

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Spektrální charakteristika ultra slabé fotonové emise z lidských
nádorových buněk

Vypracovala: Ludmila Žárská

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.

Velmi ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc při psaní diplomové práce, za trpělivý a ochotný přístup. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Marku Rácovi, Ph.D., za pomoc při měření s PMT, poskytnutí literatury a především za ochotný přístup a odborné rady.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Doc. RNDr. Pavla Pospíšila, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

Fenomén ultra slabé fotonové emise (UPE) známý téměř 100 let dnes pozorujeme u všech biologických systémů, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové. V současnosti jsme schopni detekovat UPE na různých strukturálních stupních biologických systémů, jakými jsou celé organismy, orgány, buněčné kultury a orgány. Všeobecně uznávaná teorie říká, že UPE souvisí s oxidativními metabolickými procesy biologických systémů. Konkrétně UPE pochází z elektronově – excitovaných stavů molekul, vytvořených biologickými systémy. Excitované druhy jsou vytvořeny v průběhu oxidativních metabolických procesů a při oxidativních stresových reakcích, které jsou spojeny s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). V této diplomové práci byla měřena spektrální charakteristika UPE na buněčné kultuře lidského mnohočetného myelomu (U266) po přidání peroxidu vodíku (H_2O_2). Práce obsahuje informace o druhu excitovaných molekul u těchto buněk. V neposlední řadě ukazuje, jakou roli při těchto experimentech hrají následné korekce naměřených výsledků, představuje míru závislosti získaného spektra na propustnosti filtrů a kvantové účinnosti fotonásobiče (PMT).

SUMMARY

The phenomenon of ultra – weak photon emission (UPE), known for almost 100 years, is observed in all biological systems such as microorganisms, plants and animals. Nowadays, we are able to detect the UPE at different structural levels of biological systems such as whole organisms, organs, cell cultures and organelles. UPE is related to oxidative metabolic processes of biological systems. Specifically, this UPE comes from the electron - excited forms created by biological systems. During the oxidative metabolic processes and oxidative stress responses, which are associated with the production of reactive oxygen species (ROS), the excited species are formed. We measured the spectral characteristics of the UPE from cell culture of the human multiple myeloma (U266) induced by the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2). This work contains information about the type of the excited molecules in these cells. Finally, it shows the role of subsequent correction of measured results. It shows a degree of dependence of the spectrum on the filters transmission and a quantum efficiency of the photomultiplier (PMT).

SEZNAM ZKRATEK

CCD	charge coupled device
DABCO	1,4 – diazabicyklo [2.2.2] octan
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HO•	hydroxylový radikál
O ₂	molekulární kyslík
¹ O ₂	singletní kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový aniontový radikál
PMT	fotonásobič
ROS	reaktivní formy kyslíku
RH	biomolekula (lipid, protein)
R•	lipidový nebo proteinový alkylový radikál
ROH	organický hydroxid
ROO•	peroxylový radikál
ROOR	1,2 – dioxetan
ROOOOR	tetroxid
R=O	karbonyl
³ (R=O)*	tripletní excitovaný karbonyl
UPE	ultra slabá fotonová emise

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1. Ultra slabá fotonová emise	2
2.1.1. Charakterizace ultra slabé fotonové emise.....	2
2.1.5. Chemický mechanismus	7
2.1.2. Mikroorganismy	9
2.1.3. Rostliny.....	11
2.1.4. Živočichové.....	14
3. CÍL PRÁCE.....	20
4. MATERIÁL A METODY	21
4.1. Buněčná kultura U266.....	21
4.2. Médium.....	22
4.3. PMT měření	24
4.4. Vyhodnocení naměřených dat.....	25
4.5. Propustnost filtrů.....	27
4.6. Kvantová účinnost PMT	29
4.7. Výsledná korekce naměřených dat.....	31
5. VÝSLEDKY	32
5.1. Ultra slabá fotonová emise indukovaná peroxidem vodíku	32
5.2. Spektrální charakteristika indukované UPE určena hranovými filtry	33
5.3. Spektrální charakteristika indukované UPE určena pásovými filtry	34
5.4. Vliv propustnosti filtrů na výslednou spektrální charakteristiku	35
5.5. Vliv kvantové účinnosti PMT na výslednou spektrální charakteristiku	37
5.6. Vliv propustnosti filtrů a kvantové účinnosti PMT na výslednou spektrální charakteristiku.....	39
5.7. Porovnání původní a výsledné spektrální charakteristiky.....	41
6. DISKUZE.....	43
7. ZÁVĚR	48
8. SEZNAM LITERATURY.....	49

1. ÚVOD

Slovo foton pochází z řeckého "phós", což znamená světlo. V kvantové fyzice je to termín používaný k označení kvanta elektromagnetického záření (da Nóbrega 2007). Ultra slabou fotonovou emisi, často označovanou také jako biofotonovou emisi, je možné pozorovat u biologických systémů, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové (Laager 2008). Ultra slabá fotonová emise u živých systémů je dnes již velmi dobře známa, může být spontánní nebo indukovaná (da Nóbrega 2007). Přestože základní mechanismus UPE biologických systémů nebyl ještě jednoznačně objasněn, je všeobecně uznávána teorie, že UPE souvisí s oxidativními procesy vyvolanými stresem (Laager 2008). V současnosti již máme spoustu důkazů o tom, že UPE je spojena s fyziologickými funkcemi organismů (da Nóbrega 2007). Metabolické procesy jsou základní chemické reakce vyskytující se uvnitř všech živých buněk, při níž vznikají ROS, které hrají důležitou roli při obraně organismu. Nedostatečné odstranění ROS způsobuje nerovnováhu systému a dochází k poškození buněčné membrány a buněčné smrti (Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011; Pospíšil a kol. 2014).

V současné době na práci A. Gurwitsche, později F. – A. Poppa navazují vědecké skupiny v Brazílii, Číně, Chile, Indii, Itálii, Japonsku, Jižní Koreji, Polsku, Rakousku, Rusku, Švýcarsku a USA (da Nóbrega 2007).

Narůstající popularita tohoto fenoménu umožnila, že dnes může sloužit jako neinvazivní diagnostická metoda při vyšetřování fyziologických a patologických charakteristik biologického systému. Zjištění, že měřením UPE můžeme rozlišit zdravé a rakovinné buňky nabízí možnosti použití této techniky k diagnostice nádorových buněk a to především díky vývoji nízko – šumových PMT a velmi citlivých charge coupled device (CCD) kamer. Zdravotnictví není jedinou oblastí možné aplikace, své využití nachází UPE v potravinářství při hodnocení kvality surovin, v zemědělství při kontrole klíčivosti semen, zajímavé výsledky přináší také z oblasti sportu a meditace (Laager 2008).

Diplomová práce se zabývá spektrální charakteristikou UPE z buněčné kultury U266, indukované přidáním H_2O_2 , díky níž je možné získat informace o druhu excitovaných molekul ve vzorku. Úkolem této práce je také ukázat, jak důležité při vyhodnocování výsledků jsou korekce propustnosti filtrů a kvantové účinnosti PMT.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ultra slabá fotonová emise

2.1.1. Charakterizace ultra slabé fotonové emise

První experimentální důkazy o existenci UPE byly poskytnuty v roce 1922 ruským biologem Alexandrem Gurwitschem, který pozoroval a poté i popsal mitotické záření, dnes známé jako UPE (Trushin 2003; Bischof 2005). Bohužel tento objev upadl v zapomnění a téměř po 50 letech byl znovu objeven díky německému profesorovi Fritzovi – A. Poppovi. Původní název pro dnes známou a hojně používanou UPE změnil z mitotického záření na biofotonovou emisi (Bischof 2005; Bischof 2008; Bertogna a kol. 2013).

Tento objev s sebou přinesl také mnoho otázek, na které se v průběhu let snaží vědci najít odpovědi. Shrnutí poznatků v oblasti výzkumu UPE nám umožní vymezit tento fenomén, objasnit chemickou i fyzikální podstatu jeho vzniku, určit intenzitní a spektrální charakteristiky a v neposlední řadě toto bádání s sebou přineslo nové možnosti využití UPE v mnohých oblastech.

Ultra slabou fotonovou emisi pozorovanou u živých systémů rozdělujeme na spontánní a indukovanou. Spontánní UPE vzniká v důsledku oxidativních metabolických procesů, které představují základní chemické reakce vyskytující se uvnitř všech živých buněk. Při metabolických procesech jako je buněčné dýchání, nebo oxidativní vzplanutí vznikají ROS. Vznik indukované UPE je podmíněn biotickými a abiotickými stresovými faktory, které vedou k oxidativním stresovým reakcím. Biotický stres vzniká při napadení organismu viry, bakteriemi nebo houbami. Abiotický stres rozdělujeme na chemický a fyzikální, mezi zdroje chemického stresu řadíme exogenní přidání H_2O_2 , cigaretový kouř a jako fyzikální označujeme ultrafialové záření, teplotu, mechanické poškození. Všechny tyto faktory vedou ke zvýšení produkce ROS (Rastogi a Pospíšil 2011; Cifra a Pospíšil 2014). Reaktivní formy kyslíku hrají důležitou roli při obraně proti infekci, buněčné signalizaci a apoptóze. Pozitivní redoxní potenciál umožňuje ROS oxidovat biomolekuly (RH), jako jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Proti oxidačnímu poškození lipidů, bílkovin a nukleových kyselin si buňky vytvářejí vlastní obranný systém. Za určitých podmínek, kdy množství vzniklých ROS

přesahuje schopnosti antioxidačního systému aktivně se bránit, nejsou nebezpečné ROS dostatečně odstraněny. Toto nedostatečné odstranění způsobuje nerovnováhu systému, což vede k poškození buněčné membrány a buněčné smrti (Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011; Pospíšil a kol. 2014).

V průběhu oxidativních metabolických procesů dochází k elektronovému přechodu mezi energetickými hladinami singletních nebo tripletních excitovaných stavů do základního stavu. Tento přechod je doprovázen UPE v oblasti krátkých i dlouhých vlnových délek. Během těchto procesů se v těsné blízkosti excitovaných látek mohou vyskytovat pigmenty nebo molekulární kyslík (O_2) a může docházet ke vzniku excitovaných pigmentů nebo singletního kyslíku (1O_2). Mezi vznikajícími produkty oxidativních metabolických procesů nacházíme tripletní excitované karbonyly ($^3(R=O)^*$) s maximy fotonové emise o vlnové délce 350 – 550 nm, singletní excitované pigmenty (u melaninu 360 – 560 nm a 680 – 740 nm u chlorofylu), tripletní excitované pigmenty (870 – 1000 nm u chlorofylu). Může také docházet k dimolové fotonové emisi 1O_2 (634 nm a 703 nm) a monomolové fotonové emisi 1O_2 (1270 nm), (Cifra a Pospíšil 2014).

Jak již bylo zmíněno, tak velká pozornost je při popisu UPE také věnována intenzitě a spektrální charakteristice. Důvodem proč nelze sledovat UPE pouhým okem je intenzita tohoto záření, která je v rozmezí od desítek po několik stovek fotonů $s^{-1} \cdot cm^{-2}$ (toto je hodnota intenzity UPE ve viditelné oblasti spektra, intenzita UPE v blízké IČ není dostatečně prozkoumaná), což jsou hodnoty řádově o velikosti, která je pod hranicí citlivosti lidského oka (10^6 fotonů $s^{-1} \cdot cm^{-2}$). Nesmíme zapomenout, že měření intenzity UPE významně souvisí s citlivostí používaného PMT a že počet naměřených pulzů $\cdot s^{-1}$ může být o jeden až dva řády nižší než je skutečný počet fotonů emitovaných vzorkem. Důvodem proč dochází k poklesu počtu naměřených pulzů $\cdot s^{-1}$ při detekci, může být vzdálenost vzorku od detektoru nebo optické jevy, vznikající v důsledku interakcí vzorku s elektromagnetickým zářením, jako jsou absorpce, lom, rozptyl, reflexe nebo difrakce. V neposlední řadě může být příčinou tohoto poklesu fakt, že zatím co fotony jsou ze vzorku emitovány ve všech směrech, fotokatoda PMT je schopna detekovat jen malou část emitovaných fotonů. Rozdílné hodnoty intenzity byly také zaznamenány při porovnání spontánní a indukované UPE, kdy indukovaná UPE je řádově 2x až 3x vyšší než spontánní (Cifra a Pospíšil 2014).

Pro podrobnější popis UPE však nejsou dostačující informace pouze o intenzitě, ale důležitou součástí je také spektrální charakteristika. V době objevu byla UPE spojována s ultrafialovou oblastí spektra (200 – 400nm), (Bischof 2005), avšak podle nejnovějších prací (Cifra a Pospíšil 2014; Pospíšil a kol. 2014) je UPE definována v blízké UVA, viditelné (350 – 750 nm) a blízké IČ (750 – 1300 nm) oblasti spektra. Tripletní excitované karbonyly jsou spojovány s UPE v modro – zelené oblasti (350 – 550 nm), dimolová fotonová emise $^1\text{O}_2$ (634 nm a 703 nm) a excitované pigmenty jsou považovány za zdroj UPE v zeleno – červené oblasti spektra (550 – 750 nm). Oblast blízké IČ doposud nemohla být podrobněji prostudována vzhledem k možnostem používaných detektorů, ale předpokládá se výskyt UPE v oblasti s maximy fotonové emise 870 – 1000 nm (tripletní excitovaný chlorofyl) a 1270 nm (monomolová fotonová emise $^1\text{O}_2$). Stejně tak jako prozatím nemáme mnoho informací o blízké IČ oblasti, podobné je to i s popisem UPE v daleké UVA a UVB oblasti (< 350 nm).

Tyto charakteristiky nám také mohou pomoci při správném odlišování mezi UPE a tepelnou emisí nebo bioluminiscencí, což jsou pojmy, které jsou často některými autory používány nesprávně. Je nutné zdůraznit, že UPE není součástí tepelného záření, intenzita UPE je ve viditelné oblasti spektra o mnoho řádů vyšší, než je intenzita tepelného záření, které se využívá v termokamerách (IČ oblast). Zajímavostí je, že při zobrazení UPE a tepelného záření termokamerou získáme v případě lidského těla různé prostorové vzory. Často bývá UPE také zaměňována s bioluminiscencí, ke které dochází pouze, pokud jsou přítomny specializované luminiscenční enzymatické systémy jako luciferin/luciferáza (Cifra a Pospíšil 2014).

Musíme si uvědomit, s jakým technickým vybavením vědci dříve pracovali. Dnes již běžně pro tato měření používáme PMT a CCD kamery, na rozdíl od Alexandra Gurwitsche, který tuto možnost neměl. Jednoduché technické vybavení postačovalo ke studiu UPE pouze u jednodušších forem organismů, avšak rozvoj PMT a CCD kamer postupně umožnil provádět měření i na složitějších organismech. Současný rozvoj PMT a CCD kamer umožňuje sledovat UPE v živých systémech, jako například u mikroorganismů (Matsushita a kol. 1995; Vogel a kol. 1999; Trushin 2003; Červínková a kol. 2015; Nerudová a kol. 2015;), rostlin (Mathew a Roy 1992; Bajpai 2004), buněčných kultur (Kim a kol. 2007), živočišných orgánů (Kim a kol. 2005) nebo také z lidské kůže (Cohen a Popp 1997; van Wijk a van Wijk 2005; Cifra a kol. 2007;

Rastogi a Pospíšil 2010; Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011; Prasad a Pospíšil 2012).

