mnoho složek buněčné hmoty má však energii tripletního stavu relativně vysokou a není tudíž schopno 3P zhaset. Jednou z výjimek je molekula kyslíku. Ta excitovaný tripletní stav fotosenzibilizátoru zhasí velmi účinně, čímž přechází do svého singletního stavu, jehož energetická hladina leží pouze o 94,1 kJ nad jejím základním tripletním stavem. Singletní kyslík 1O_2 vykazuje vysokou cytotoxicitu, která je způsobena jeho dlouhou dobou života (3-4 μs ve vodných prostředích a několik desítek mikrosekund v lipidech). Oxidačně reaguje zejména s nenasycenými biomolekulami a poskytuje tak jejich značně labilní peroxidy a hydroperoxidy. V obou mechanismech fotosenzibilizace dochází ke tvorbě elektrofilních částic, což činí elektronově bohaté biomolekuly přednostním centrem ataku. Reakce primárních ROS ($O_2^{\bullet-}$, HOO^{\bullet} , H_2O_2 , 1O_2) s biomolekulami vedou ke vzniku velkého počtu typů sekundárních radikálů způsobujících další cytotoxické poškození. Sekundární radikály skýtají pro buňku mnohem větší nebezpečí, neboť jsou iniciátory řetězových reakcí [11], [12].

3.1. *Chemiluminescence*

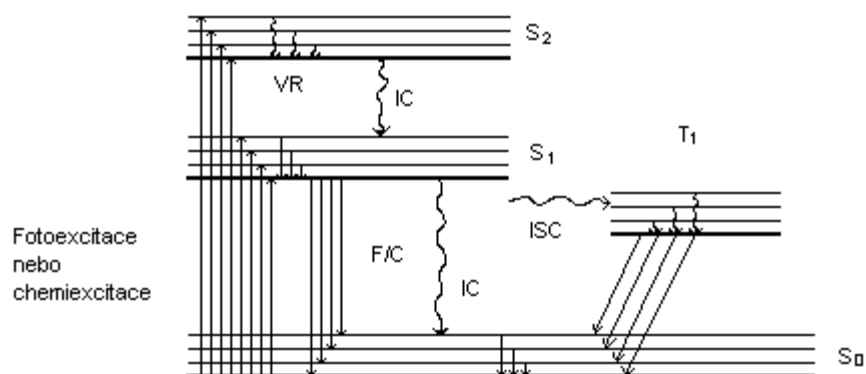
Chemiluminescence patří mezi luminiscence a má původ v bioluminiscenci. Světlo svatojánských mušek a jiné bioluminiscenční procesy v přírodě přitahovaly lidstvo od dávných dob. První psaná zmínka pochází z rukou Aristotela, který popisuje slabé světlo vyzařované houbami a mrtvými rybami. Boylova práce o kyslíku však otevřela nový horizont ve výzkumu bioluminiscence a chemiluminescence. Wiedermann v roce 1888 jako první definoval chemiluminescenci jako emisi světla způsobenou chemickou reakcí. První vědecká práce byla představena Duboisem, který představil termíny luciferin a luciferáza [13], [14].

Značný výzkum chemiluminescence a bioluminiscence začal na počátku 20. století. V roce 1905 publikoval Trautz první přehled známých CL reakcí a přisuzoval je aktivnímu kyslíku. Kautski popsal v roce 1922 emisi světla jako výsledek působení silných oxidantů na siloxany. Mallet, v roce 1927, poukázal na excitaci fluoroforů, jakými jsou např. eosin, fluorescein, anthracen a chinin, přenosem energie z reakce peroxidu vodíku s chlornanem. O rok později Albrecht představil studium oxidace luminolu, který je stále dominantou ve výzkumu na tomto poli. Časný výzkum CL a BL byl zaměřen hlavně na pozorování a výzkumu mechanismů. Později se objevily také analytické aplikace v literatuře a to na počátku 60. let 19. století [14].

3.2. *Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí*

Chemiluminescence je definována jako emise elektromagnetického záření (obvykle viditelné světlo nebo blízké IR) produkované chemickou reakcí. Pokud pochází emise z živého organismu nebo z chemického systému z něj odvozeného, nazývá se tento jev bioluminiscence. Oba fenomény - luminiscenční procesy jsou tradičně významné jak svou emisí světla, tak energetickými zdroji, které způsobují tuto elektromagnetickou radiaci. Při chemiluminiscenční reakci zpravidla vzniká jeden z produktů v excitovaném stavu a následně pak produkuje světlo při návratu do stavu základního. Jako můžeme vidět na schématu Jablonského diagramu

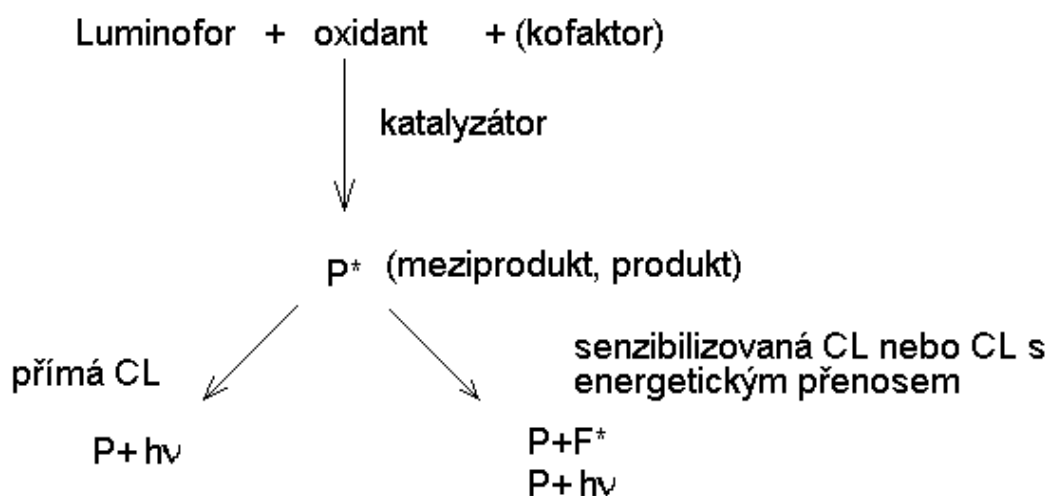
(obr.4), proces světelné emise při chemiluminiscenci je stejný jako při fotoluminiscenci, až na proces excitační. Při fluorescenci a fosforescenci jsou elektronové excitované stavy produkovány absorpcí ultrafialového nebo viditelného světelného záření, vrací se do základního stavu S_0 z nejnižšího singletního excitovaného stavu S_1 nebo z tripletního excitovaného stavu T_1 [14].



Obr.4: Jablonského schéma. S_0 základní singletní stav, S_1, S_2 excitované singletní stavy, T_1 excitovaný tripletní stav, F/C fluorescence/chemiluminiscence, P fosforescence, CD – kolizní deaktivace, IC- (S-S, T-T)vnitřní konverze, VR- vibrační relaxace, ISC – mezisystémové křížení S –T změna spinu

Chemiluminiscenční reakce může být uskutečněna dvěma základními mechanismy. V přímé reakci, dva reagenty, obvykle substrát a oxidant v přítomnosti nějakého kofaktoru, reaguje za vzniku produktu, případně meziprojektu v přítomnosti katalyzátoru. Některá z látek v procesu bude v elektronově excitovaném stavu, který následně relaxuje do stavu základního za vyzáření fotonů. Touto látkou je substrát, který je převeden do elektronově excitovaného stavu, zodpovědný za světelnou emisi nebo přenos energie při nepřímé chemiluminiscenci. Katalyzátory, enzymy nebo kovové ionty, snižují aktivační energii a poskytují potřebné adekvátní prostředí pro vysoký výtěžek chemiluminiscence. Kofaktory jsou někdy nezbytné pro převod jedné nebo více látek substrátů do forem schopných reagovat nebo interagovat s katalyzátorem, nebo aby poskytly volnou skupinu, jestliže je pro vznik excitovaného emitéru potřeba rozštěpit vazbu. Naopak, nepřímá nebo senzibilizovaná chemiluminiscence je založena na procesu přenosu energie z excitované látky na fluorofor. Tento proces umožňuje molekulám, které nemohou být přímo zapojené

do chemiluminiscenční reakce, přenést jejich nadbytek energie na fluorofor, který je postupně excitován, relaxuje do základního stavu za uvolnění fotonů [14], [15]..