Důležitým výsledkem všech těchto studií je možnost aplikace UPE v nejrůznějších oblastech, které můžeme rozdělit do několika skupin. Jako první zmíníme využití u mikroorganismů, mikrobiologie disponuje velkým množstvím dat vztahujících se k *E. Coli* a dalším mikroorganismům. Tyto poznatky mohou být velmi užitečné pro monitorování oxidativního metabolismu u bakterií mléčného kvašení (Laager 2008).

Další neméně podstatnou oblast představují rostliny a s nimi související zemědělství. Zobrazování UPE bylo použito k analýze odezvy R genu. Tyto geny produkují bílkovinu, která se podílí na obraně proti chorobám. Je tak možné sledovat reakci obranného systému na genetické úrovni u dané rostliny (Laager 2008). Je možné analyzovat účinky stresu, který mohl být způsoben mechanickými, chemickými, fotochemickými nebo teplotními faktory (Slawinski a kol. 1992). Příkladem může být pozorování klíčících semen ječmene, u kterého byly studovány vztahy mezi UPE a obsahem vody, teplotou (Yan a kol. 2003), nebo měření, které informuje, k jakým újmám dochází u rostlin vlivem sucha, jako v případě studie provedené u červených fazolí (Laager 2008).

Oblast organismů se nejvíce soustřeďuje na člověka, tedy především na využití ve zdravotnictví, ale v posledních letech se stává velmi atraktivní také spojení UPE a meditace nebo sportu. Ve zdravotnictví nabízí UPE nové možnosti pro vylepšení výzkumu rakoviny, kdy CCD kamery zaznamenávají obrazy rostoucích nádorů (Kobayashi a kol. 2005), nebo může být efektivní metodou pro rozlišení zdravých a nádorových buněk (Musumeci a kol. 2005). Zvýšenou emisí fotonů lze pozorovat nejen v průběhu karcinogeneze, ale i zánětů, intoxikace, při radiačním poškození nebo při kardiovaskulárních obtížích. Před několika lety byla obohacena novými poznatky také vývojová biologie, při těchto měřeních byla UPE sledována v různých stádiích embryí (Laager 2008). V neurologii lze analyzovat mozkový energetický metabolismus a stres, korelace mezi elektroencefalogramem a emisí fotonů poukazuje na novou metodu pro patofyziologický výzkum (Kobayashi a kol. 1999). V poslední době se značná část výzkumu specializuje na pokožku, kde jsou analyzovány účinky UVA záření (Khabriri a kol. 2007). Ukázalo se, že změny UPE mohou být indukovány a použity jako neinvazivní metoda pro měření účinnosti antioxidantů na kůži. UV

záření, látky znečišťující ozón nebo vzduch způsobují tvorbu ROS, které pak pozorujeme ve formě UPE (Laager 2008). Mezi nejnovější objevy patří měření spotřeby kyslíku během cvičení (Laager 2008), nebo snížení ROS po meditaci (van Wijk a kol. 2007). Bylo zjištěno, že u dlouhodobě sportovně aktivních lidí nedochází k většímu zvýšení UPE a to ani v průběhu cvičení, důvodem je zvýšené množství antioxidantních enzymů (Laager 2008).

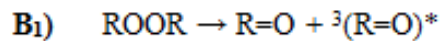
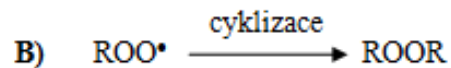
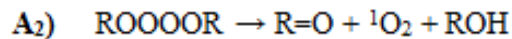
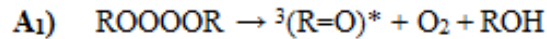
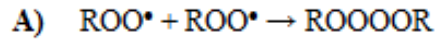
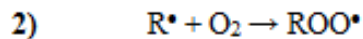
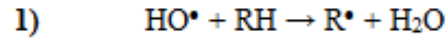
Tento krátký přehled zdaleka nepopsal všechny možnosti využití, které jsou dnes známy. Pro větší přehlednost jsme organismy rozdělili na mikroorganismy, rostliny a živočichy, kterým se postupně budeme věnovat a shrneme poznatky intenzitních a spektrálních charakteristik, výzkumů provedených v posledních letech a jejich následné aplikace. Pro komplexnější představu vzniku UPE v živých systémech je nejprve však nutné uvést chemický mechanismus tohoto fenoménu.

2.1.5. Chemický mechanismus

Je známou skutečností, že UPE souvisí s oxidativními metabolickými procesy, způsobenými ROS (Pospíšil a kol. 2014). Reaktivní formy kyslíku představují molekuly kyslíku, které dělíme na 1) radikálové, obsahující alespoň jeden nepárový elektron, 2) neradikálové, neobsahující žádný nepárový elektron. Mezi radikálové ROS patří superoxidový aniontový radikál ($O_2^{\bullet-}$) a hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), zatímco 1O_2 a H_2O_2 patří mezi neradikálové ROS. Reaktivní formy kyslíku, které jsou přirozeným vedlejším produktem normálního metabolismu O_2 , hrají významnou roli v buněčné signalizaci a v obranných mechanismech při napadení organismu patogenem. Za normálních podmínek jsou ROS tvořeny především v mitochondriích jako meziprodukt buněčného dýchání. Pokud jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám jako UV záření, ionizující záření, vyšší teploty, H_2O_2 nebo cigaretový kouř, dochází také ke zvýšené tvorbě ROS. V případě, že jsou vzniklé ROS účinně odstraněny antioxidačním obranným systémem, je zcela zabráněno oxidaci RH. Nicméně, za jistých okolností, kdy tvorba ROS překročí kapacitu antioxidačního obranného systému, jsou RH oxidovány (Ozawa 1999). Chemický mechanismus vzniku UPE je popsán na obrázku 1.

Vznikající $^3(R=O)^*$ jsou jedním z možných původců UPE, pro které je charakteristická modro – zelená oblast (350 – 550 nm). Jako zdroje UPE byly popsány u *Saccharomyces cerevisiae* (450 – 550 nm), (Nerudová a kol. 2015), rostlinných děloh (450 – 540 nm), (Kobayashi a kol. 2005), krysích plic (Cadenas a kol. 1980), mozku a jater potkanů (410 – 440 nm), (Kobayashi a kol. 2005) a lidského těla (400 – 500 nm), (van Wijk a van Wijk, 2005).

Singletní kyslík vzniklý dimolovou reakcí je charakterizován maximy fotonové emise s vlnovou délkou 634 nm a 703 nm. Tyto hodnoty byly prokázány v experimentech s plicemi krys (Cadenas a kol. 1980), s hovězím srdcem (634 nm a 703 nm), (Cadenas a kol. 1980) a na lidském těle (634 nm a 650 nm), (van Wijk a van Wijk 2005; Pospíšil a kol. 2014).



Obr. 1: Rovnice popisující vznik UPE, kde na počátku **1)** je hydroxylový radikál, který oxiduje biomolekuly (lipid, protein), za vzniku lipidového nebo proteinového alkylového radikálu (R^\bullet) a vody (H_2O). **2)** Lipidový nebo proteinový alkylový radikál reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (ROO^\bullet). Poté mohou nastat dvě situace, v případě **A)** spolu zreagují dva peroxylové radikály, čímž vzniká nestabilní meziprodukt tetroxid (ROOOOR). Tento tetroxid se okamžitě rozpadá na: **A₁)** tripletní excitovaný karbonyl, molekulární kyslík a organický hydroxid (ROH) nebo **A₂)** karbonyl ($\text{R}=\text{O}$), singletní kyslík a organický hydroxid. Druhou možností je **B)**, kdy dojde k cyklizaci peroxylového radikálu za vzniku 1,2 – dioxetanu (ROOR), což je velmi nestabilní meziprodukt, který se okamžitě rozpadá **B₁)** na karbonyl ($\text{R}=\text{O}$) a tripletní excitovaný karbonyl. Vzniklý ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$ a ${}^1\text{O}_2$ způsobují UPE (Cadenas a kol. 1980, van Wijk a van Wijk 2005, Pospíšil a kol. 2014).

2.1.2. Mikroorganismy

Rozvoj výzkumu UPE je od počátků tohoto fenoménu spojen s vývojem detektorů, ten nejprve umožňoval studium jednoduchých systémů, jakými jsou i mikroorganismy. Obecně můžeme říci, že v porovnání s rostlinami nebo živočichy, je však mikroorganismům věnována menší pozornost (Trushin 2003).

I u mikroorganismů se studie věnují podstatě vzniku UPE, stresovým faktorům vyvolávajícím změny a inhibitorům. Víme, že jedním z možných zdrojů UPE u rostlin jsou chloroplasty, u živočichů to mohou být mitochondrie, ale v případě mikroorganismů hovoříme o velmi primitivní stavbě a nenajdeme u nich ani pigmenty. Konev s kolegy v 60. letech provedli pokus s *Candida utilis*, při němž vzniklá UPE pocházela z buněčného dělení. Těmto autorům se také podařilo zaznamenat UPE u více mikroorganismů, včetně kvasinek a bakterií (Prasad a Pospíšil, 2015), příkladem mikroorganismu u kterého, ale UPE nebyla zjištěna je *Klebsiella pneumoniae* (Roth a Kaeberle 1980). Byl studován také vliv stresových faktorů, jedním z nich bylo množství kyslíku, za anaerobních podmínek nebyla pozorována žádná UPE u různých druhů kvasinek. Podobné výsledky poskytla měření se *Saccharomyces cerevisiae*, která poukázala na spojitost vzniku UPE s dostupností O₂ a to bez ohledu na fázi a životaschopnost buněk. *Saccharomyces cerevisiae* představuje jednoduchý mikrobiální systém, dobrá znalost jeho genetiky a metabolismu je důvodem jeho širokého uplatnění. Jedna z nejnovějších prací (Červinková a kol. 2015) studuje u *Saccharomyces cerevisiae* vliv antioxidantu (po přidání kyseliny askorbové dochází k poklesu UPE). U jiných mikroorganismů byla prokázána schopnost inhibice UPE, konkrétně tuto schopnost najdeme u *Listeria monocytogenes*, inhibice je umožněna přítomností superoxiddismutázy a katalázy (Prasad a Pospíšil 2015). Zajímavé zjištění přineslo studium *Bacillus carboniphilus*, které ukázalo, že v náročných podmínkách tato bakterie používá UPE pro vytvoření spor (Matsushashi a kol. 1995).

U bakteriálních kultur může UPE nabývat různé intenzity, která je zcela specifická pro daný kmen a kultivační médium. Typický výskyt nízké UPE je známý u bakterií mléčného kvašení (*Enterococcus faecalis*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus*), u kterých dochází k akumulaci H₂O₂ v důsledku NADH a H₂O₂ oxidázy, která katalyzuje chemickou reakci, jejímž výsledným produktem je H₂O₂. Spektrální charakteristiku přineslo měření s *Candida utilis*, s maximy fotonové emise

250 – 380 nm (Prasad a Pospíšil 2015). Poslední provedená studie (Nerudová a kol. 2015) u *Saccharomyces cerevisiae*, poskytla výsledky, kde maxima fotonové emise byla naměřena v rozmezí 450 – 550 nm, což odpovídá $^3(R=O)^*$ a v oblasti 550 – 600 nm, ale tento rozsah vlnových délek neodpovídá žádným známým zdrojům UPE. Vzhledem k tomu, že tyto charakteristiky jsou specifické pro daný druh, nelze je zcela zobecnit, což nabízí možnosti pro další experimenty. Mnohé studie se věnují vzájemné komunikaci u mikroorganismů a studiu kultivačního média.

Práce Trushina se zaměřila na sledování interakcí u *E.coli*. Měření bylo provedeno s bakteriální kulturou ve skle, které absorbovalo UV záření. Byla zjištěna vzájemná komunikace mezi bakteriemi a tím byla zároveň vyvrácena teorie Gurvitsche, který na základě svých měření došel k závěrům, že interakce je způsobena zářením v UV oblasti. Kromě záření ve viditelné oblasti může být pro přenos informací využito i záření v infračervené oblasti, tak jako tomu je v případě 3T3 a BHK buněk (Trushin 2003). Další experimenty (Vogel a kol. 1999) poskytly informace, na základě kterých víme, že kultivační média mohou sloužit jako indikátory výskytu oxidačního stresu ve sledované kultuře. U aerobních bakteriálních buněk a kmene *Aerotolerant* byla prokázána schopnost úspěšně odstranit ROS přítomné v médiu a to i při nízké hustotě buněk. Tento ochranný mechanismus, který se u nich vyvinul, představuje velmi efektivní způsob zabránění vzniku UPE. Nevýhodou je, že jej nelze uplatnit při obranných enzymových reakcích, kde se vyskytují dismutázy, katalázy nebo peroxidázy.

2.1.3. Rostliny

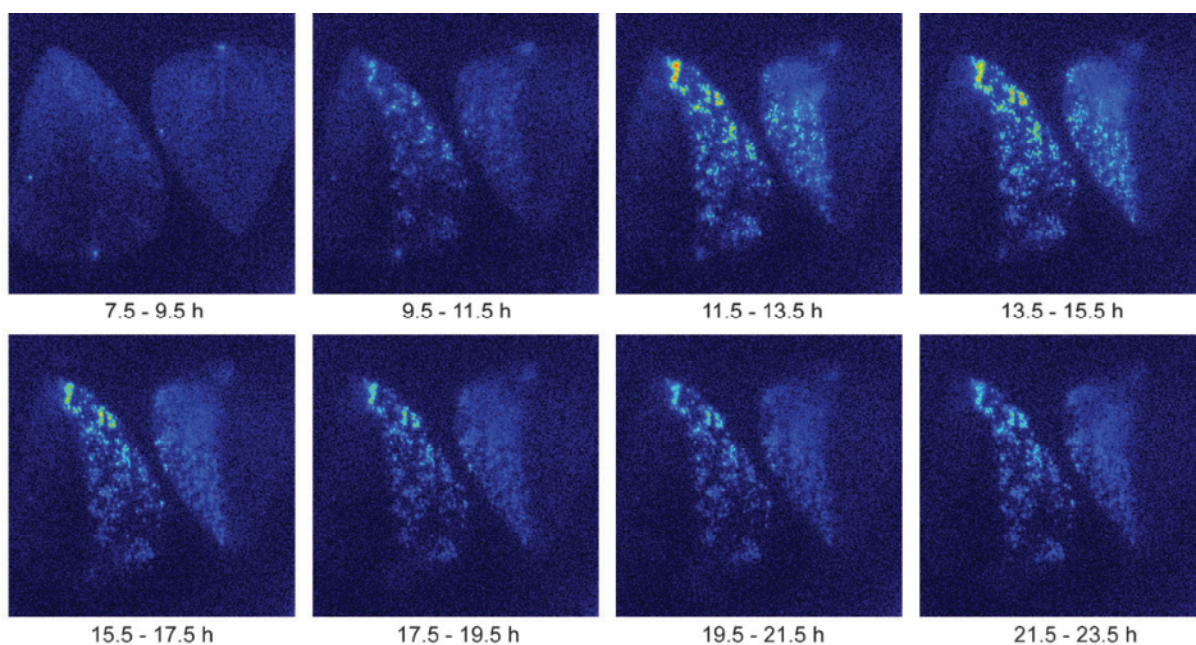
Velká část výzkumu věnuje svou pozornost rostlinám, podobně jako tomu bylo při objevu mitotického záření, které Alexander Gurwitsch objevil při experimentu s cibulovými kořeny (Trushin 2003; Bischof 2005). Po mnoha letech nezájmu a následném znovuobjevení Strehler a Arnold přispěli k rozvoji této oblasti výzkumu novými poznatky, které prokázaly spojitost UPE s chlorofylem (Trushin 2003). Následovala studie (Colli a Facchini 1954), která přinesla první informaci o vzniku indukované UPE v důsledku abiotického stresu. Snadná dostupnost rostlinného materiálu umožnila velký rozvoj v této oblasti.