Obr. č. 5 Schéma obou mechanismů oxidace luminoforu

- Reakce musí být exotermická, aby produkovala dostatek energie [14]
- Reakční cesta musí být příhodná pro vytvoření elektronově excitovaného stavu. V případě, že se energie ztratí jako teplo, do vibračních a rotačních pochodů, reakce nebude chemiluminiscenční. [14]
- Emise fotonů musí být příznivým deaktivčním procesem ke kompetitivním nežádivým procesům, které se mohou v malé míře také vyskytovat. V případě senzitivované chemiluminiscence jsou oba výtěžky energetického přenosu ze základních látek na fluorofor a také následná fluorescence důležité. [14]

3.3 Fotodynamická terapie

PDT využívá fotosenzibilizátoru, který se akumuluje v tumoru a může být aktivován vhodným světelným zdrojem, obecně laserem (monochromatický zdroj). Lze říci, že léčba je limitována potřebou světlo dostat dovnitř například optickými vlákny endoskopicky. Další zábranou je hloubka penetrace, která je omezená optickými vlastnostmi tumorové tkáně, obecně bývá 2-5 mm. Dostat se blíže k objemnějším tumorům je také technickým problémem kvůli lokaci a rozměrům. [16] Proto i tyto externí světelné zdroje často vypadávají ze hry a je nutno řešit problém jinak. Dostáváme se tak ke světlu chemickému, chemiluminiscenci konkrétně.

Fotodynamická terapie (PDT) je způsobem léčby lokalizovaných tumorů, např. rakovina na hlavě a krku, rakovina jícnu a maligní nádory na kůži. [17] Principem je vpravení fotosenzibilizátoru na pacientovo postižené místo a následné osvětlení viditelným světlem (nejčastěji dlouhovlnné červené světlo), což vede v přítomnosti kyslíku ke generaci jeho reaktivních cytotoxických forem, které pak ničí buňky a tkáně. Buňky pak umírají nebo podléhají apoptóze, naprogramované buněčné smrti. [18]

Důležité výhody fotodynamické terapie oproti jiným léčebným metodám jsou jistě malá invazivita oproti operaci. PDT je precizně cílená díky selektivní iluminaci a může být opakovaná několikrát. Pro její úspěšnou aplikaci je nutné použít vhodný fotosenzibilizátor. Ideální fotosenzibilizátor by měl být minimálně jedovatý pro organismus ve fázi, kdy na něj nepůsobí světlo, měl by se hromadit v cílené tkáni ve vysokých koncentracích a po ukončení fotodynamické terapie by měl, co nejdříve vyplaven z organismu, aby nedošlo k nežádoucím jevům způsobeným denním světlem. Mimo to by měl absorbovat vlnové délky vyšší než 600nm, aby byla zajištěna hluboká penetrace a v neposlední řadě je to vysoký výtěžek singletního kyslíku [14], [19].

3.4. Fotosenzibilizátory a luminofory

Většina fotosenzitivních látek používaných jak v klinické praxi, tak v laboratoři je odvozená od tetrapyrrolového aromatického jádra nalezeného v mnoha v přírodě běžně se vyskytujících pigmentech (hemový chlorofyl a bakteriochlorofyl).

Tetrapyrrolová barviva absorbují v relativně velkém pásmu v rozmezí od 400nm tzv. Soretův pás, pak jsou postupně menší absorpční pásy, až po červené vlnové délky, kterým se také říká Q- pásy.

Mezi tetrapyrrolová barviva dále patří porfyriny (absorbují okolo 630nm), chloriny (650-690nm, vysoké píky – žádané pro PDT), bakteriochloriny. Dalšími podrobně zkoumanými fotosenzibilizátory je skupina ftalocyaninů (popř. méně používané naftalocyaniny). Jejich nejzazší absorpční pás je okolo 650nm se slušnou výškou píku. Nevýhoda je ve zhoršené rozpustnosti a kumulativnosti, což se řeší jejich další úpravou.

Třetí skupina obsahuje čistě syntetické, v přírodě se nevyskytující, konjugované pyrrolové cyklické systémy. Spadají sem struktury jako texafyriny, porfyceny a sapfyriny.

Poslední skupinou jsou v přírodě se vyskytující barviva i barviva syntetická, která nejsou deriváty tetrapyrrolu. Patří sem hypericin (třezalka tečkovaná, přírodní), bengálská červeň (barvivo syntetické odvozené od fluoresceinu), methylenová modř (fenothiazinový derivát), eosin Y (barvivo syntetické odvozené od fluoresceinu).

Mnoho zástupců z těchto skupin, dělených podle struktury, již bylo, či stále je podrobováno testování pro využití v PDT – fotodynamickou terapii [16], [20].

Luminoforem je látka, která po předchozím dodání energie přejde do nestabilního excitovaného stavu a při návratu do stavu základního emituje světelné záření. Charakteristikou záření jsou pak 4 parametry – barva, intenzita, rychlost průběhu a doba průběhu. Mezi luminofoxy patří sloučeniny [14]:

- lofín a jiné indoly
- luminol a příbuzné acylhydrazidy
- peroxyoxaláty
- lucigenin a jiné akridiny
- mnohé další organické sloučeniny

Experimentální část

4. Cíl práce

Cílem práce je porovnat reakce chemiluminiscenčních směsí s fotosenzibilizátory a bez nich. Budeme porovnávat chemiluminiscenci luminolu bez použití oxidantů, bez použití katalyzátorů, chemiluminiscenci s oxidanty i katalyzátory. Naměřené hodnoty intenzity chemiluminiscence porovnáme mezi sebou a také s intenzitami, kdy směs reagovala se všemi třemi organickými barvivy eosinem, methylenovou modří nebo bengálskou červení. Veškerá měření budeme provádět na luminometru Berthold Sirius 2C. Roztoky byly přidávány do kyvet v dodržovaném pořadí a doplňovány byly fosfátovým pufrem o pH 7,4 na objem 1ml. Chemiluminiscenčním reagentem je luminol, jehož oxidace je nejznámější a nejprozkoumanější. Použitá organická barviva neboli fotosenzibilizátory, patří rovněž ke známým a našla již uplatnění v aplikacích jako dezinfekční fotosenzibilizátory, které pomocí PDT respektive její variantě PACT (fotodynamická antimikrobiální chemoterapie) dokáží ničit mikroorganismy. Zda-li toto bude možné po excitaci chemiluminiscenčním světlem, je předmětem tématu. Vzájemné reakce a výsledná chemiluminiscence bude porovnávána. Práce je první tohoto typu a také v první v řadě prací, které by se tímto tématem měly zabývat.

5. Materiál a metody

5.1 Chemikálie

- HRP- křenová peroxidáza typ II, 158 U/mg (Sigma Aldrich, USA),
- luminol sodná sůl (Sigma, Aldrich, USA)
- bengálská červeň (Sigma Aldrich, USA)
- methylenová modř 87% m/m (Sigma Aldrich, USA)
- eosin žlutý (Lachema n.p. Brno, Czech Republic)
- tetrahydrát chloridu železnatého (Fluka -Sigma Aldrich, Germany)
- pentahydrát síranu měďnatého (Sigma Aldrich, Germany)
- peroxid vodíku H₂O₂ 3% (Sigma Aldrich, USA)
- NaCl a KCl (Lachema, Chemapol Praha, Czech republic)
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O a KH₂PO₄ (Lach-Ner, Neratovice, Czech republic)
- Cl₂Fe · 4H₂O (Fluka -Sigma Aldrich, Germany)
- CuSO₄ · 5H₂O (Sigma Aldrich, Germany)

Zásobní roztoky:

Fosfátový pufr PBS - pH 7,4. Byl připraven pomocí chemikálií p.a čistoty

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno:

8 g NaCl,

0,20 g KCl

3,63 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O

0,24 g KH₂PO₄ [21]

pH bylo zjištěno pH metrem IQ a ustavilo se na požadované hodnotě 7,4. Roztok byl doplněn do 1 litru a byl skladován v lednici.

Zásobní roztoky barviv:

Připraveny rozpuštěním barviv v destilované vodě do 10 ml odměrné baňky v navážkách tak, aby požadovaná koncentrace byla vždy $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Zásobní roztok katalyzátorů a luminolu:

HRP, Cu²⁺, Fe²⁺ a luminol

$5 \cdot 10^{-6}$ M zásobní roztok HRP

$1 \cdot 10^{-4}$ M zásobní roztok železnatých iontů o koncentraci

$1 \cdot 10^{-4}$ M zásobní roztok měďnatých iontů

$2 \cdot 10^{-3}$ M zásobní roztok luminolu a pracovní roztok luminolu $2 \cdot 10^{-4}$ M

5.2. Přístrojové vybavení

- pH metr IQ 120 - P-Lab
- luminometr Berthold Sirius 2C

Chemiluminiscence byla měřena luminometrem od firmy Berthold Sirius 2C (obr.6). Speciální detektor pokrývá rozsah spektra od 370 do 630 nm.