Stejně jako i jiné organismy, tak i rostliny jsou zdrojem UPE. Ultra slabá fotonová emise se objevuje spontánně bez vnějších podnětů v mnohých rostlinných tkáních. Tento děj nastává v neporušených chloroplastech, zatímco v thylakoidních membránách není vůbec pozorován (Hideg a kol. 1990). Práce Hidegové a jejich kolegů (Hideg 1991; Hideg a kol. 1993), poukázaly na podobné reakce, které se odehrávají také v mitochondriích. Stejně jako mitochondrie, tak i chloroplasty hrají zásadní roli v buněčném energetickém metabolismu rostlin. Při metabolických procesech (buněčné dýchání, fotosyntéza, fagocytóza, mitóza), dochází ke vzniku ROS, které podmiňují vznik UPE (Hossu 2010). Zjištění, že mitochondrie jsou také zdrojem UPE nabízelo možnosti hledat stejnou schopnost u mitochondrií vyskytujících se u živočichů (Creath a Schwartz 2005). Dnes již dobře víme, že UPE dělíme na spontánní a indukovanou. Indukovaná UPE byla poprvé sledována v průběhu 50. letech 20. století (Colli a Facchini 1954), Colli se svými spolupracovníky mnohými experimenty ukázali, že pokud fazole nakrájíme na kousky, emitují 2 – 3 krát více světla než celé fazole. Jednalo se o vůbec první informaci v literatuře, která dokládá, že mechanické zranění je jedním z abiotických stresů vedoucích ke zvýšení UPE u rostlin.

Nová měření v 50. letech, přinesla informace také o spektrální charakteristice u rostlin, výsledkem měření provedených u chlorofylu byla UPE s maximy fotonové emise 400 nm a 650 nm. Tyto informace jsou již všeobecně známy a opětovně dokázány, jedním z příkladů může být UPE špenátových chloroplastů, která se vyskytovala v červené oblasti kolem 650 nm. (Hideg a kol. 1990). Práce (Kobayashi a kol. 2005) zaměřila svou pozornost na rostlinnou dělohu, ukázalo se, že UPE byla způsobena $^3(R=O)^*$ (450 – 540 nm).

Další studie ukázaly (Creath a Schwartz 2005), že 89% UPE u rostlin je pozorováno v oblasti mezi 600 – 1000 nm, tedy v části spektra červené až blízké infračervené. Bohužel zatím nejsou přístroje schopny měřit spektrální charakteristiku kratších vlnových délek v oblasti ultrafialového záření. Víme, že důležitou součástí charakteristiky UPE je také intenzita. Ta podobně jako i u jiných vzorků po delším časovém období klesá v důsledku degradace vzorku, stejně tak je ovlivněna přítomností detergentů nebo zvýšenou teplotou (70°C), (Hideg a Inaba 1991).

Vědcům se dařilo úspěšně objevovat nové informace a spojitosti v této problematice, avšak dlouho se nevědělo k čemu rostliny UPE mohou využít. Dnes již víme, že v průběhu evoluce se u rostlin vyvinul obranný systém, jehož součástí je zvýšená produkce ROS, rostliny jsou chráněny před útokem patogenů, jako jsou bakterie, hlístice, houby a nebo hmyzu (Makino a kol. 2005). Na tyto poznatky navazují Kobayashi a jeho spolupracovníci (Kobayashi a kol. 2007), ti sledovali naočkované listy fazolí virem *Cucumber mosaic*, u těchto listů docházelo ke tvorbě ROS, které mají zásadní roli v přenosu signálu, případně při větším nahromadění jsou toxické a vedou k buněčné smrti. Obrázek 2 zachycuje vznik UPE po naočkování virem *Cucumber mosaic*, dvou různých kmenů CMV – Y, CMV – L.



Obr. 2: Použití ultra slabé fotonové emise k zobrazení hypersenzitivní reakce pozorované na listech fazole. Tato reakce byla sledována po naočkování virem *Cucumber mosaic*, dvou různých kmenů CMV - Y, CMV - L. Snímky byly pořízeny pro jednotlivá časová rozmezí, která jsou uvedena pod každou fotografií. (Kobayashi a kol. 2007)

Zjištění, že UPE je u rostlin součástí obranného systému a nové možnosti využití CCD kamery pro detekci UPE ve 2D umožnily, aby se tyto experimenty staly ještě populárnějšími. Změny jsou nejen měřeny, ale také mohou být i zobrazeny, všechny tyto aspekty vedly k rozvoji mnohých praktických aplikací především v zemědělství. Mezi příklady možného využití se řadí práce Colliho (Colli a Facchini 1954), která ukázala možnost využití UPE pro zjištění fyziologických podmínek sazenic. Následně vznikly testy pro počítání fotonů, které byly použity při klíčení semen *Daphnia*, což umožnilo najít spojitost mezi počtem fotonů a klíčivostí u ječmene, rýže a kávy (Siqueira a kol. 2007). Ultra slabá fotonová emise se ukázala jako jedna z nejlepších metod právě u kávových zrn. Tato semena velmi rychle ztrácí svou fyziologickou kvalitu. Po sklizni u nich dochází k velmi rychlému vysychání, což brání pak jejich následnému klíčení. Proto se mnoho výzkumných týmů zabývá řešením tohoto problému. Snahou těchto měření UPE s přihlédnutím na obvyklé podmínky uskladnění a zacházení se semeny, je zlepšení životaschopnosti semen a tím i ovlivnění produkce kávy (Gallep a kol. 2004). Pomocí UPE je možné sledovat také vliv stresu na zrání například u brambor, fazolí, sóji, v neposlední řadě UPE své využití našlo i při hodnocení toxicity (Siqueira a kol. 2007).

2.1.4. Živočichové

Ultra slabá fotonová emise je spontánně vyzařována z mnoha různých biologických systémů, včetně zvířat nebo člověka. Rozvoj v této oblasti výzkumu UPE byl stejně jako v předchozích případech, tedy u mikroorganismů a rostlin spojen s rozvojem detektorů. Tyto možnosti dovolily postupně experimentovat *in vitro* i *in vivo*, s přístupem *in vitro* se nejčastěji setkáváme u zvířat (především myši, potkani a krysy) a lidských buněčných kultur, s *in vivo* přístupem pracujeme u člověka při zobrazování částí lidského těla CCD kamerou.

Podobně jako u mikroorganismů a rostlin, i u živočichů můžeme vhodnými detektory sledovat spontánní i indukovanou UPE. Spontánní UPE vzniká v důsledku metabolických procesů, v průběhu kterých dochází ke tvorbě ROS. Reaktivní formy kyslíku mohou poškodit lidskou pokožku a tím zahájit předčasné stárnutí pleti nebo vznik rakoviny kůže. Indukovanou UPE měříme po působení stresových faktorů, tato UPE se projevuje vyšší intenzitou než spontánní UPE (Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011, Pospíšil a kol. 2014).

Spektrální charakteristiku získáváme především pokusy se zvířecími orgány, jako v případě studie (Cadenas a kol. 1980). Pro získání více informací o vzniku UPE na biologických membránách (hovězí srdce) byla provedena měření, při nichž byl vytvořen jednoduchý model těchto membrán. Model byl složen z hydroperoxidu a hemoproteinů. Experiment posloužil k získání spektrální charakteristiky, k určení zhášecích a zesilovacích schopností přidávaných látek a také k zjištění původce UPE. Antioxidační účinek byl prokázán u cytochromu c a β – karotenu, naopak k navýšení UPE došlo po přidání 1,4-diazobicyklo [2,2,2] oktanu (DABCO). Jako původce UPE byl označen $^1\text{O}_2$, vznikající dimolovou reakcí, pro který jsou primárně charakteristická maxima fotonové emise o vlnových délkách 634 nm a 703 nm. Další provedené experimenty (Cadenas a kol. 1980) se zabývaly faktem, zda – li je možné charakterizovat původce UPE určitým pásmem vlnových délek. Bylo zjištěno, že $^1\text{O}_2$ se ať už přímo nebo nepřímo podílí na vzniku UPE a současně byla potvrzena charakteristická maxima fotonové emise 634 nm a 703 nm (plíce krysy), však UPE se převážně vyskytovala v modro – zelené oblasti spektra. Tato pozorování naznačují, že v případě krysích plic UPE pochází převážně z $^3(\text{R}=\text{O})^*$. U indukované UPE z mozku a jater potkanů se objevil modrý pruh mezi 410 – 440 nm a taktéž se předpokládá, že

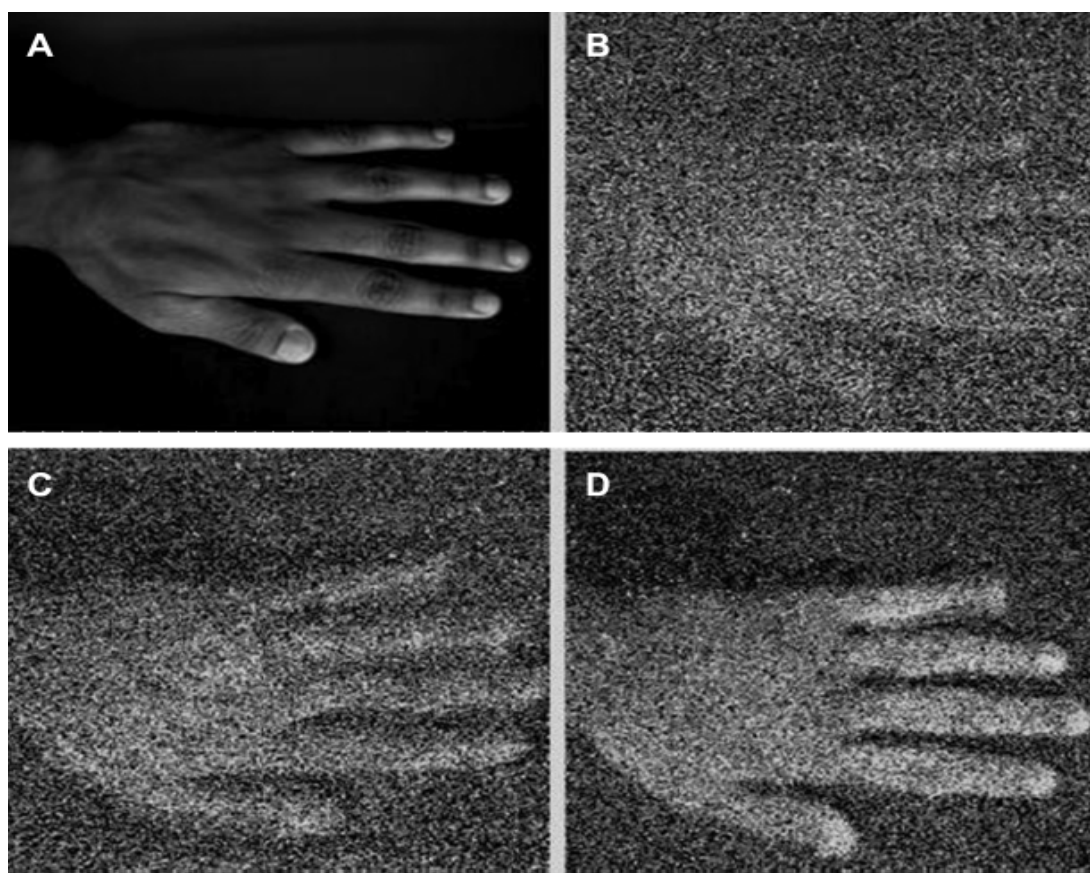
zdrojem záření je $^3(\text{R}=\text{O})^*$, tvořící se při změně 1,2 – dioxetanu (Kobayashi a kol. 2005). Nedávné experimenty (van Wijk a van Wijk 2005) měly za úkol vytvořit spektrální charakteristiku UPE z lidského těla. Mnoho vědeckých týmů už věnovalo pozornost této problematice, avšak žádnému z nich se nepodařilo sestavit konkrétnější spektrální charakteristiku. Jedním z problémů bylo použití PMT s vysokým šumem, čemuž se van Wijk snažil vyvarovat. Jeho práce opět potvrdila, že $^1\text{O}_2$ a $^3(\text{R}=\text{O})^*$ hrají roli při vzniku UPE, charakteristická část spektra u $^3(\text{R}=\text{O})^*$ byla s maximy fotonové emise v rozmezí 400 – 500 nm a u $^1\text{O}_2$, který vznikl dimolovou reakcí 634 nm a 703 nm. Další experimentálně získaná data nám ukazují, že maxima fotonové emise naměřená na lidském těle se nachází v rozmezí vlnových délek 430 – 650 nm. Naměřené hodnoty odpovídají $^3(\text{R}=\text{O})^*$ a $^1\text{O}_2$, tyto sloučeniny se tvoří v průběhu peroxidace RH (Pospíšil a kol. 2014).

Velká část výzkumu se věnuje detekci UPE z lidského těla, sestavuje nejrůznější charakteristiky v závislosti na pohlaví nebo věku (Choi a kol. 2002). Důležitou podmínkou těchto experimentů je, aby kůže byla nepoškozená. Mechanické zranění představuje jeden z abiotických stresů, který vede ke zvýšení emise fotonů (Cifra a kol. 2007). Faktory ovlivňující intenzitní a spektrální parametry UPE jsou teplota a vlhkost kůže, svalová aktivita, spektrální složení budícího UV záření a koncentrace kyslíku v okolní atmosféře, ozón, cigaretový kouř, ale vliv pH na UPE nebyl prokázán (Hagens a kol. 2008; Laager a kol. 2008). Intenzita UPE se při normálních fyziologických podmínkách může lišit až o 70% od denního průměru (Cifra a kol. 2008). Velmi podstatná je znalost časové a prostorové změny UPE u zdravých jedinců. Tyto znalosti umožňují vyvíjení nové diagnostické metody v medicíně (Cifra a kol. 2007).

Nejvíce experimentů je prováděno na rukou a to z důvodu, že jsou nejlépe dosažitelné místo lidského těla. U člověka UPE pochází z epidermální a dermální části kůže, to znamená, že UPE je možné detekovat pouze z 3 mm vrstvy (Prasad a Pospíšil 2011; Rastogi a Pospíšil 2011; Pospíšil a kol. 2014).