Obr. č. 6 Luminometr Berthold Sirius 2C

Přístroj citlivě detekuje flash i glow luminiscenci a je určen k:

- Gen reporter testování (i duální testování)
- ATP testování
- testy aktivity mináž
- testování buněčného dělení a cytotoxicity
- kvantifikace nukleových kyselin
- luminiscenční imunotesty

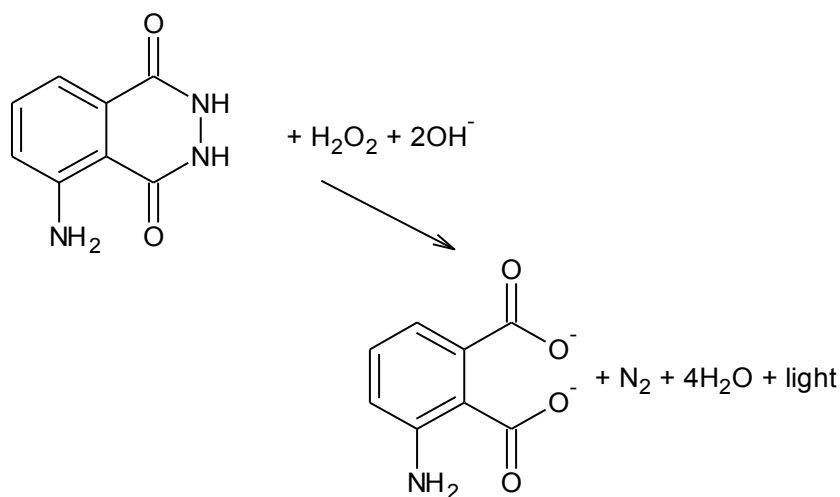
Dynamický rozsah přístroje je více než šest dekad beze změny přírůstku, což zaručuje linearitu přes celý rozsah. Naměřená data byla převedena pomocí softwaru s výstupem do tabulkového procesoru MS Excel, kde byla dále zpracována. (Popis přístroje dle výrobce)

5.3. Pracovní postup

Luminol jako substrát pro chemiluminiscenční reakce patří k nejznámějším (obr.7). Oxidace luminolu peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru Fe^{2+} a Cu^{2+} , které katalyzují rozklad peroxidu za vzniku kyslíkových radikálů se nazývá Fentonova reakce a byla zmiňována již dříve. Dané katalyzátory byly použity, protože rozkládají peroxid za vzniku reaktivních kyslíkových forem a díky katalýze přechodným kovem dovolují také vznik singletního kyslíku. Stejně tak katalyzovaná reakce H_2O_2 s HRP-křenovou peroxidasou patří mezi nejjednodušší ověřené systémy, při nichž vzniká světelná emise a křenová peroxidasa zvyšuje luminiscenci

až 1000 krát [22]. V tabulce 1 jsou vyznačeny všechny používané oxidanty a k nim příslušné katalyzátory. Těmito systémy pak budou excitovány fotosenzibilizátory - eosin žlutý (EY), bengálská červeň (RB) a methylenová modř (MB) (obr. 8,9,10). Následně budou porovnávány výsledky měření.

Na přístroji Berthold Sirius 2C byly změřeny hodnoty relativní luminiscence (také intenzita CL) – což je relativní počet fotonů připadající na interval vlnových délek za sekundu. Následně byla porovnána chemiluminiscence různých systémů. Každé měření bylo prováděno po dobu 1 minuty v intervalech 0,2 s. U řady roztoků různých koncentrací jsou zobrazeny hodnoty odečtené ve 0,2 s tak, aby nebyl výsledek ovlivněn případným okolním světlem po dověření dvířek přístroje. Každé měření bylo provedeno třikrát a jako výsledná hodnota spočítán průměr z těchto tří měření. U srovnávacích sloupcových grafů byla hodnota spočítána v čase 0,2 s. Fotosenzibilizátory byly postupně ředěny 1:10 v malých kyvetách a doplňovány pufrům PBS o pH 7,4. Nástřik luminolu byl 25 μ l pracovního roztoku do 1 ml roztoku v kyvetě. Nástřik peroxidu 100 μ l 3% zásobního roztoku do 1 ml roztoku v kyvetě a nástřik HRP byl 10 μ l vždy do 1 ml roztoku v kyvetě. Fotosenzibilizátor, pokud se účastnil, byl vždy v roztoku jako první a ostatní reagenty následují v popsaném pořadí.

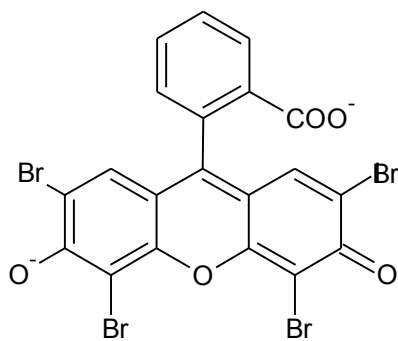


Obr. 7 Reakce luminolu s peroxidem vodíku za vzniku 3-aminofthalátu (vzniká nejdříve v tripletním ³T stavu a na konci reakce vyzáří světlo za současného přechodu do stavu základního singletního S₀ mezisystémovým křížením)

Oxidant	Katalyzátor
H ₂ O ₂	H ₂ S ₂ O ₈ peroxidáza [Fe(CN) ₆] ³⁻ hemové sloučeniny Ionty přechodných kovů Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Cr ³⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺ , VO ²⁺ chlornanový anion
O ₂	[Fe(CN) ₆] ³⁻ Fe ²⁺
chlornanový anion	
I ₂	
MnO ₄	
NO ₂	

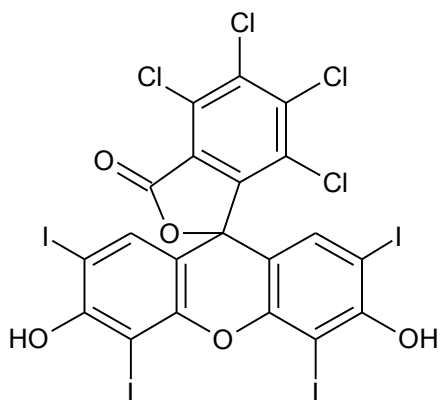
Tabulka 1: Oxidanty a katalyzátory

Eosin žlutý se používá se jako dezinfekční fotosenzitizér s antibakteriálními a antivirovými účinky. Dokonce se předpokládá, že se spolu s RB a MB vážou na vir HIV. Stejně jako další dvě barviva produkuje převážně singletní kyslík (kvantový výtěžek ~ 0,57). Kvantový výtěžek je dán poměrem počtu vzniklých nebo zaniklých částic ku počtu molů absorbovaných kvant záření.



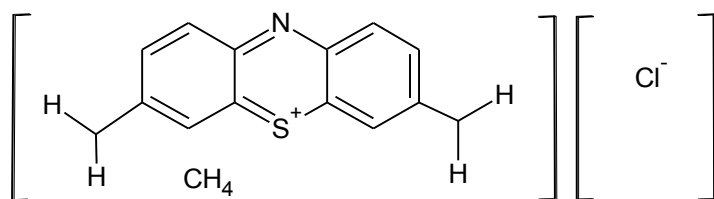
Obr. 8: Eosin žlutý (2',4',5',7'-tetrabromofluorescein)

Bengálská červeň má vysoký výtěžek singletního kyslíku ~ 0,75



Obr. 9: Bengálská červeň (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein)

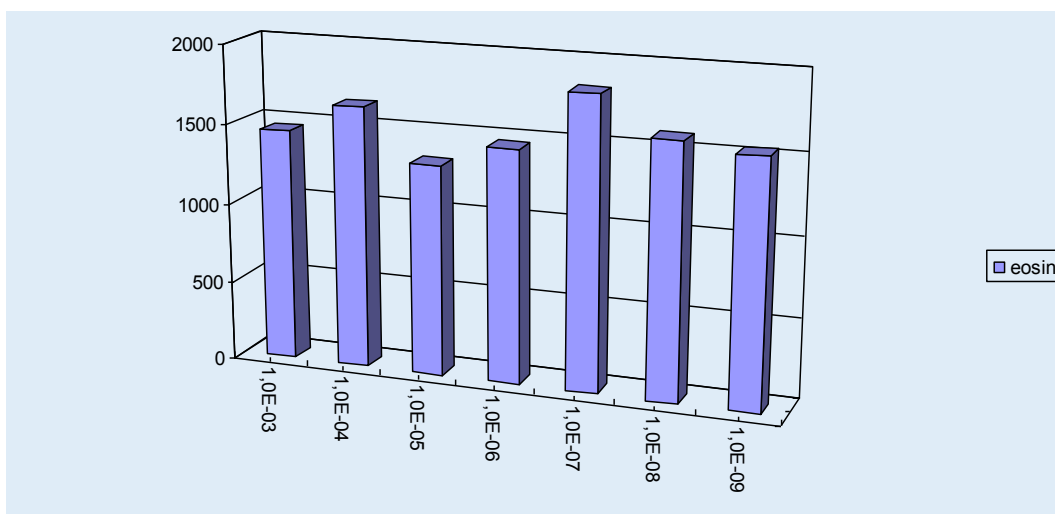
Methylenová modř (MB) je dlouho známým a používaným fotosenzibilizátorem s kvantovým výtěžkem singletního kyslíku ~ 0,5