Pro získání podrobnějších dat bylo nutné provádět měření, která trvala 24 hodin (Cifra a kol. 2007). Jejich výsledkem bylo zjištění, že dochází k výkyvům intenzity UPE, které jsou větší na hřbetní straně ruky, než na dlaních. Ke změnám pravo – levé symetrie dochází pouze na hřbetní straně ruky, v noci je intenzita UPE vyšší na hřbetní části levé ruky, zatímco UPE hřbetní části pravé ruky je výraznější většinou v průběhu

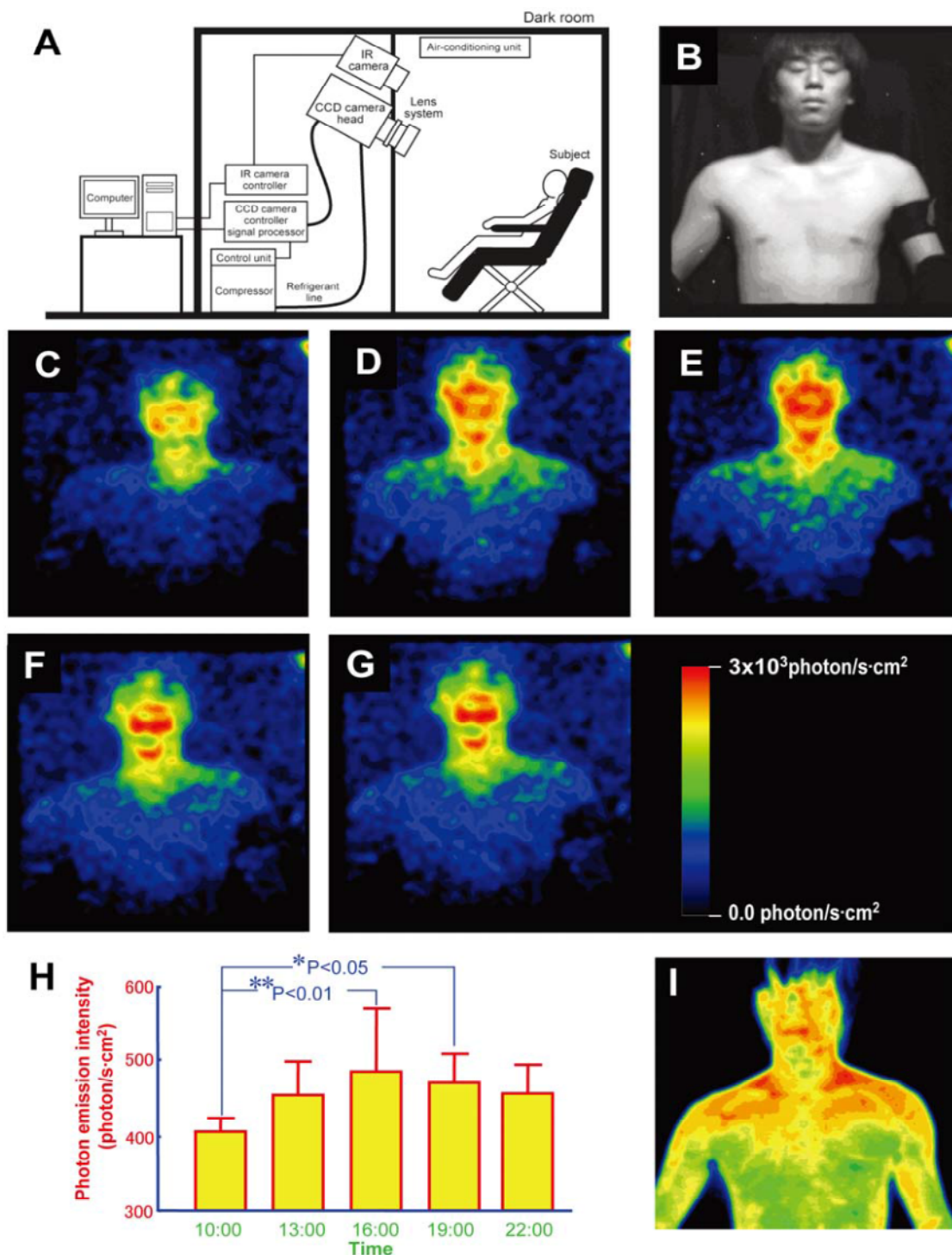
dne (van Wijk a van Wijk 2007). Další práce (Rastogi a Pospíšil 2011) zkoumala vliv antioxidantů na UPE z lidské kůže. Tento vliv byl studován poté, co pokožka ruky byla vystavena různým stresovým faktorům, ať už chemickým (H_2O_2 , cigaretový kouř) nebo fyzikálním (UV záření). Bylo zjištěno, že při použití antioxidantů (kyselina askorbová, koenzym Q10) dochází ke snížení UPE, zatímco při lokální aplikaci ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet}) dochází ke zvýšení UPE. Ultra slabá fotonová emise dosahovala nejvyšších hodnot po aplikaci HO^{\bullet} a nejnižších hodnot po aplikaci H_2O_2 (Prasad a Pospíšil 2011). Další z prací (Prasad a Pospíšil 2012) se zabývala vlivem viditelného světla a UVA záření na UPE. Pokožka ruky byla vystavena těmto zářením po dobu 5 min. Zjištěné výsledky ukázaly, že po použití UVA záření došlo ke zvýšení UPE (obr. 3).



Obr. 3: 2D obraz indukované ultra slabé fotonové emise z hřbetní strany ruky. Fotografie ruky (a), 2D obraz spontánní (b), indukované viditelným světlem (c) a indukované UVA zářením (d) ultra slabé fotonové emise ruky. V případě (b) byla ruka 30 min před měřením v úplné tmě. V případě (c, d) byla ruka vystavena viditelnému světlu (400 – 700 nm) a UVA záření (320 – 400 nm), po dobu 5 min. Fotografie ruky byla pořízeny pomocí CCD kamery při slabém světle. (Prasad a Pospíšil 2012)

Dnes již technika dovoluje zobrazovat UPE z celého lidského těla, grafický výsledek nám má přiblížit prostorové rozložení UPE v průběhu dne. Některé experimenty se zaměřují na celé tělo, jiné si pro svá měření vyberou jen několik konkrétních míst, podobně jako tomu bylo v experimentu (Cifra a kol. 2008). Lidské tělo bylo podrobena měření UPE a teploty kůže na 12 místech. Výsledky ukazují, že vzájemný vztah teploty a intenzity emise je velký na ruce, avšak na jiných částech těla je obvykle mnohem nižší a nestabilní. Byl již také vytvořen typický anatomický model UPE, na základě prostorového mapování intenzity UPE (van Wijk a van Wijk 2005; Van Wijk a kol. 2006). Získaná data ukázala, že fotonová emise z obličeje je mnohem vyšší než z jiných částí těla. Mimo jiné intenzita UPE obličeje není časově stabilní, centrální oblast kolem úst a tváře se vyznačuje vyššími hodnotami UPE než boční plochy tváře. Nejnižší intenzita UPE byla zjištěna ráno, postupně docházelo k jejímu nárůstu až k dosažení nejvyšších hodnot v odpoledních hodinách (16 hodin). Tyto výsledky ukázaly spojitost UPE s cirkadiánními rytmy (Kobayashi a kol. 2009), (obr. 4).

Ultra slabou fotonovou emisi je možné také využít k řešení problematiky nejrůznějších onemocnění. Prvním případem může být rozlišení nádorových a zdravých buněk. Metabolismus ROS v rakovinových buňkách je drasticky změněn, ve srovnání se zdravými buňkami, produkují nádorové buňky větší množství ROS. Důvodem proč tomu tak je může být fakt, že u těchto buněk dochází k potlačení antioxidačního systému. U rakovinových buněk byly také zjištěny zvýšené hodnoty Mn superoxiddismutázy a naopak bylo zaznamenáno snížení množství Cu/Zn superoxiddismutázy. Zároveň další studie ukázaly, že nádorové buňky často vykazují nízkou katalázovou aktivitu, z tohoto důvodu je pak množství superoxidu a H_2O_2 , obsažené v buňkách zvýšeno (van Wijk a kol. 2008). Avšak UPE nemusí být použita pouze pro diagnostiku nádorových onemocnění. Dalším onemocněním je ateroskleróza neboli kornatění tepen, což je chronické onemocnění cévní stěny. I v tomto případě je snahou objasnit, jakou roli hrají ROS (van Wijk a kol. 2008). U infarktu myokardu a mrtvice byla diskutována úloha peroxidace lipidů. Možný mechanismus je založen na vzniku plaků podílejících se na trombotických příhodách. K peroxidaci lipidů v tomto případě dochází především prostřednictvím ROS produkovaných monocyty/makrofágy, které ulpívají na arteriálním endotelu.



Obr. 4: A) Schematické znázornění experimentálního uspořádání. B – F) Fotografie UPE lidského těla. B. Dobrovolník vyfocený s běžným osvětlením. C) Fotografie pořízena v 10:10. D) UPE měřena ve 13:10. E) Nejvyšší UPE naměřená v 16:10. F) Zaznamenaný pokles UPE v 19:10. G) Emise v čase 22:10, vedle je vyobrazena kalibrační stupnice s odhadovanou intenzitou záření vyjádřenou počtem fotonů za jednotku času na jednotku povrchu kůže. H) Denní rytmus UPE z obličeje a těla 5 dobrovolníků. (Kobayashi a kol. 2009)

Dalším zjištěním byla nízká plazmová koncentrace antioxidantu kyseliny askorbové, tokoferolu a β – karotenu, což napovídá o snížené schopnosti aktivně se bránit vznikajícím ROS (van Wijk a kol. 2008).

Ultra slabá fotonová emise je metoda, která dokáže citlivě odrážet fyziologické procesy odehrávající se v organismu. Z tohoto důvodu může být použita pro diagnostiku v medicíně. Doposud však nebyla zveřejněna práce, na jejímž základě by bylo možné její využití v lékařství (Cifra a kol. 2007).

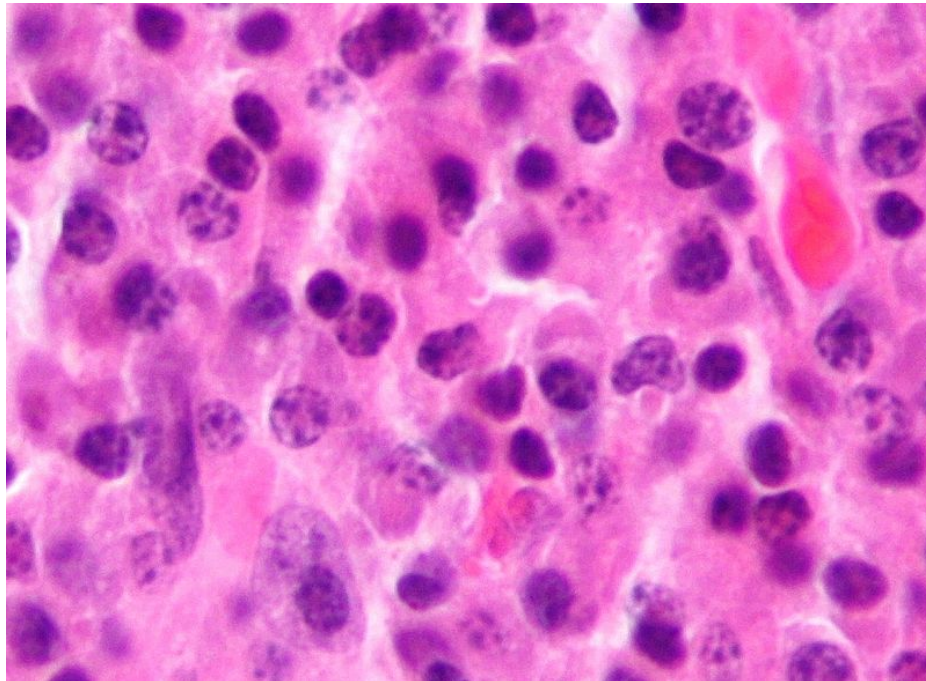
3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo bližší seznámení se spektrální charakteristikou UPE, možnými korekcemi získaného spektra a zjištění hlavního původce UPE, indukované přidáním H_2O_2 , u nádorové buněčné kultury U266.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Buněčná kultura U266

Buněčná kultura U266 představuje lidský mnohočetný myelom. V roce 1968 byla izolována kultura U266 z periferní krve od 53 – letého muže. Mnohočetný myelom, Kahlerova nemoc, plazmocytom jsou synonyma pro zhoubné nádorové onemocnění plazmatických buněk. Tyto buňky představují typ bílých krvinek, které se shlukují především v kostech a v kostní dřeni. V těchto místech narušují produkci normálních krevních buněk. Většina případů myelomu zahrnuje tvorbu protilátky, která působí poškození ledvin. Buněčná kultura byla kultivována v RPMI – 1640 médiu v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂.



Obr. 5: Buněčná kultura U266. (www.wikipedia.cz)

4.2. Médium

Pro kultivaci buněk bylo použito médium RPMI – 1640 se stabilním glutaminem, zakoupené od firmy Sigma – Aldrich (R7755).

Komponenty	g/L
Dusičnan vápenatý·4H ₂ O	0,1
Síran hořečnatý (bezvodý)	0,04884
Chlorid draselný	0,4
Chlorid sodný	6,0
Hydrogenfosforečnan sodný (bezvodý)	0,8
Kyselina jantarová·6H ₂ O·2Na	0,1
Kyselina jantarová (volná kyselina)	0,075
L – Arginin	0,2
L – Asparagin (bezvodý)	0,05
L – Asparagová kyselina	0,02
L – Cystin·2HCl	0,0652
L – Glutamová kyselina	0,02
Glycine	0,01
L – Histidin	0,015
Trans – 4 – hydroxy – L – prolin	0,02
L – Isoleucin	0,05
L – Leucin	0,05
L – Lysin·HCl	0,04
L – Methionin	0,015
L – Fenylalanin	0,015
L – Prolin	0,02
L – Serin	0,03
L – Threonin	0,02
L – Tryptofan	0,005
L – Tyrosin	0,02
L – Valin	0,02
D – Biotin	0,0002

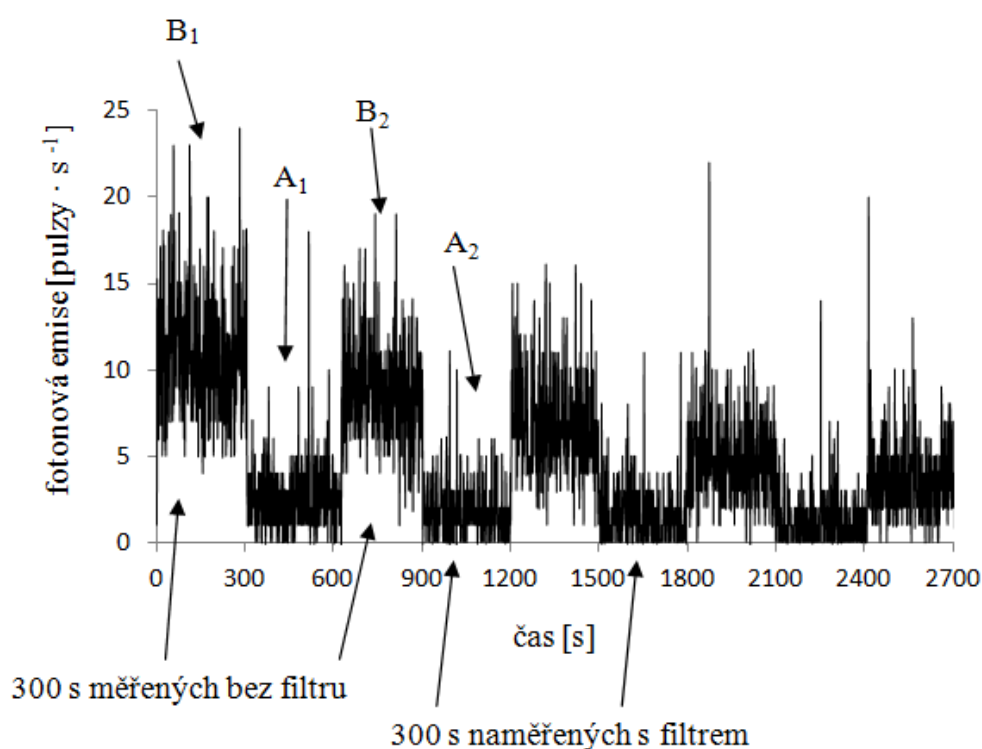
Cholin bitartrát	0,00544
Kyselina listová	0,001
Myo – Inositol	0,035
Niacinamid	0,001
P – Aminobenzoová kyselina	0,001
D – Pantothenová kyselina (hemicalcium)	0,00025
Pyridoxin·HCl	0,001
Riboflavin	0,0002
Thiamin·HCl	0,001
Vitamín B – 12	0,000005
D – Glukóza	2,0
Glutathion (redukovaný)	0,001
Fenolová červeň·Na	0,00318

4.3. PMT měření

Pro měření UPE byl použit fotonásobič Hamamatsu R7518P (Hamamatsu Photonics KK, Iwata City, Japonsko) se spektrální citlivostí v rozsahu od 185 nm do 730 nm. Počítání fotonů bylo umožněno pomocí počítačí jednotky C9744 (Hamamatsu Photonics KK, Iwata City, Japonsko). PMT bylo chlazeno na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, za použití termoelektrického chladiče C9143. Tmavá místnost je vymalovaná černou barvou a byly zde vytvořeny vhodné podmínky pro PMT a vzorky. V tmavé místnosti bylo také umístěno zařízení pro zpracování dat a ovládací počítač se nacházel ve vedlejší místnosti. Všechna měření byla naměřena při pokojové teplotě. Vzorky byly před samotným měřením 20 minut ve tmě. Poté byl vzorek v uzavřené plastové Petriho misce o průměru 5,5 cm vložen těsně pod PMT okno. Objem vzorku byl 5 ml a všechny koncentrace byly přizpůsobeny pro toto množství. Integrální intenzita UPE byla určena jako součet hodnot jednotlivých pulzů $N = \sum_{i=0}^{300} n_i$.

4.4. Vyhodnocení naměřených dat

Nejprve jsme naměřili temnostní proud, jehož průměrná hodnota dosahovala $0,99 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$, zatímco průměrná hodnota indukované UPE byla $19,68 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$. Ultra slabá fotonová emise buněčné kultury U266 byla indukována H_2O_2 (5 mM). Peroxid vodíku jsme k buněčné kultuře přidali 10 s před samotným spuštěním měření a průběh indukované UPE bez použití filtrů je zobrazen na obr. 10. Při vyhodnocování jsme se rozhodli postupovat následovně, nejprve jsme naměřili hodnotu temnostního proudu pro 300 s. Poté byl při měření se vzorkem použit vždy jen jeden filtr určité vlnové délky, celková doba jednoho měření byla 2700 s, tento časový úsek byl rozdělen na kratší části dlouhé 300 s. Prvních 300 s bylo měřeno bez filtru, následujících 300 s byl použit filtr, toto střídavé použití filtru se opakovalo po celou dobu měření, tedy 2700 s (obr. 6).



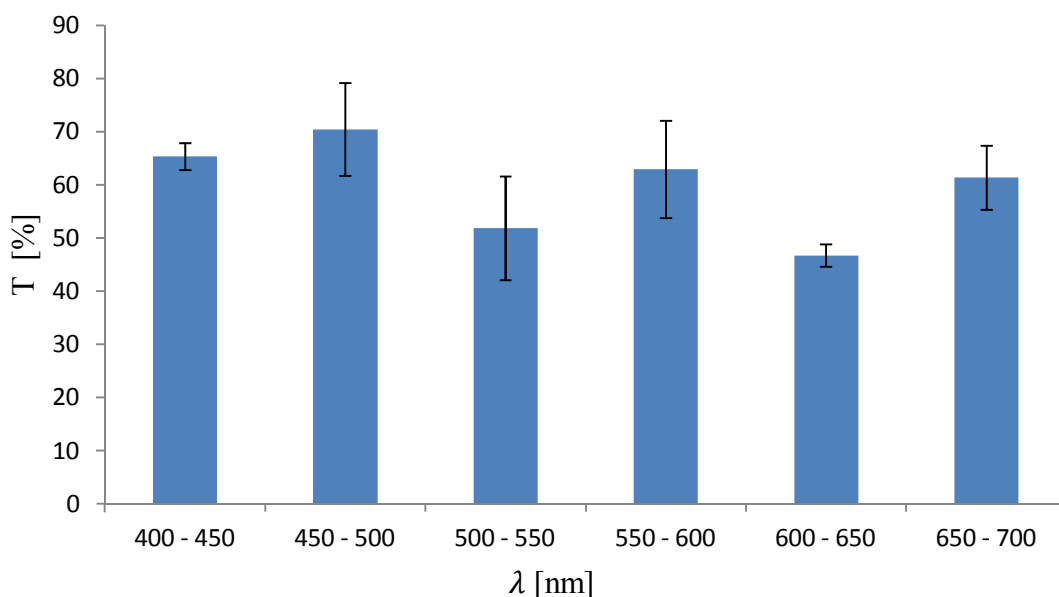
Obr. 6.: Popsaný graf indukované UPE s použitím hranových filtrů (600 nm), zobrazující jednotlivé úseky s fitry (A úseky) a bez nich (B úseky).

Při vyhodnocování naměřených dat jsme nejprve určili hodnotu temnostního proudu pro 300 s, kterou jsme odečetli od všech naměřených úseků dlouhých 300 s. Poté jsme k dalšímu výpočtu využili vztah $X_1 = \frac{2 \cdot \Sigma A_1}{\Sigma B_1 + \Sigma B_2} \cdot 100$, kde X_1 je součet pulzů $\cdot s^{-1}$ detekovaných v přítomnosti filtrů, normován na součet pulzů $\cdot s^{-1}$ bez filtrů, A_1 představuje naměřené hodnoty po dobu 300 s (tedy 300 hodnot) při prvním použití filtru, B_1 zahrnuje hodnoty (naměřené po dobu 300 s), kde nebyl použit filtr a B_2 jsou hodnoty získané při měření bez filtru v druhém úseku. Tímto způsobem jsme určili první mezivýsledek, který použijeme k výpočtu průměrné hodnoty pro daný filtr. Stejně budeme postupovat i při určení dalších mezivýsledků, tedy pro výpočet 2. hodnoty bude mít vzorec tvar $X_2 = \frac{2 \cdot \Sigma A_2}{\Sigma B_2 + \Sigma B_3} \cdot 100$ a tímto postupem získáme i X_3 , X_4 a z těchto 4 hodnot (X_1 , X_2 , X_3 , X_4), vypočítáme průměrnou hodnotu. Stejným postupem dopočítáme průměrné hodnoty pro zbývající filtry a získáme výsledek pro $X_{400} - X_{700}$, $X_{400} -$ výsledná hodnota 400 nm, $X_{700} -$ výsledná hodnota 700 nm. Tyto výsledky pouze v případě hranových filtrů ještě odečítáme tj. $X_{400-450} = X_{400} - X_{450}$, $X_{450-500} = X_{450} - X_{500}$, tímto způsobem dopočítáme zbývající hodnoty (tento krok je zcela vynechán v případě pásových filtrů). Po třech opakováních měření jsme postupně získali 3 hodnoty $X_{400-450} - X_{650-700}$, poté jsme z těchto 3 hodnot znovu určili průměrnou hodnotu, následně dopočítali směrodatnou odchylku a výsledky uvedli v podobě sloupcových grafů. Téměř stejný postup výpočtu jsme použili i u pásových filtrů.

4.5. Propustnost filtrů

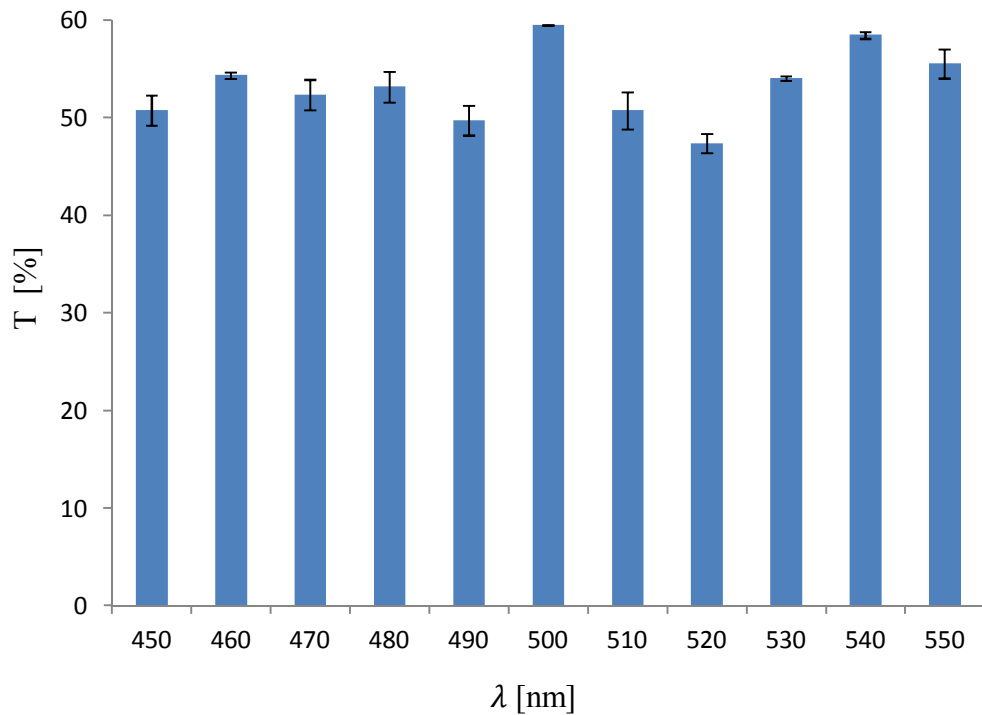
Při měření spektrální charakteristiky UPE z buněčné kultury U266 jsme využili dva typy filtrů, které byly zakoupené u americké firmy Andover Corporation (Salem, New Hampshire).

Prvním typem byly hranové filtry. Tyto filtry byly v rozsahu vlnových délek 400 – 700 nm. Pro zjištění propustnosti filtrů jsme použili dvoupaprskový spektrofotometr, naměřené hodnoty i s vypočítanou směrodatnou odchylkou jsou zobrazeny na obr. 7.



Obr. 7: Graf zobrazuje naměřené hodnoty propustnosti hranových filtrů v rozmezí 400 – 700 nm, uvedena je také směrodatná odchylka měření.

Pásové filtry byly druhým typem použitých filtrů, pro naše měření byly využity v rozsahu vlnových délek 450 – 550 nm. Stejně jako u hranových filtrů, tak i u pásových jsme pomocí dvoupaprskového spektrofotometru naměřili propustnost a dopočítali směrodatnou odchylku měření (obr. 8).



Obr. 8: Naměřené hodnoty propustnosti pásových filtrů v rozmezí 450 – 550 nm, s dopočítanou směrodatnou odchylkou měření.

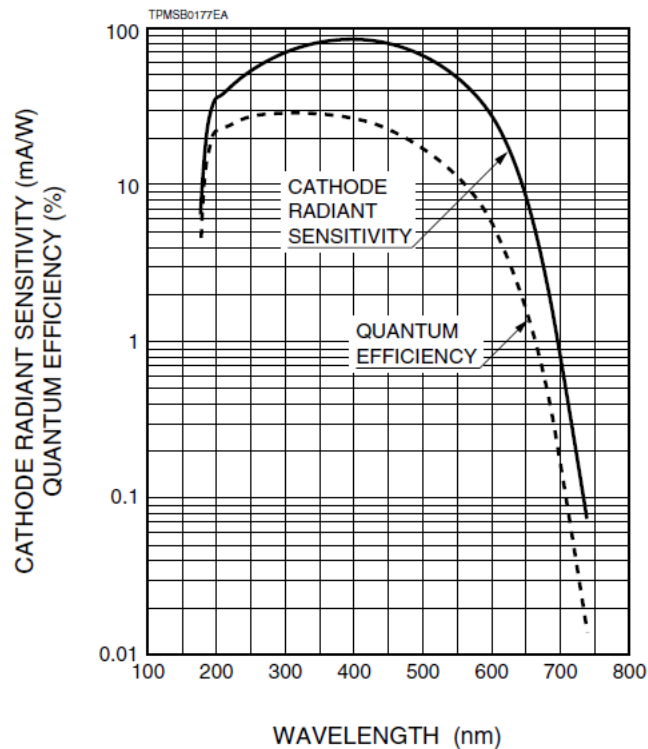
Po naměření propustnosti filtrů byly tyto hodnoty upraveny následujícím způsobem $\frac{100}{T}$, z těchto přepočítaných hodnot byl určen průměr a následně také směrodatná odchylka měření $\frac{100}{T}$. Tato data bylo nutné zahrnout do výsledných výpočtů, pro která jsme využili jednoduchého vzorce $\phi = \frac{N}{T} \cdot 100$, kde ϕ představuje výslednou dopočítanou hodnotu indukované UPE, N je hodnota indukované UPE bez korekcí a T je naměřená propustnost filtrů. Bylo ještě nutné dopočítat výslednou směrodatnou odchylku, k tomu jsme použili vztah

$$\bar{\sigma} T = N \cdot \frac{100}{T} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma N}{N}\right)^2 + \left(\frac{\sigma T}{\frac{100}{T}}\right)^2}, \quad N \text{ je hodnota indukované UPE bez korekcí, } T \text{ je}$$

naměřená propustnost filtrů, σN představuje směrodatnou odchylku hodnot indukované UPE bez korekcí, σT je směrodatná odchylka měření $\frac{100}{T}$ a $\bar{\sigma} T$ je výsledná směrodatná odchylka $\frac{100}{T}$. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafech na obr. 12 a 13.

4.6. Kvantová účinnost PMT

Tato vlastnost fotonásobiče představuje procentuální poměr počtu emitovaných elektronů k počtu dopadajících světelných fotonů. Pro získání hodnot kvantové účinnosti jsme vycházeli z obr. 9, hodnoty uvedené v grafu s logaritmickým měřítkem bylo nutné přepočítat (tabulka 1. a 2.).



Obr. 9: Typické spektrální rozložení kvantové účinnosti bíalkalické fotokatody. (Hamamatsu Photonics K. K. 2010)

λ [nm]	400 - 450	450 - 500	500 - 550	550 - 600	600 - 650	650 - 700
η [%]	24,40	19,55	13,83	8,23	3,16	0,58

Tabulka 1: Vypočítané hodnoty kvantové účinnosti pro hranové filtry.

λ [nm]	η [%]
450	22,50
460	21,08
470	20,08
480	18,82
490	17,93
500	16,53
510	15,75
520	14,52
530	13,61
540	12,35
550	11,02

Tabulka 2: Přepočítané hodnoty kvantové účinnosti pro pásové filtry.