Obr. 10: Methylenová modř (3,7-bis(Dimethylamino)-fenothiazin-5-ium chlorid)

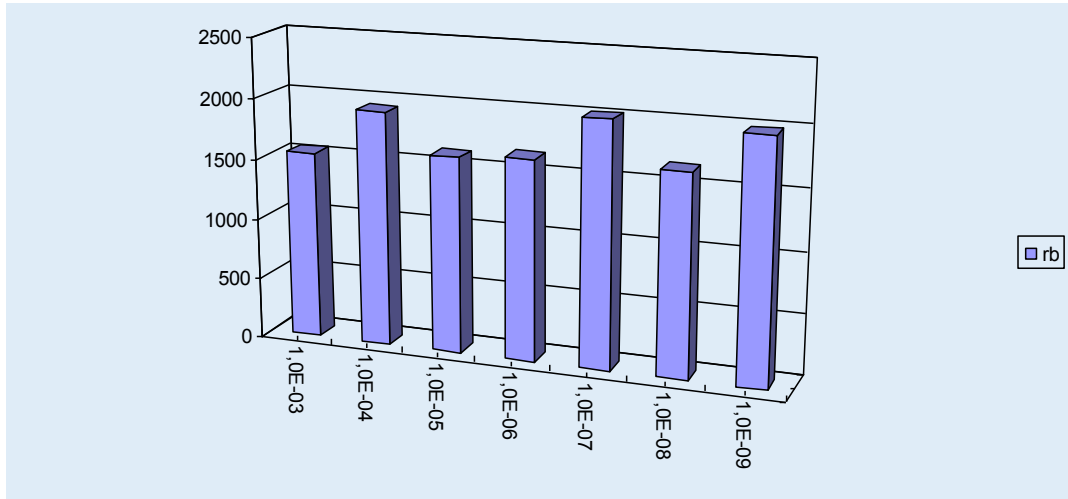
6. Výsledky a diskuze

Na grafu č. 1 je zobrazena chemiluminiscence žlutého eosinu. Osa x představuje jednotlivé koncentrace a osa y intenzitu luminiscence v relativních jednotkách. Nástřik byl proveden zásobním roztokem nejdříve 1ml $1.10^{-3}M$ zásobního roztoku a poté byl ředěn 1:10 a doplňován pufrem PBS 7,4. Byla tak získána řada až po $1.10^{-9}M$ eosinu. Hodnoty relativní chemiluminiscenční intenzity jsou vypočtené průměry ze tří měření, které byly odečtené v čase 0,2 s. Z grafu nelze poukázat na trend, který by popisoval vztah mezi změnou koncentrace a intenzitou chemiluminiscence.



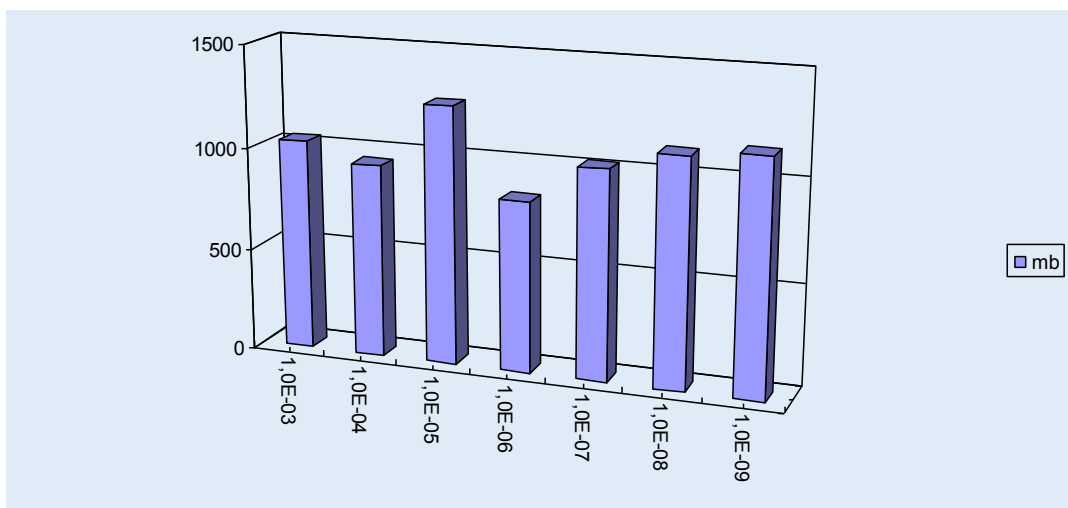
Graf č. 3 MB - CL intenzity žlutého eosinu od $1.10^{-3}M$ roztoku po $1.10^{-9}M$ roztok

Druhým grafem v pořadí je bengálská červeň. Postup byl stejný jako u eosinu. Výsledky jsou velmi podobné, chemiluminiscence je vyšší v průměru o 500.



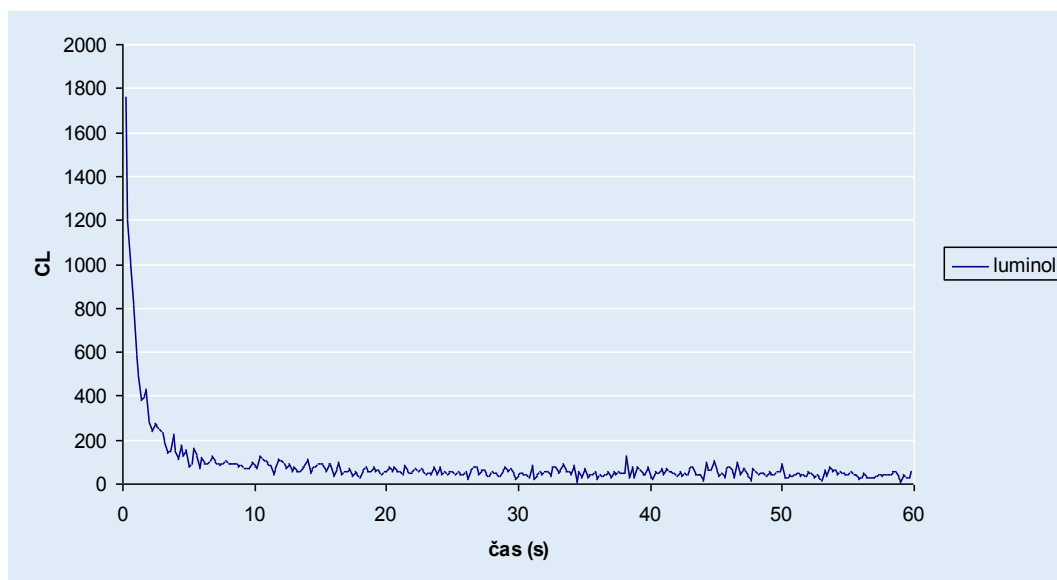
Graf č. 2 RB - CL intenzity bengálské červeně od 1.10^{-3} M roztoku po 1.10^{-9} M roztok

Poslední v pořadí byla měřena methylenová modř, jejíž CL byla poloviční oproti bengálské červeně

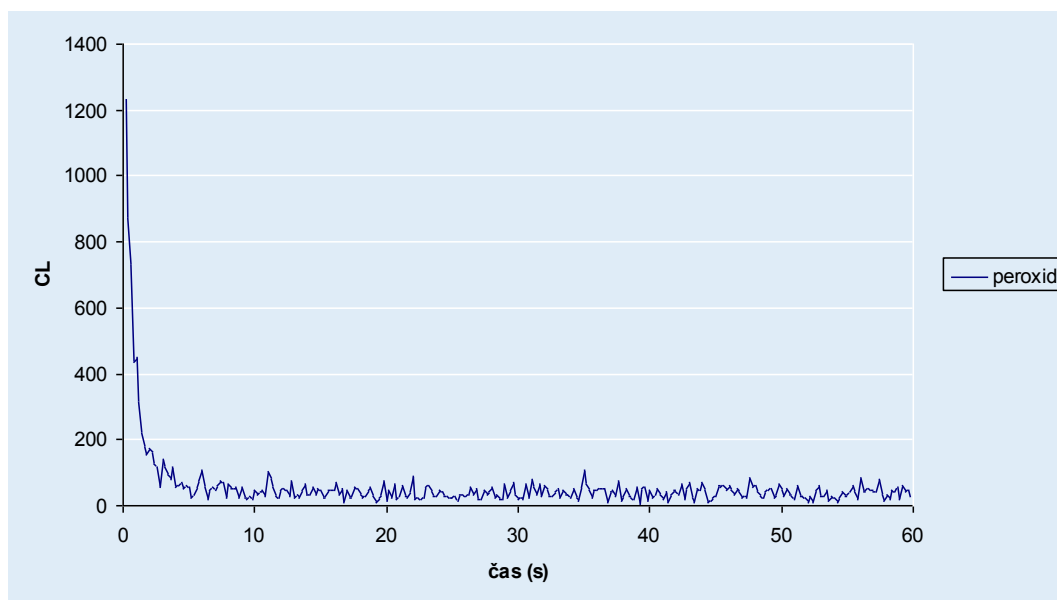


Graf č. 3 MB - CL intenzity methylenové modři od 1.10^{-3} M roztoku po 1.10^{-9} M roztok

Na grafu č. 4 je znázorněn průběh luminiscence samotného luminolu v PBS o pH 7,4 po dobu jedné minuty. První hodnota není součástí grafu, průběh začíná od 0,2 s. Nástřik byl proveden do pufru v dodržném pořadí. Na grafu č. 5 pak peroxid vodíku 3%.

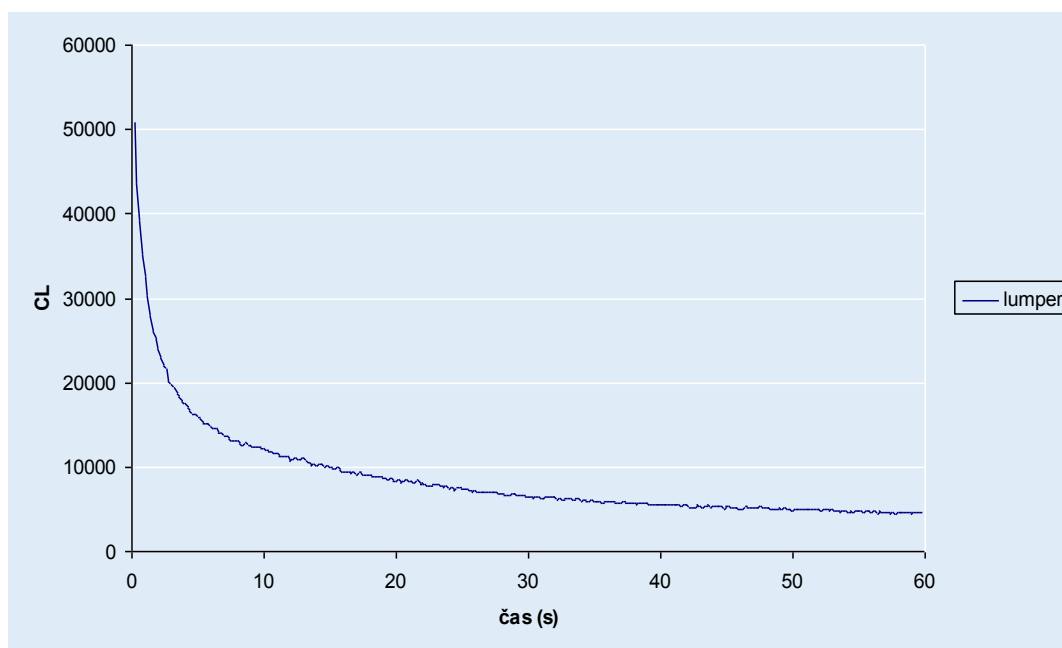


Graf č. 4 Luminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ luminolu - nástřik $25 \mu\text{l}$ pracovního roztoku luminolu do $975 \mu\text{l}$ PBS



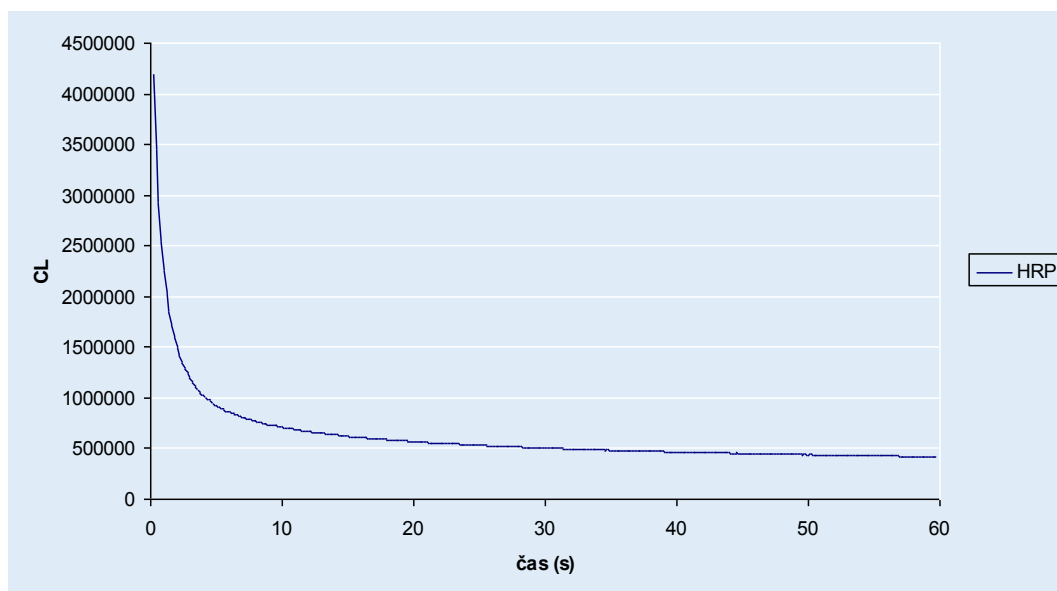
Graf č.5 Luminiscence $0,1 \text{M H}_2\text{O}_2$ - nástřik $100 \mu\text{l}$ zásobního roztoku $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ do $900 \mu\text{l}$ PBS

Následující graf č.5 zobrazuje průběh oxidace luminolu peroxidem. Objemy nástřiků byly 25 μl luminolu a 100 μl peroxidu. CL je cca 30krát vyšší než u samotných komponent. Peroxid vodíku rozkládá luminol za vzniku luminiscenčního produktu



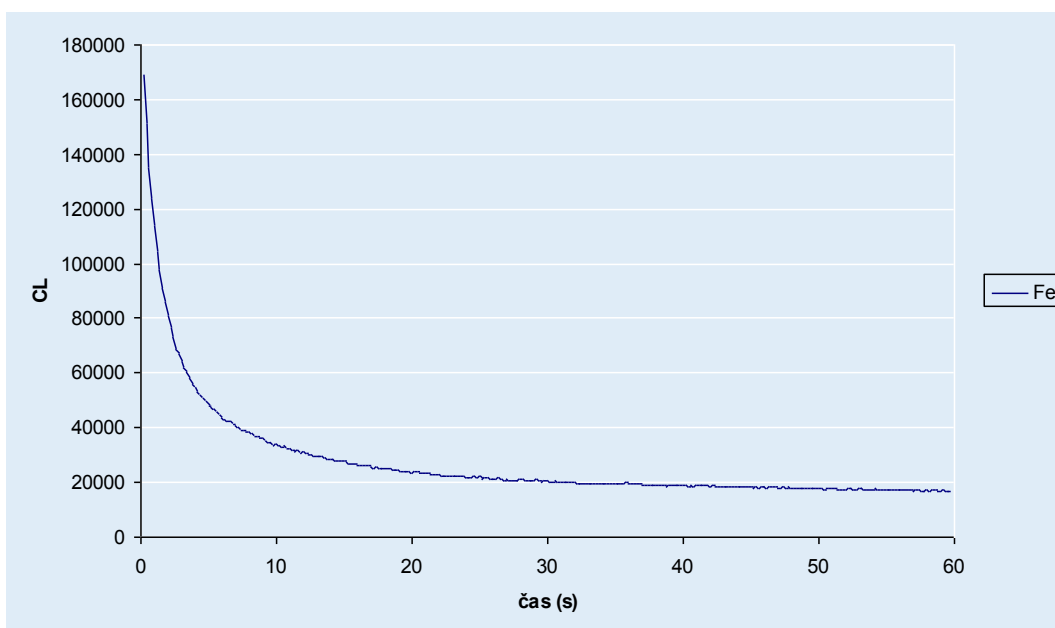
Graf č. 6 Křivka průběhu CL 25 μl luminolu a 100 μl peroxidu vodíku v PBS 7,4

Průběh katalyzované reakce představuje následující graf č. 7. Excitační směs luminol $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ - H_2O_2 $0,1 \text{M}$ – HRP $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$. Intenzita CL je o 5 řádů vyšší než u samotných reagentů luminolu a peroxidu a o 2 řády vyšší než směs luminolu a peroxidu.