Po přepočítání hodnot kvantové účinnosti byla tato data vyhodnocena společně s původními hodnotami indukované UPE. Pro dopočítání hodnot jsme použili následující vzorec $\phi = \frac{N}{\eta} \cdot 100$, ϕ je výsledná dopočítaná hodnota indukované UPE, N představuje hodnotu indukované UPE bez korekcí a η je kvantová účinnost fotonásobiče. Pomocí vzorce $\bar{\sigma} \eta = \left(\frac{\sigma N}{\eta}\right) \cdot 100$, $\bar{\sigma} \eta$ je výsledná směrodatná odchylka kvantové účinnosti PMT, σN představuje směrodatnou odchylku hodnot indukované UPE bez korekcí a η je kvantová účinnost PMT byla dopočítána výsledná směrodatná odchylka kvantové účinnosti PMT. Data s těmito korekcemi jsou uvedena v grafech na obr. 15 a 16.

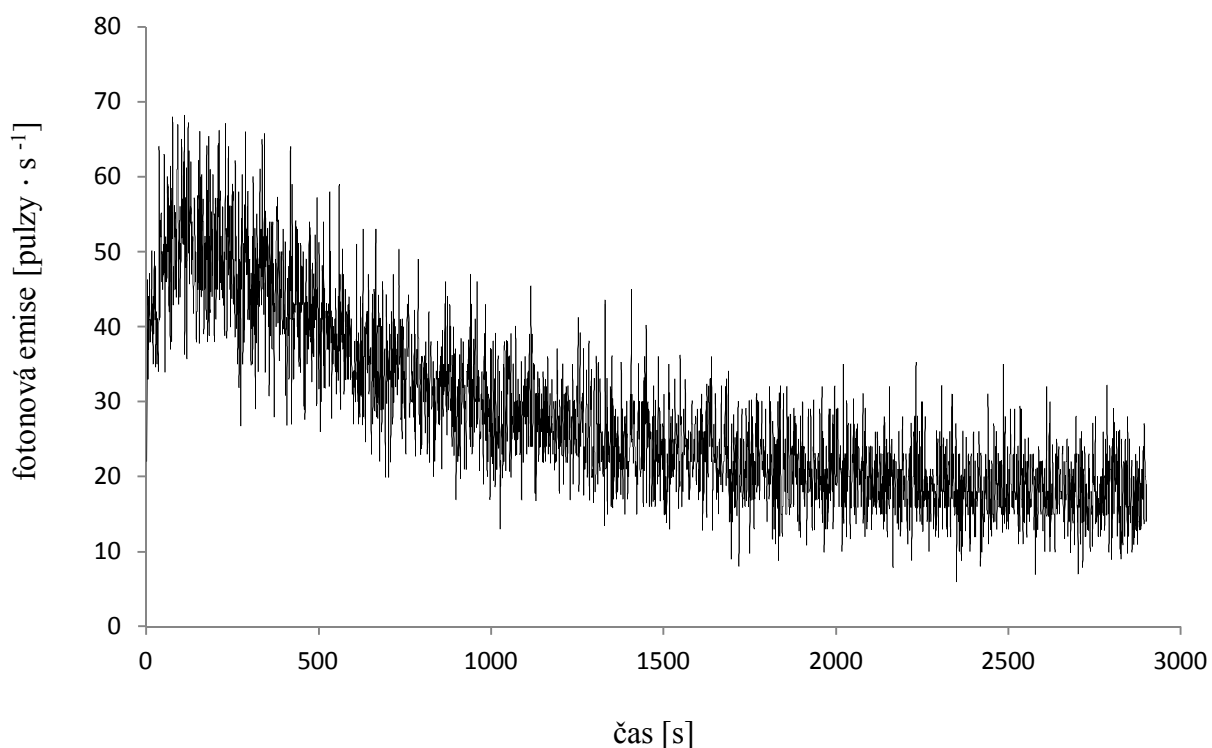
4.7. Výsledná korekce naměřených dat

Nejprve jsme se rozhodli pro jednotlivé korekce hodnot indukované UPE, tedy korekci spektrální charakteristiky propustností filtrů a poté kvantové účinnosti PMT. Musíme si však uvědomit, že získaná data byla ovlivněna současně propustností filtrů i kvantovou účinností a tato skutečnost se musí projevit i ve výsledném grafu. Pro výpočet výsledné hodnoty indukované UPE jsme použili vztah $\phi = \frac{N}{T \cdot \eta} \cdot 10000$, ϕ je výsledná dopočítaná hodnota indukované UPE, N představuje hodnotu indukované UPE bez korekcí, T je propustnost filtrů a η je kvantová účinnost PMT. K dopočítání výsledné směrodatné odchylky jsme využili vzorce $\bar{\sigma} \phi = \left(\frac{\bar{\sigma} T}{\eta}\right) \cdot 100$, $\bar{\sigma} \phi$ je výsledná směrodatná odchylka indukované UPE, η - kvantová účinnost PMT a $\bar{\sigma} T$ je výsledná směrodatná odchylka $\frac{100}{T}$. Graf s těmito dopočítanými hodnotami je na obr. 17 a 18.

5. VÝSLEDKY

5.1. Ultra slabá fotonová emise indukovaná peroxidem vodíku

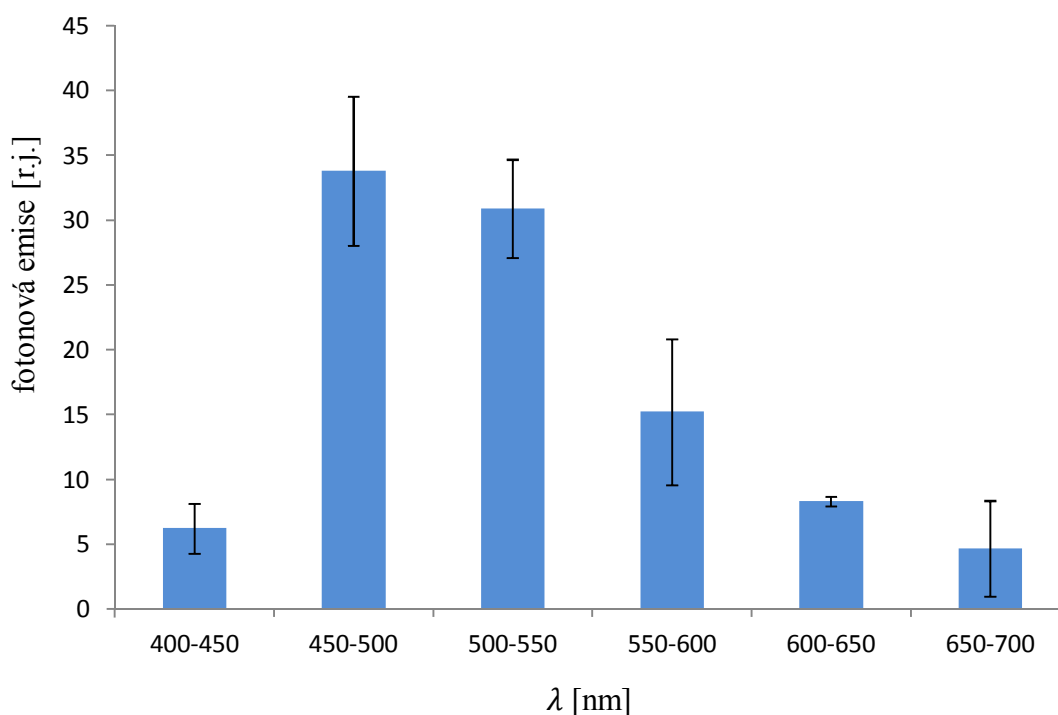
Po prvním měření trvajícím 2700 s byl z naměřených dat vytvořen graf (obr. 10), zobrazující indukovanou UPE u buněčné kultury U266 (průměrná hodnota dosahovala $19,68 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$). Vzorky byly před samotným měřením umístěny na 20 minut do tmy, poté k nim byl přidán 5 mM H_2O_2 , jímž byla indukována UPE.



Obr. 10: Ultra slabá fotonová emise indukovaná u buněčné kultury U266 H_2O_2 o koncentraci 5 mM.

5.2. Spektrální charakteristika indukované UPE určena hranovými filtry

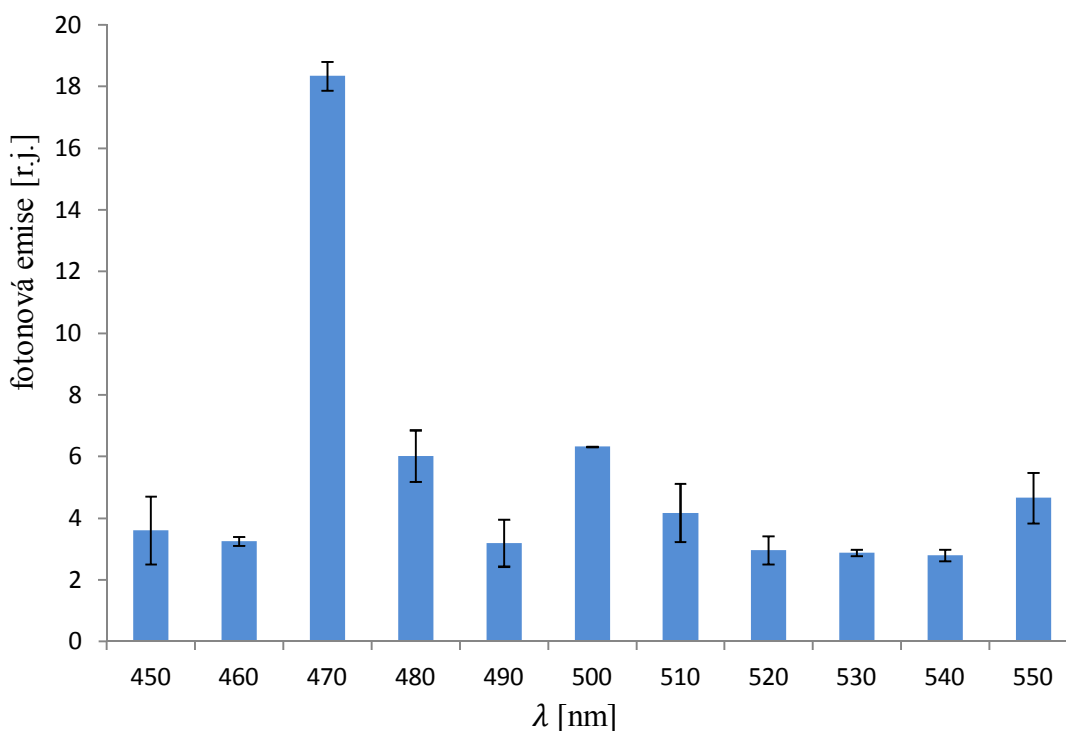
Jednotlivými hranovými filtry jsme proměřili vždy jen část spektra o vlnové délce 50 nm, k měření jsme použili 6 filtrů v celkovém rozmezí 400 – 700 nm. Na obr. 11 vidíme, že maximum fotonové emise se nachází v oblasti 450 – 500 nm. Hranové filtry nám však neumožňují přesnější určení maxima fotonové emise a proto v dalším měření byly použity pásové filtry. Nejenže nám tento graf určuje oblast maxima fotonové emise, pomáhá nám také určit důležitost korekcí propustnosti filtrů. Příkladem může být poslední sloupec popisující oblast 650 – 700 nm, vidíme, že směrodatná odchylka zde nabývá téměř stejné velikosti jako samotná hodnota indukované UPE. Získaná data s podobnou směrodatnou odchylkou nejsou pro další vyhodnocování podstatná.



Obr. 11: Spektrální charakteristika indukované UPE buněčné kultury U266, naměřená hranovými filtry. Ultra slabá fotonová emise byla indukovaná 5mM H_2O_2 . Ze získaných dat byla vždy odečtena hodnota temnostního proudu a následně byla dopočítána také směrodatná odchylka.

5.3. Spektrální charakteristika indukované UPE určena pásovými filtry

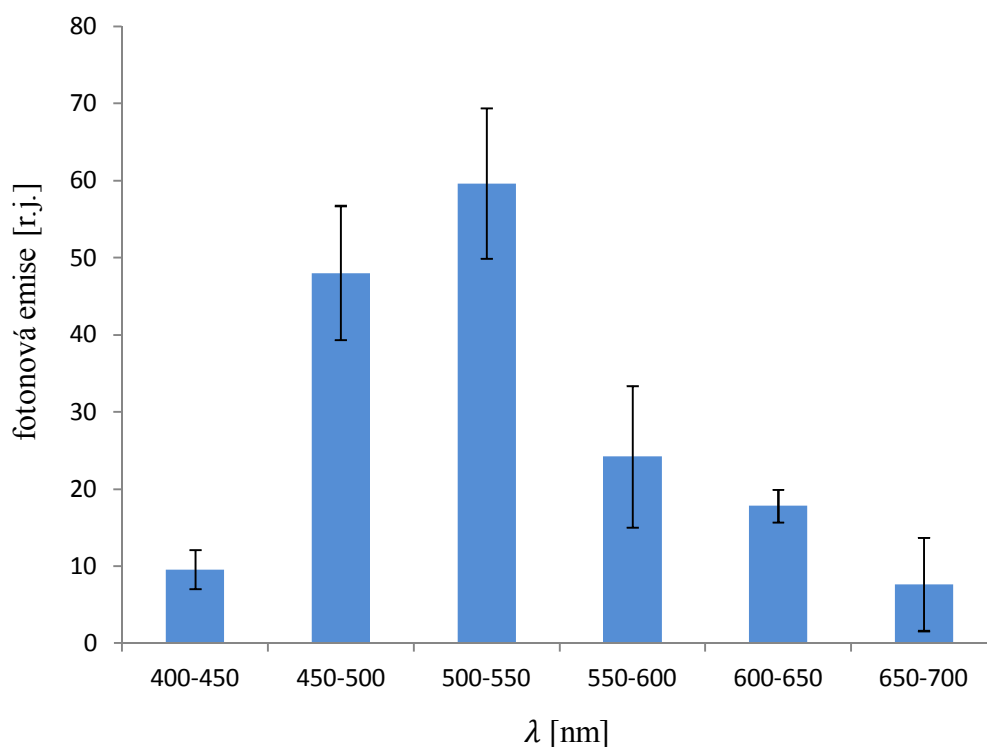
Hranové filtry nám poskytly obecnější spektrální charakteristiku, avšak ta byla důležitá pro orientaci ve spektru. Jak již bylo zmíněno, maximum fotonové emise se nachází v rozmezí 450 – 500 nm a pro získání konkrétnějších výsledků jsme použili pásové filtry. Celkem 11 filtrů v oblasti 450 – 550 nm, každý z nich určuje hodnotu indukované UPE v rozmezí 10 nm. Podmínky měření byly stejné jako v předchozím případě s hranovými filtry. Obrázek 12 ukazuje grafický výsledek naměřených dat, maxima fotonové emise bylo dosaženo při 470 nm, toto číslo nám zároveň určilo i možného původce indukované UPE. Maximum fotonové emise 470 nm náleží do oblasti 350 – 550 nm, která je charakteristická pro ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$.



Obr. 12: Spektrální charakteristika indukované UPE (5 mM H_2O_2) pořízena u buněčné kultury U266 pásovými filtry. Graf zobrazuje upravené výsledky, které byly získány odečtením temnostního proudu od naměřených hodnot.