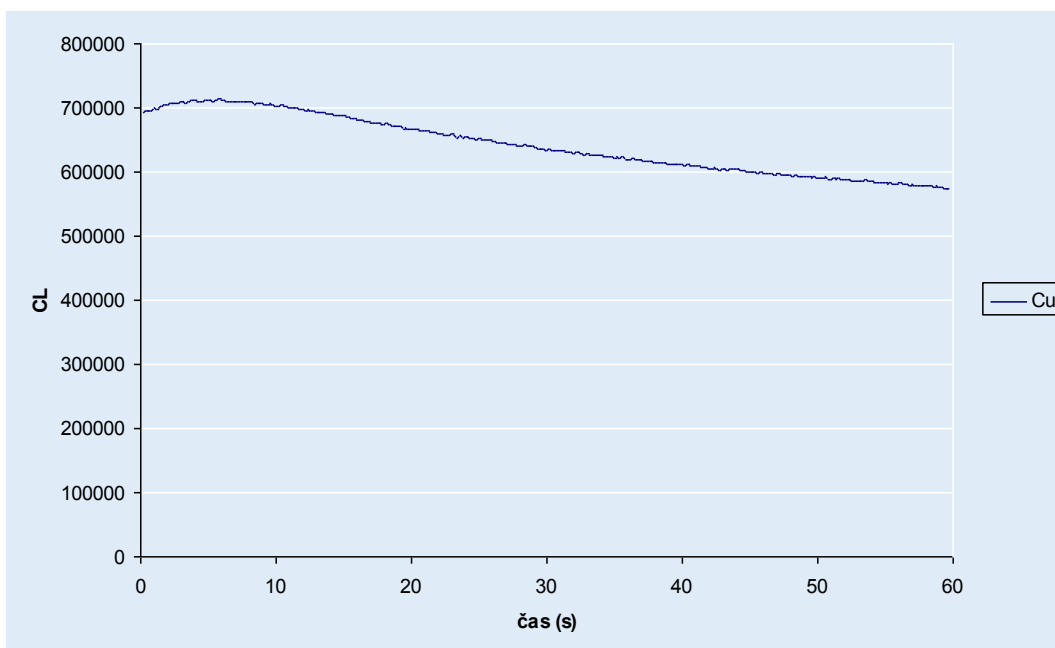


Graf č. 7 Luminiscence $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$ HRP s excitační směsí lumper – nástřík $10 \mu\text{l}$ HRP, $25 \mu\text{l}$ luminol, $100 \mu\text{l}$ H_2O_2 a doplněno do 1ml PBS puřrem

Na grafech č.8 a č.9 je znázorněn průběh katalyzátorů železnatých a měďnatých iontů přidaných ke směsi luminolu a peroxidu. Byly použity zásobní roztoky připravené z $\text{Cl}_2\text{Fe} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a nástřík $50 \mu\text{l}$ těchto roztoků. Maximální hodnota luminiscence byla 15krát menší u železnatých iontů než u HRP. O necelý jeden řád byl rozdíl u měďnatých iontů oproti HRP, avšak CL s časem klesala jen mírně a po cca 20 s byly hodnoty vyrovnané s HRP.

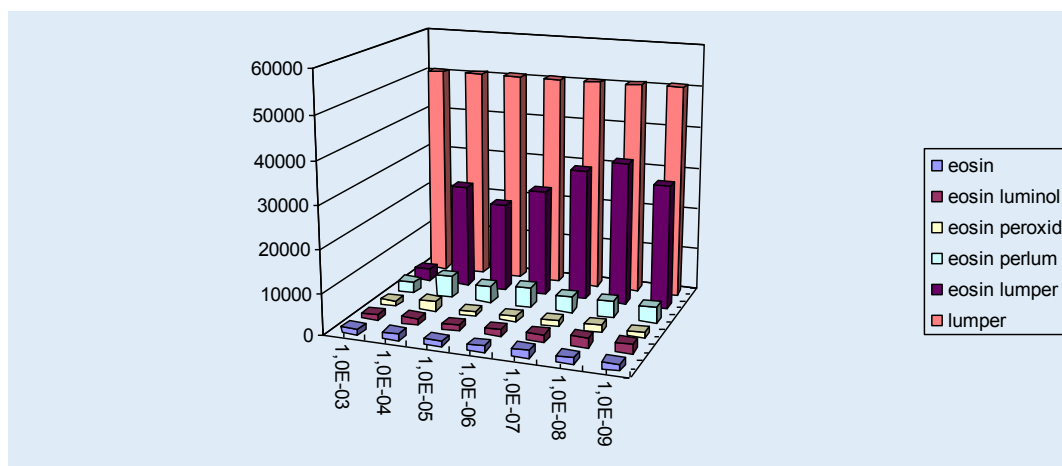


Graf č. 8 Luminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M Fe}^{2+}$ s excitační směsí lumper – nástřik $50 \mu\text{l Fe}^{2+}$, $25 \mu\text{l}$ luminol, $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ a doplněno do 1ml PBS pufrem

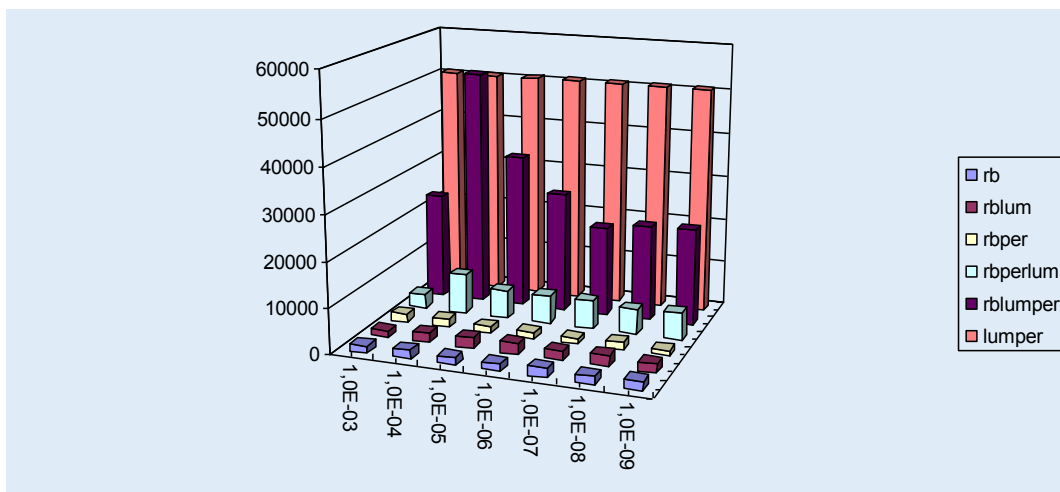


Graf č. 9 Luminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M Cu}^{2+}$ s excitační směsí lumper – nástřik $50 \mu\text{l Cu}^{2+}$, $25 \mu\text{l}$ luminol, $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ a doplněno do 1ml PBS pufrem

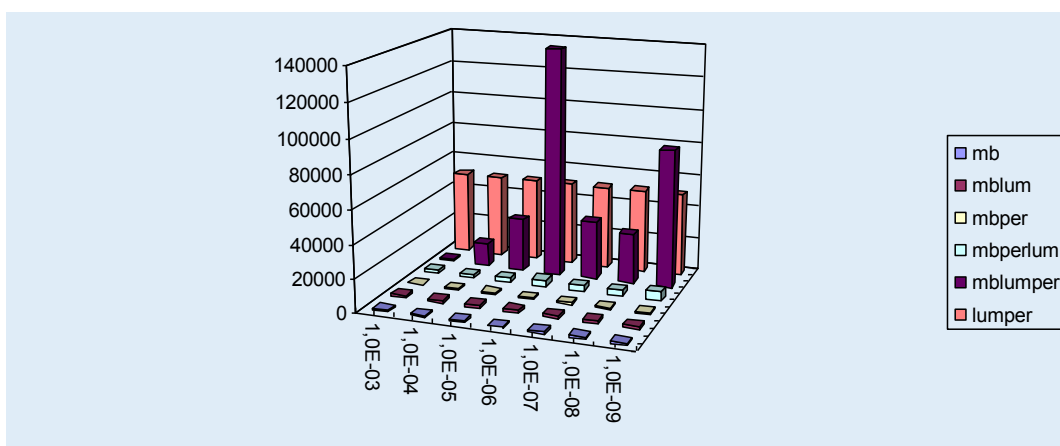
Na následujících sloupcových grafech č. 10,11,12 budou ukázány maximální hodnoty CL v čase 0,2 s. Měření probíhalo pro nekatalyzované reakce všech tří fotosenzibilizátorů v pořadí EY, RB, MB v kombinacích s luminolem, peroxidem, luminolem a peroxidem a peroxidem a luminolem. Poslední sloupec jsou hodnoty chemiexcitační směsi luminol peroxid v pořadí, která svítila nejvíce a lze vidět rozdíl o více než polovinu při použití fotosenzibilizátoru. Ve výsledcích je vidět reakce, kdy fotosenzibilizátor snižuje CL intenzitu o více než polovinu, kdy CL zůstává stejná jako při použití samotné excitační směsi a také kdy fotosenzibilizátor CL zvýšil třikrát. Další reakce byly měřeny pouze s 1.10^{-4}M roztoky RB a EY a s 1.10^{-6}M roztokem MB.