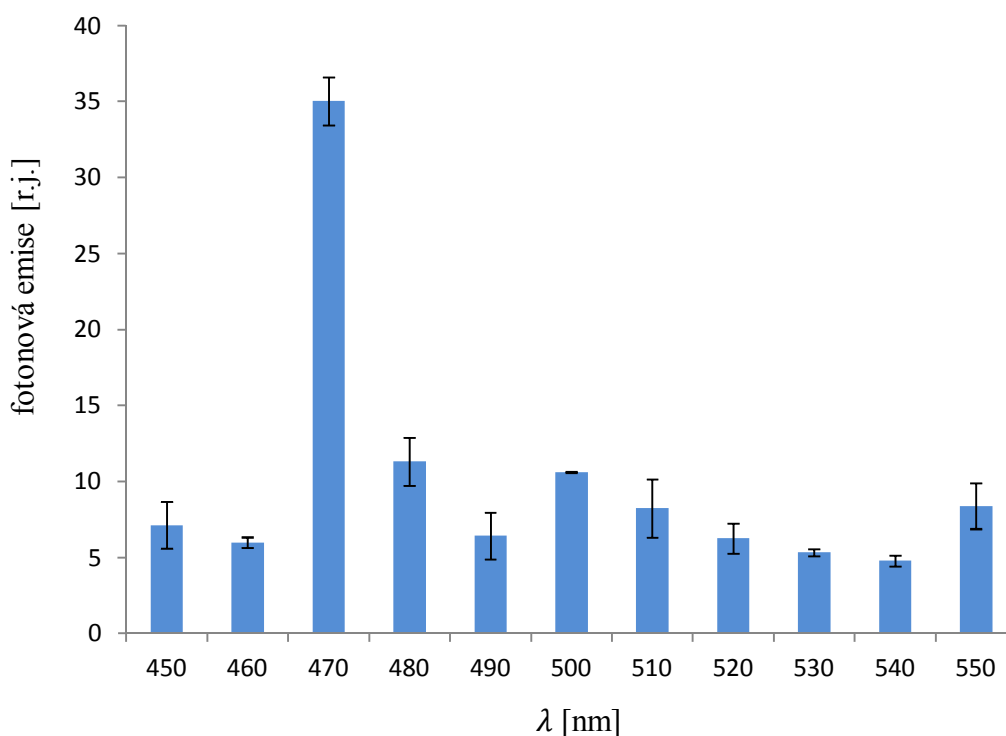
5.4. Vliv propustnosti filtrů na výslednou spektrální charakteristiku

Tato práce se zaměřila mimo jiné i na posouzení důležitosti korekcí naměřených výsledků při spektrální charakteristice indukované UPE. Stejně jako i ostatní měření, bylo toto opakováno 3x a ze získaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka (obr. 13). Abychom mohli posoudit vliv korekce propustnosti hranových filtrů, musíme tato data srovnat s daty na obr.11. První rozdíl můžeme sledovat při určení maxima fotonové emise, které se v případě indukované UPE bez korekcí nacházelo v rozmezí 450 – 500 nm, s korekcemi je to oblast 500 – 550 nm. Další odlišností jsou také velikosti hodnot indukované UPE, zatím co bez korekcí byla naměřena v rozmezí 4,69 – 33,81 pulzů · s⁻¹, s korekcí hranových filtrů se její hodnota zvýšila na 7,64 – 59,64 pulzů · s⁻¹, u dat s korekcí došlo také k nárůstu směrodatné odchylky.



Obr. 13: Indukovaná UPE (5 mM H₂O₂) u buněčné kultury U266 byla naměřena s použitím hranových filtrů. Přepočítané hodnoty indukované UPE, zohledňující vliv propustnosti hranových filtrů na výslednou spektrální charakteristiku.

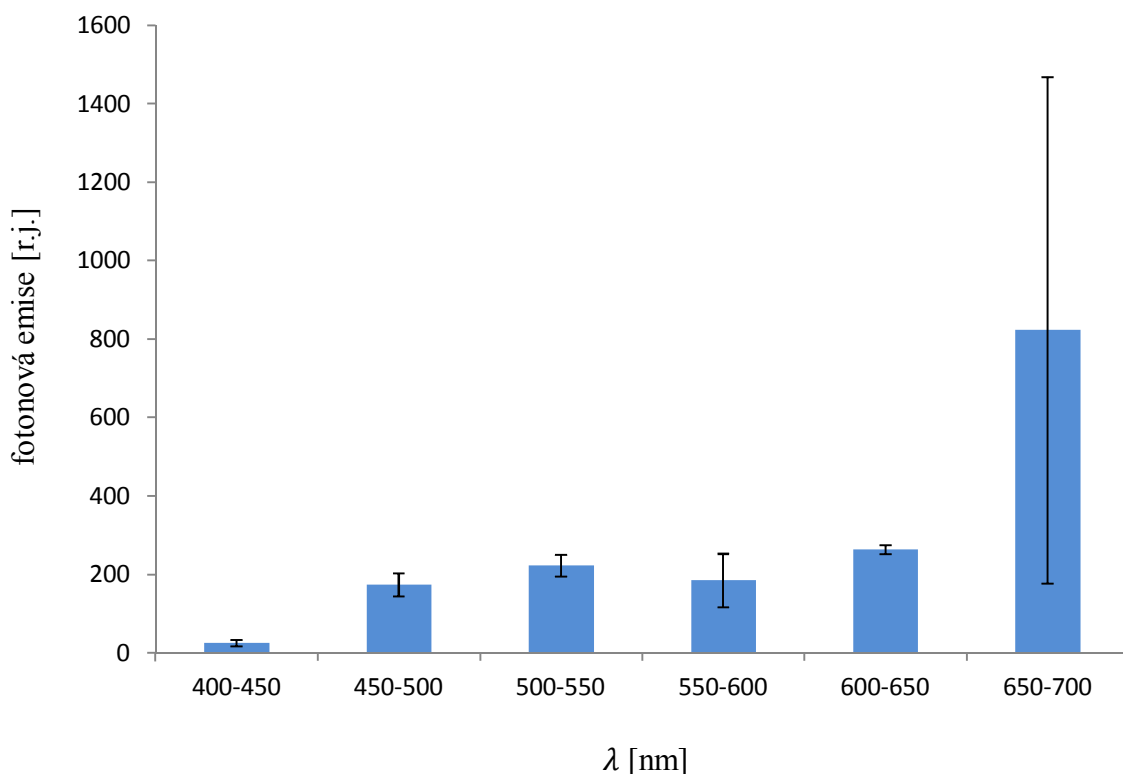
V předchozím případě jsme se zaměřili na vyhodnocení výsledků získaných hranovými filtry, stejně tak můžeme posoudit i data získaná pásovými filtry (obr. 14). V tomto případě bylo zachováno maximum fotonové emise (470 nm), ale i zde pozorujeme rozdíly v hodnotách indukované UPE, bez korekcí (obr. 12) nabývala indukovaná UPE hodnot 2,80 – 18,34 pulzů · s⁻¹ a s korekcemi 4,79 – 35,03 pulzů · s⁻¹. Vidíme, že u hranových i pásových filtrů se mohou data s korekcemi a bez nich lišit téměř o polovinu naměřené hodnoty, toto zjištění ukazuje na důležitost často opomíjených korekcí propustnosti filtrů.



Obr. 14: Dopočítané hodnoty indukované UPE ukazující vliv propustnosti pásových filtrů na výslednou spektrální charakteristiku.

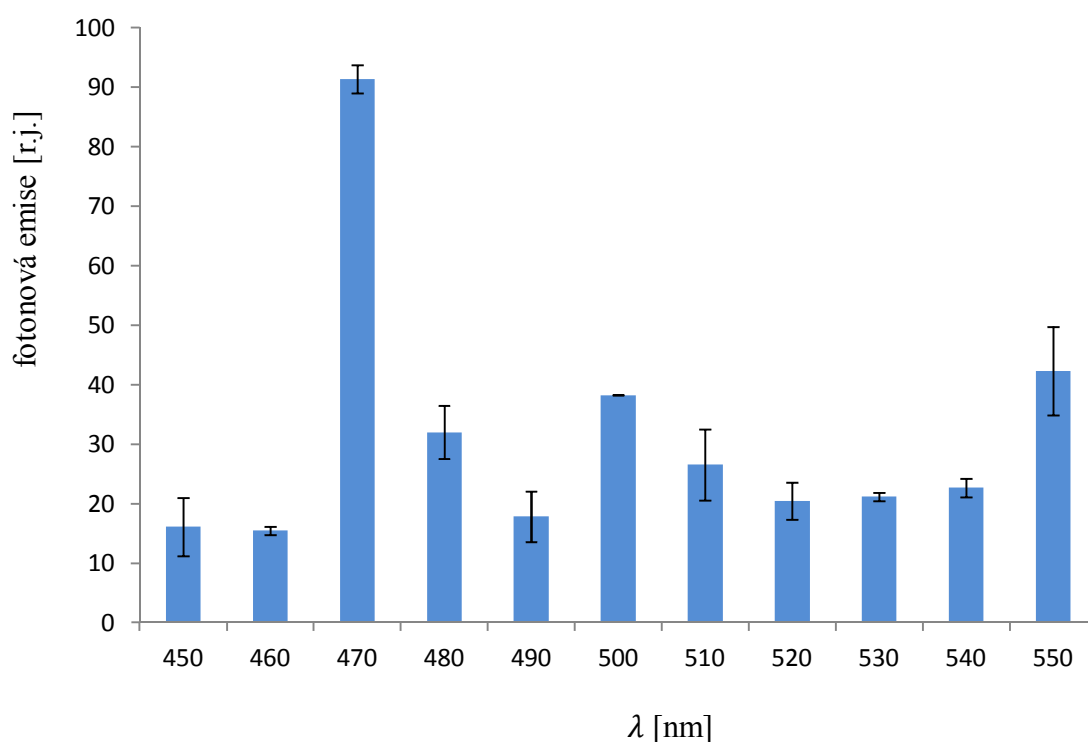
5.5. Vliv kvantové účinnosti PMT na výslednou spektrální charakteristiku

Při korekcích nesmíme opomenout důležitost kvantové účinnosti PMT, který je nezbytnou součástí měření. Obrázek 15 zobrazuje výsledek provedené korekce kvantové účinnosti, který budeme porovnávat s daty bez korekcí (obr. 11). Na první pohled je vidět značná změna, která nastala při zobrazení dat s korekcemi, nově získaná spektrální charakteristika zcela změnila svůj charakter. U maxima fotonové emise došlo k posunu ze 450 – 500 nm na 650 – 700 nm a také se zvýšila hodnota indukované UPE z 4,69 – 33,81 pulzů · s⁻¹ na 25,53 – 822,81 pulzů · s⁻¹. Při porovnání hodnot těchto dvou rozmezí vidíme, k jak velkému rozdílu dochází vlivem korekcí. V neposlední řadě je nutné také vyhodnotit směrodatnou odchylku měření, která v oblasti 650 – 700 nm dosahuje u průměrné hodnoty indukované UPE (822,81 pulzů · s⁻¹) velikosti 645,61 pulzů · s⁻¹, výsledek s takto velkou směrodatnou odchylkou není podstatný.



Obr. 15: Graf zobrazující vliv kvantové účinnosti PMT na výslednou podobu spektrální charakteristiky indukované UPE získané měřením s hranovými filtry.

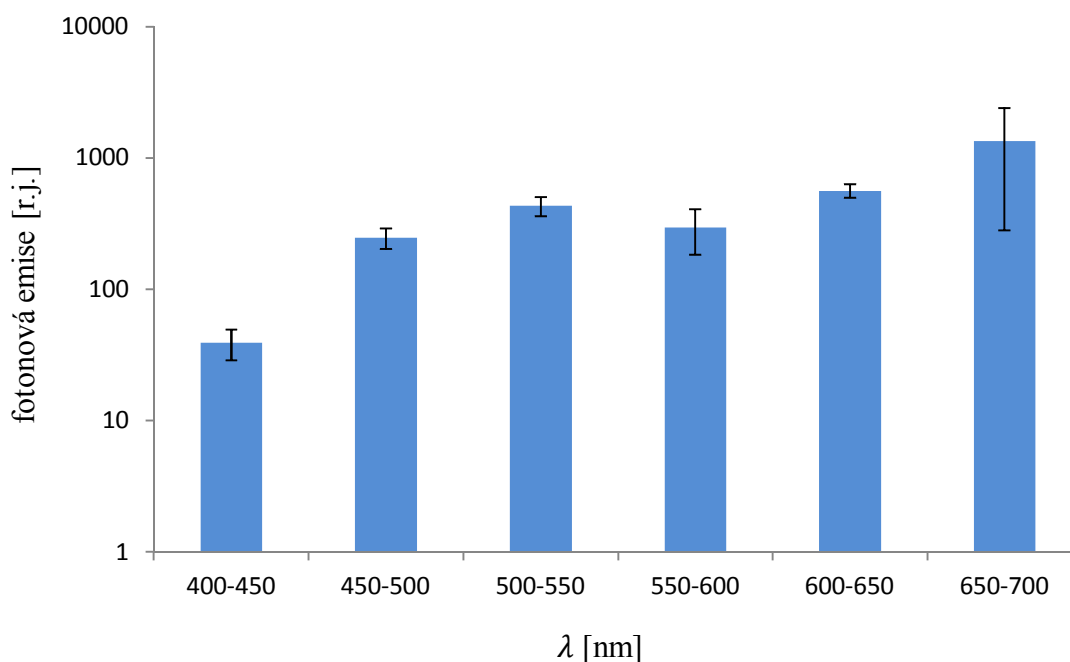
Stejně tak byla provedena korekce kvantové účinnosti u výsledků naměřených pásovými filtry. V tomto případě nedošlo ke změně maxima fotonové emise (470 nm), ale opět byly po korekci kvantové účinnosti PMT zjištěny mnohem vyšší hodnoty indukované UPE. Charakteristické hodnoty bez korekcí byly naměřeny v rozmezí $2,80 - 18,34 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$, s korekcemi kvantové účinnosti PMT došlo k mnohonásobnému navýšení na $28,45 - 174,44 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$ a opět i zde se došlo ke zvětšení směrodatné odchylky, avšak ne tak významně jako v případě hranových filtrů.



Obr. 16: Spektrální charakteristika indukované UPE vytvořena na základě dat naměřených pásovými filtry a následně upravena, tak aby ukazovala vliv kvantové účinnosti PMT na výsledné hodnoty.