Graf č. 10 EY v kombinaci s luminolem 5.10^{-6}M , peroxidem $0,1\text{M}$, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem. Největší luminiscence byla naměřena u excitační směsi bez fotosenzibilizátoru. EY bude dále používán u katalyzovaných reakcí jako 1.10^{-4}M roztok

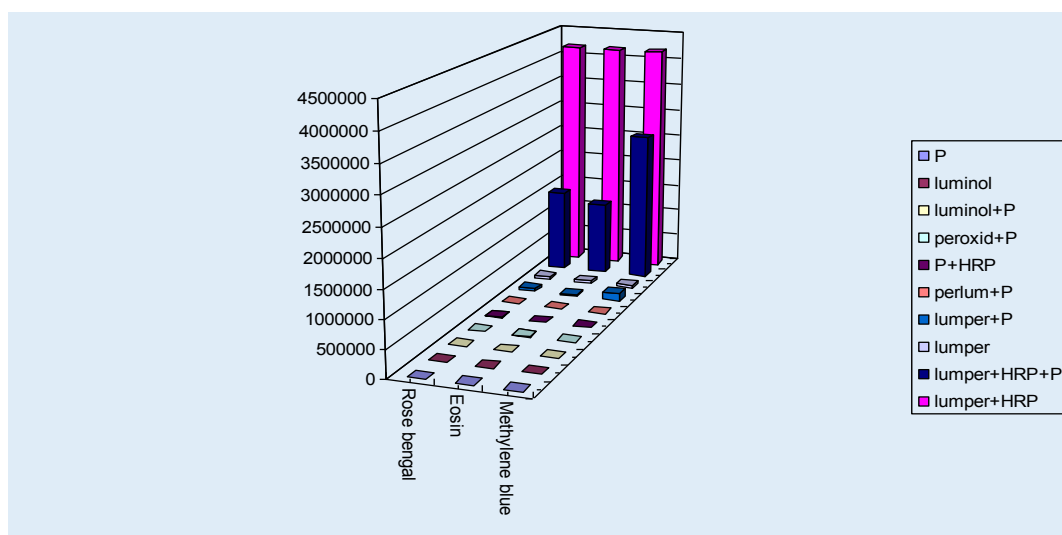


Graf č. 11 RB v kombinaci s luminolem $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$, peroxidem 0,1M, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem. Největší luminiscence byla naměřena u excitační směsi s fotosenzibilizátorem. U dalších měření bude u katalyzovaných reakcí používán $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ roztok

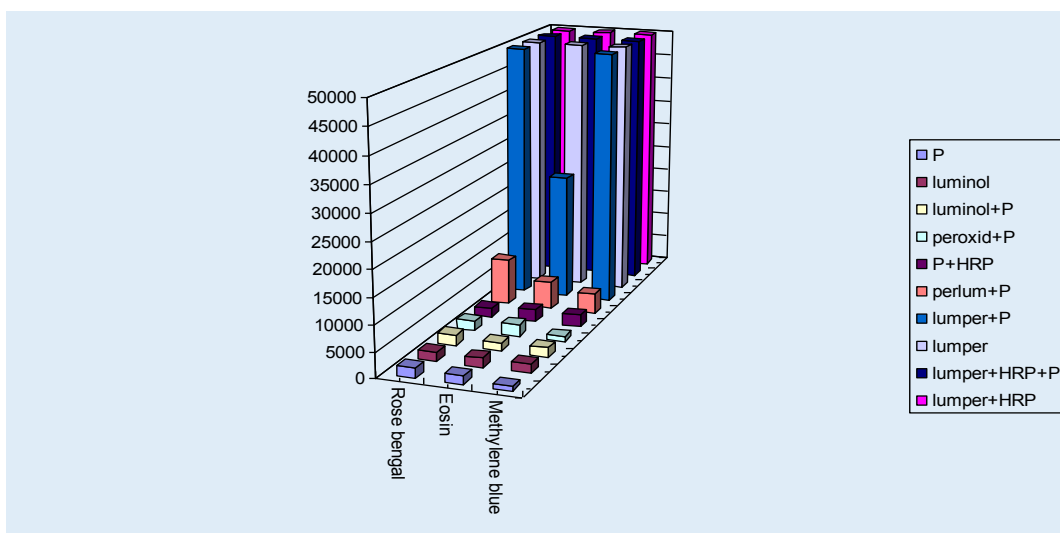


Graf č. 12 MB v kombinaci s luminolem $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$, peroxidem 0,1M, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem. Největší luminiscence byla naměřena u excitační směsi s fotosenzibilizátorem. MB bude dále používán u katalyzovaných reakcí jako $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ roztok

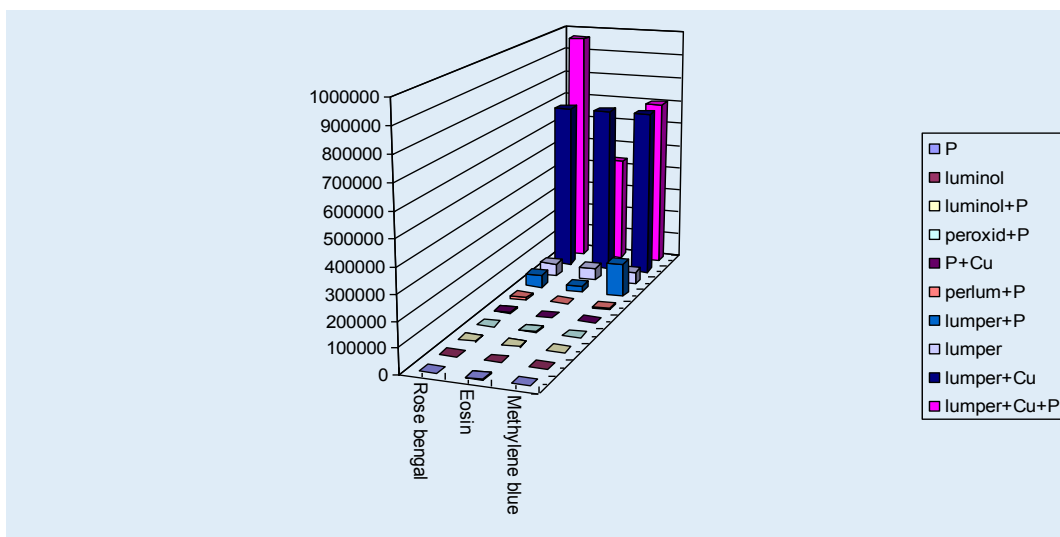
Nyní následují grafy 13, 14, kde jsou zobrazeny výsledky měření katalýzy H_2O_2 křenovou peroxidasou za použití všech systému. Graf 14 má zkrácenou osu y na hodnotu 50 000, aby byl jasně vidět rozdíl mezi katalyzovaným systémem luminol – H_2O_2 – HRP. A nakonec jsou zde grafy 15 a 16, představující stejné reakce ovšem jinými katalyzátory a jinými průběhy. Systém luminol – H_2O_2 – HRP vykazuje nejintenzivnější CL a fotosenzibilizátory bez výjimky tuto CL mírně zhasí. U katalýzy roztoku modrou skalicí RB intenzitu zvyšuje, EY snižuje a u MB zůstává přibližně stejná. A nakonec katalýza Fe^{2+} ionty vykazuje mírné zvýšení CL v řádech desítek tisíc.



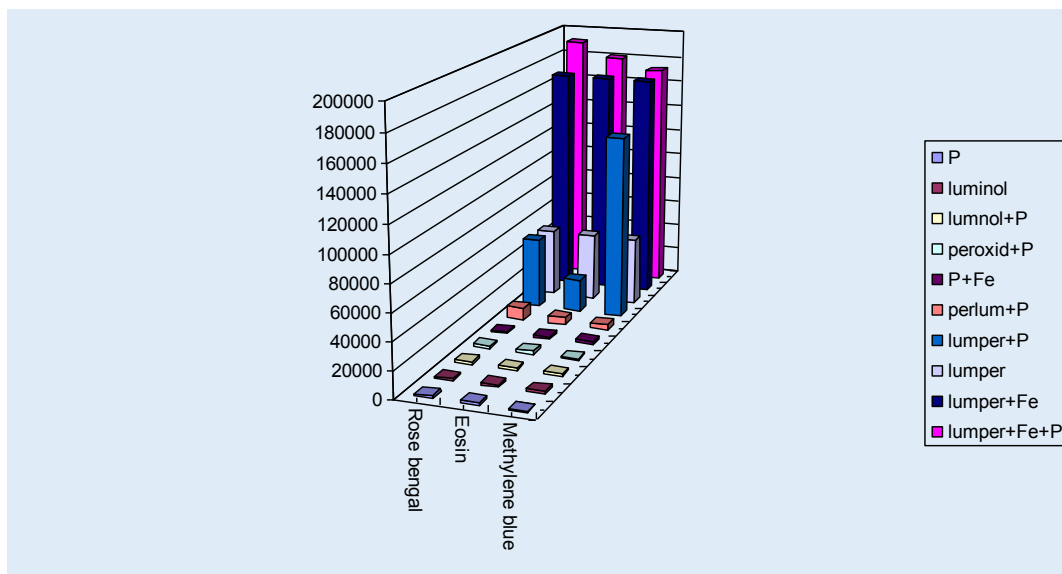
Graf č. 13 $5 \cdot 10^{-8} M$ HRP spolu s luminolem a H_2O_2 svítí nejintenzivněji a je znatelný pokles při senzibilizaci barvivy. MB snižuje CL přibližně 0,5 krát, RB a EY 3-4 krát.



Graf č. 14 Stejný graf jako graf č. 10 s upravenou maximální intenzitou CL na 50 000. Až zde můžeme srovnávat CL luminolu a peroxidu s fotosenzibilizátory, kdy jediná RB nevykazuje snížení intenzity. Systém HRP luminol peroxid zvyšuje intenzitu CL oproti lumper ~100 krát. Za použití lumper a fotosenzibilizátoru je tentokrát pokles o polovinu u dvojice MB a EY, zatímco u RB je téměř stejná



Graf č. 15 CL systému lumper po přidání $5.10^{-6}M$ roztoku Cu^{2+} nástřikem 50 μ l zásobního roztoku je asi 7krát nižší než tomu bylo u HRP. Fotosenzibilizátory reagují odlišně MB má CL stejnou, RB vyšší a EY nižší.



Graf č. 16 CL systému lumper po přidání $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ roztoku Fe^{2+} nástřikem $50 \mu\text{l}$ zásobního roztoku je až 20krát nižší než tomu bylo u HRP. Fotosenzibilizátory ve směsi lumimol, peroxid, Fe^{2+} vykazují mírně vyšší CL oproti samostatné excitační směsi. Ve směru RB, EY, MB mírně klesá

7. Závěr

Byla změřena relativní intenzita chemiluminiscence možných excitačních systémů ve fyziologickém pufru pH 7,4. CL excitačních systémů luminol, luminol-peroxid vodíku, luminol-peroxid vodíku-katalyzátor byla naměřena na luminometru Berthold Sirius 2C. Jako katalyzátor byla použita křenová peroxidasa, roztok CuSO_4 pentahydrát– Cu^{2+} ionty a roztok Cl_2Fe tetrahydrát – Fe^{2+} ionty. Všechny tyto systémy byly proměřeny v přítomnosti roztoků fotosenzibilizátorů a výsledné hodnoty byly následně porovnány .

Hodnoty naměřené relativní intenzity chemiluminiscence se při různých použitých systémech měnily. CL luminolu samotného lze podle výsledků této práce hodnotit jako 50krát slabší než systém luminol peroxid vodíku a 5000krát slabší oproti systému peroxid vodíku, křenová peroxidasa. Katalýza peroxidasou zvýšila intenzitu stokrát oproti systému luminol - peroxid. Katalýza železnatými ionty zvýšila chemiluminiscenci 3krát. Poslední katalýza ionty měďnatými zvýšila CL 14 krát, přičemž CL trvala nejdéle a po celou minutu se téměř nezměnila. V systémech probíhaly reakce všemi možnými způsoby. Jako důležitá se zdála volba katalyzátoru, která způsobila, že přítomnost fotosenzibilizátoru intenzitu chemiluminiscence zvyšovala, snižovala nebo neovlivnila. Na tuto práci by měla navazovat další, která bude tyto systémy aplikovat na živé organismy *in vitro* a doplní tak další poznatky k chemiluminiscenční excitaci fotosenzibilizátorů a především vznik reaktivních forem kyslíku.

8. Summary

Relative (chemi)luminescent intensities of possible excitation systems in phosphate buffer saline pH 7,4 were measured. CL of excitation systems luminol, luminol-hydrogen peroxide, luminol-hydrogen peroxide-catalyst were measured using luminometer Berthold Sirius 2C. As catalyst horseradish peroxidase, solution of CuSO_4 pentahydrate– Cu^{2+} ions and solution of Cl_2Fe tetrahydrate – Fe^{2+} ions. All of the systems were measured in the presence of photosensitizers and results were compared.

Values of relative chemiluminescent intensities has changed depending on each system used. Luminol alone chemiluminescence could be interpreted using our measuring data as 50-fold weaker than chemiluminescent intensity of luminol-hydrogen peroxide system and 5000-fold weaker than chemiluminescence catalyzed with horseradish peroxidase. Compared horseradish catalyzed oxidation by hydrogen peroxide with pure oxidation by hydrogen peroxide, the HRP increased 100-fold CL intensity. When Fe^{2+} as catalyst was used, CL increased 3-fold. The last catalyst Cu^{2+} improved CL approx. 14-fold but with same level for one minute measurement. In these systems reaction ways were various. As an important role seemed to be catalyst selection, which caused all the higher intensity, same level intensity and lower intensity when photosensitizer were added to the system. This work should be the first for further research with another work which applies these systems to unicellular organism *in vitro* and will continue this study about chemiluminescent excitation of photosensitizers and mainly formation of reactive oxygen species.

Seznam literatury

- [1] Halliwell B. (1992): **Reactive oxygen species and the central nervous system.** *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623
- [2] Victor J. Thannickal and Barry L. Fanburg (2000) **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, 1005-1028 13
- [3] Theodossis Theodossiou et al. (2003): **Firefly Luciferin-activated Rose Bengal: In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells¹.** *Cancer Research* 63, 1818 –1821
- [4] H.A.H. Ringem et al. (1996): **Application of xanthine oxidase-catalyzed luminol chemiluminescence in a mouse interleukin-5 immunoassay.** *Journal of Immunological Methods* 197, 161-169
- [5] Masao Nakamura and Shingo Nakamura (1998): **One and two electron oxidations of luminol by peroxidase systems.** *Free Radical Biology & Medicine*, 24/ 4, 537-544
- [6] Shinya Yamaguchi et al. (2010): **Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species.** *Analytica Chimica Acta* 665, 74–78
- [7] Gregory E. Conner et al. (2002): **Lactoperoxidase and Hydrogen Peroxide Metabolism in the Airway.** *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 57–61
- [8] A. Navas Diaz et al. (1996): **Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂ -horseradish peroxidase system: Comparative studies.** *Analytica Chimica Acta* 327, 161-165
- [9] Kamil Lang et al. (2005): **Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku.** *Chem. Listy* 99, 211-221
- [10] Lingjie Zhao (2001): **Singlet Oxygen.** *The University of Iowa* 25

- [11] Renata Rychtářiková a Gabriela Kuncová: **Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy.** *Chem. Listy* 103, 800-813
- [12] Joao Paulo Tardivo (2005): **Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2, 175—191
- [13] Leonidas P. Palilis, Antony C. Calokerinos (2000): **Analytical applications of chemiluminogenic reactions.** *Analytica Chimica Acta* 41, 175–186
- [14] Ana M. García-Campaña, Willy R. G. Baeyens (2001): **Chemiluminescence in Analytical Chemistry** *Marcel Dekker, USA*
- [15] Gary H. G. Thorpe, Larry J. Kricka et al. (1985): **Phenols as Enhancers of the Chemiluminescent Horseradish Peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction: Application in Luminescence-Monitored Enzyme Immunoassays.** *Clin. chem.* 31/8, 1335-1341
- [16] Thomas J. Dougherty (1993): **In situ photodynamic therapy/US Patent.** *Patent Number: 5 257 979*
- [17] Ana P. Castano, Willy R. G. Baeyens(2004): **Mechanism in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1, 279-293
- [18] Cristianne J.F. Rijcken et. al (2007): **Photosensitiser-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, characterisation and in vitro PDT efficacy.** *Journal of Controlled Release* 124, 144–153
- [19] Jürgen Fuchs, Stefan Weber, Roland Kaufmann (2000): **Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: Implications for clinical photodynamic therapy.** *Free Radical Biology & Medicine*, 28/ 4, 537-548

[20] Matgorzata Rozanowska et al.(1995): **Rose bengal photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 29, 71-77

[21] R. Dulbecco, Marguerite Vogt (1953) : **Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.** *From the California Institute of Tecknology, Pasadena*

[22] G. Coteur and P. Dubios (2004): **Interaction of metals with peroxidase—mediated luminol-enhanced, chemiluminescence (PLmCL).** *Luminescence* 19, 283–286