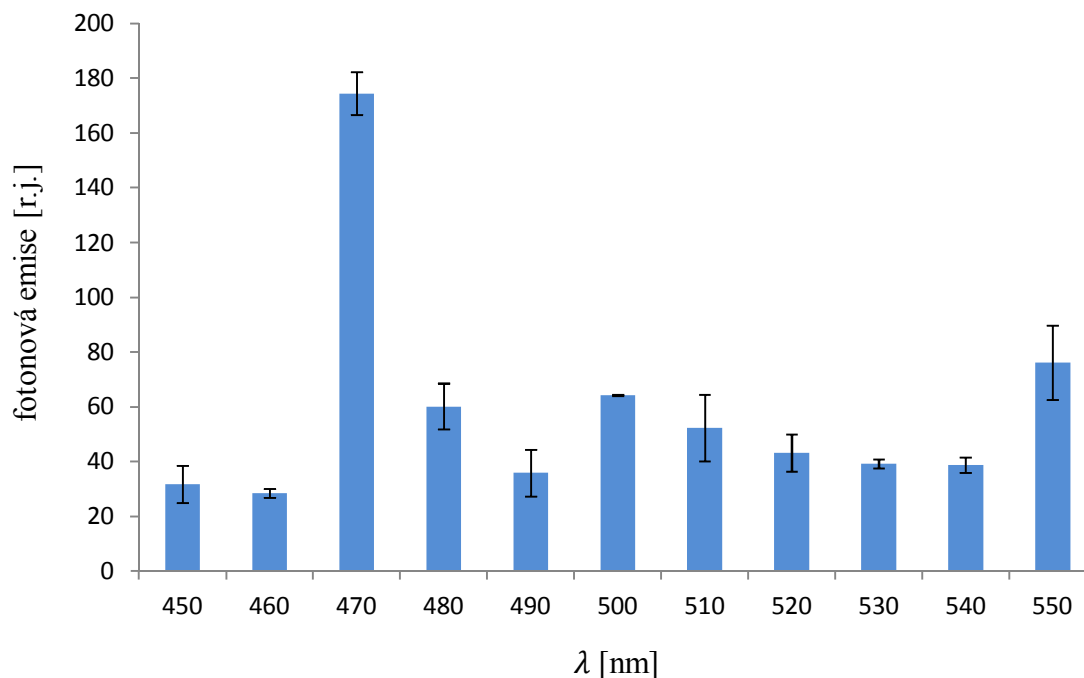
5.6. Vliv propustnosti filtrů a kvantové účinnosti PMT na výslednou spektrální charakteristiku

Je nutné si uvědomit, že propustnost filtrů a kvantová účinnost PMT, ovlivňují výsledná data společně. Předchozí výsledky nám ukázaly, jakou změnu ve výsledné spektrální charakteristice můžeme očekávat, pokud budeme uvažovat ovlivnění jen propustností filtrů nebo kvantovou účinností. Následující grafy (obr. 17 a 18) ukazují společný vliv kvantové účinnosti a propustnosti filtrů na výsledné spektrum. Spojením těchto dvou korekcí získáváme ještě vyšší hodnoty indukované UPE, než při jednotlivých korekcích, což vedlo ke konstrukci grafů s logaritmickým měřítkem pro větší přehlednost. Současně se zvyšující se hodnotou indukované UPE, také vzrůstá směrodatná odchylka měření.



Obr. 17: Výsledná spektrální charakteristika indukované UPE původně získaná pomocí hranových filtrů. Graf ukazuje změnu charakteristiky po započítání propustnosti filtrů a kvantové účinnosti PMT.

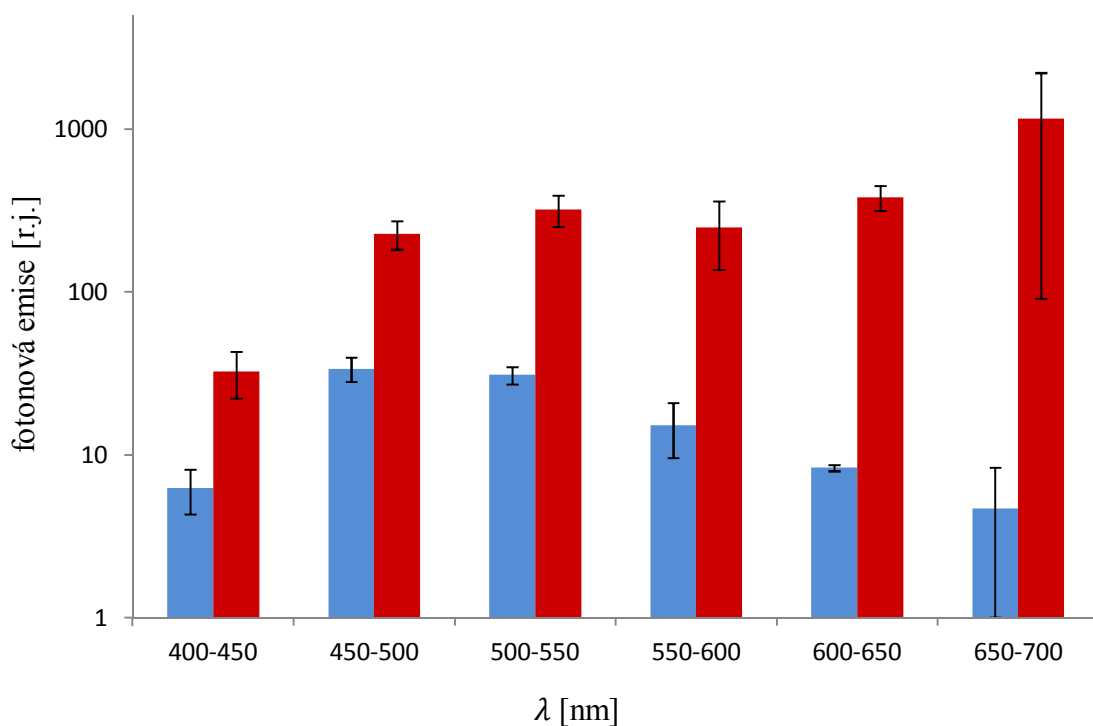
Již zmíněná úprava dat byla provedena i u grafu zobrazujícího spektrální charakteristiku UPE získanou pomocí pásových filtrů.



Obr. 18: Výsledná spektrální charakteristika indukované UPE získaná pásovými filtry. Graf zobrazuje změnu spektrální charakteristiky po započítání kvantové účinnosti PMT a propustnosti filtrů.

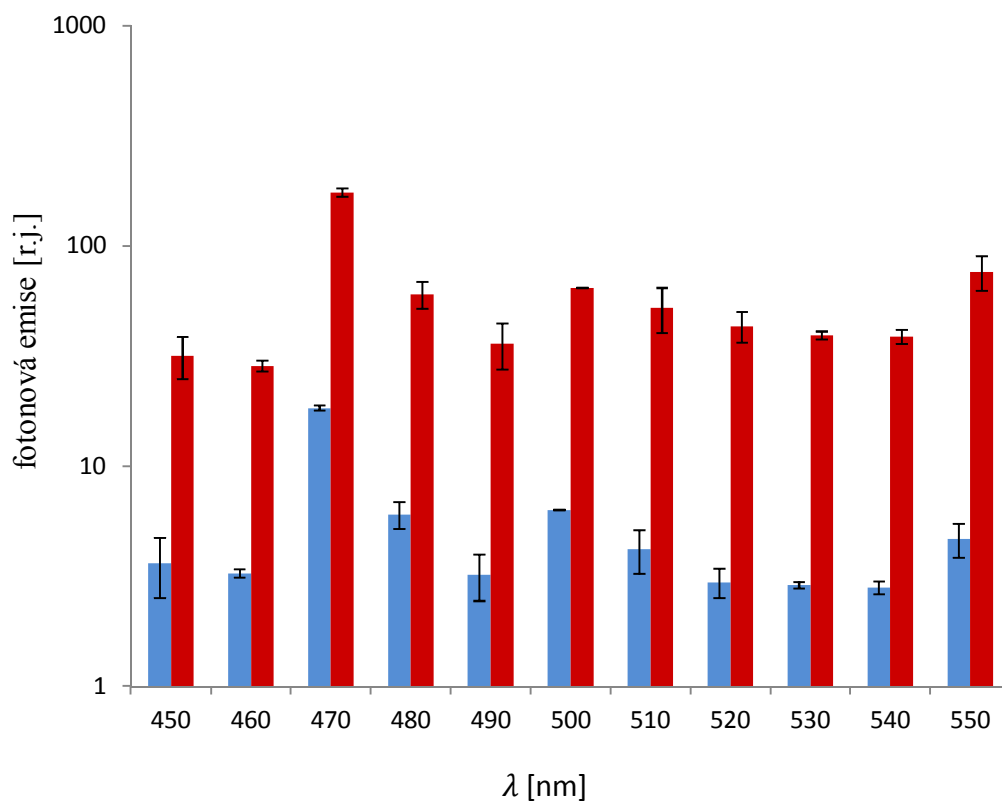
5.7. Porovnání původní a výsledné spektrální charakteristiky

Pro lepší srovnání naměřených a následně pak upravených dat, jsou původní a výsledné spektrální charakteristiky uvedeny v jednom grafu, abychom lépe mohli posoudit vliv provedených korekcí. Modré sloupce představují data bez korekcí a červené sloupce ukazují výsledné hodnoty indukované UPE se současně započítanými korekcemi propustnosti filtrů i kvantovou účinností PMT. Největší rozdíly mezi těmito dvěma sloupci pozorujeme u 600 – 650 nm a zvláště pak u 650 – 700 nm. Nejenže směrodatná odchylka u indukované UPE bez korekcí nabývá téměř velikosti výsledných hodnot, ale i rozdíl hodnot indukované UPE bez korekcí ($4,69 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$) a s nimi ($1152,55 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$) je více než 245x vyšší. Toto zjištění opět potvrzuje, že výsledky získané v oblasti 650 – 700 nm jsou irelevantní.



Obr. 19: Logaritmičtý graf zobrazuje spektrální charakteristiky UPE naměřené u buněčné kultury U266. Modré sloupce představují původní data bez úprav, červené sloupce ukazují, jaký vliv na naměřená data mají korekce kvantové účinnosti PMT a zároveň i propustnosti filtrů.

Podobné porovnání je možné i v případě spektrální charakteristiky naměřené pásovými filtry. I zde můžeme vidět velké rozdíly mezi hodnotami indukované UPE s korekcemi a bez nich.



Obr. 20: Spektrální charakteristika indukované UPE naměřená pro buněčnou kulturu U266, zobrazena v grafu s logaritmickou osou. Modré sloupce zastupují původní data bez úprav, červené sloupce představují vliv korekcí (kvantové účinnosti PMT a zároveň i propustnosti filtrů) na naměřená data.

6. DISKUZE

Přestože fenoménu UPE je v posledních letech věnována větší pozornost, než tomu bylo dříve, často při vyhodnocování naměřených dat je opomíjena důležitost korekcí. V mnohých pracích jsou uvedeny hodnoty temnostních proudů (Kobayashi 2005; van Wijk a kol. 2005), kvantové účinnosti PMT (Kobayashi 2005), ale ve většině případů zcela chybí informace, jakým způsobem byla tato data použita, není tedy jasné, jestli u uvedených výsledků byly provedeny korekce.

Výsledky prací nelze kvantitativně porovnávat i z dalších důvodů, UPE může být u nejrůznějších biologických systémů indukována různými látkami nebo odlišnými koncentracemi stejných látek. Tato práce měřila UPE indukovanou H_2O_2 o koncentraci 5 mM, tým Cadenase (Cadenas a kol. 1980), použil ke studiu zhasičů UPE také H_2O_2 , ale o koncentraci 10 mM. Peroxid vodíku, ale není jedinou používanou látkou, své uplatnění při indukci UPE nachází i hydroperoxydy, konkrétně t – butyl – hydroperoxid. Tato látka o koncentraci 5 mM byla využita pro indukci UPE u mitochondrií z hovězího masa (Cadenas a kol. 1980). Případně může být použita kombinace látek, jako například t – butyl – hydroperoxid (20 μ M) s cytochromem c (5mM) (Cadenas a kol. 1980). Nesmíme zapomínat, že nejen tyto látky jsou možným zdrojem indukované UPE. Měření (Hagens a kol. 2008; Prasad a Pospíšil 2012), která sledovala indukci UPE na lidské pokožce, používala viditelné světlo, UVA záření nebo cigaretový kouř. U těchto zdrojů indukované UPE obvykle neuvádíme koncentrace, ale zaměřujeme se na délku trvání a kontinuitu působení, v případě záření je důležitým faktorem vymezení charakteristické spektrální oblasti. Kromě H_2O_2 může být při experimentech na lidské kůži použit $O_2^{\bullet -}$ nebo HO^{\bullet} . Koncentrace použité látky nemusí být po celou dobu stabilní, ale může docházet ke změnám, podobně jako v některých studiích provedených například u rostlin. Indukovanou UPE využíváme při testech klíčivosti pšenice (Siqueira a kol. 2007), semena jsou po určitou dobu namočena ve směsi destilované vody a oxidačního činidla dichromanu draselného. Koncentrace tohoto činidla se postupně mění (0 %, 3 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 %, 100 %) a pomocí naměřené UPE je možné pozorovat změny v koncentraci dusíku (zahrnuje také dusitany, dusičnany a amoniak), fosforu a uhlíku.

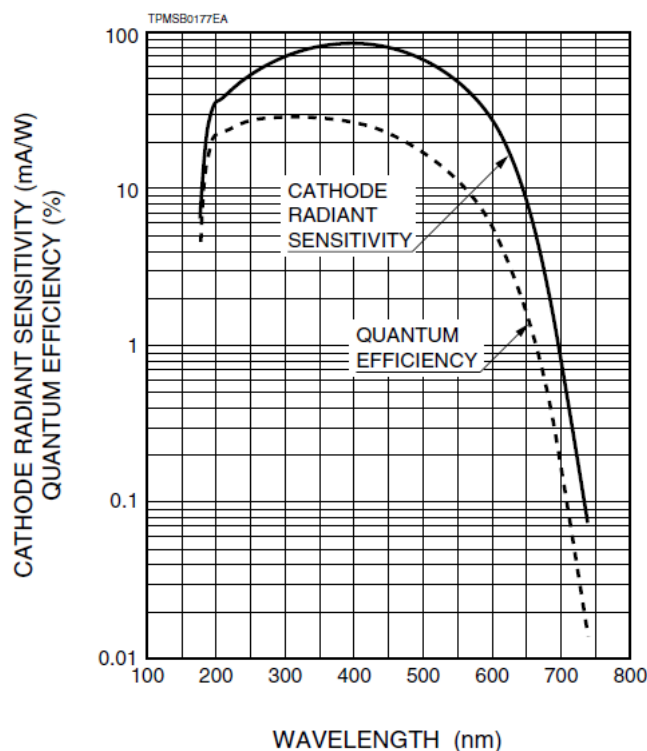
Jednou z prvních úprav, kterou je nutné při vyhodnocování dat provést je korekce temnostního proudu. Nejenže neodečtení temnostního proudu zvýší chybu

měření, ale naměřené hodnoty se mohou lišit až o desítky pulzů $\cdot s^{-1}$, stejně jako tomu je v případě této práce v porovnání s jinými. Naše práce počítá s temnostním proudem o velikosti 0,99 pulzů $\cdot s^{-1}$, měření (van Wijk a kol. 2005) s hodnotou 5,1 pulzů $\cdot s^{-1}$ a Kobayashiho práce (Kobayashi 2005) s 76 pulzy $\cdot s^{-1}$. Tato měření jsou příkladem prací, které pouze hodnoty temnostního proudu uvádí, ale neupřesňují jejich další použití při výpočtech. Některé práce (Cadenas a kol. 1980; Kim a kol. 2003; Kim a kol. 2007) hodnoty temnostního proudu neuvádí vůbec.

Pro měření spektrální charakteristiky jsme stejně jako Cadenas (Cadenas a kol. 1980) použili interferenční filtry. I v případě této korekce platí, že není možné přesněji zjistit, k jakým konkrétním úpravám dat došlo, a proto se tato práce snaží ukázat jednotlivé korekce samostatně (korekce kvantové účinnosti PMT, propustnosti filtrů), abychom mohli postupně zhodnotit jejich důležitost při vyhodnocování. Použití hranových filtrů při měřeních nám umožnilo získat představu o charakteru spektra buněčné kultury U266. Poté jsme se mohli zaměřit jen na konkrétní oblast spektra, ve které jsme díky těmto výsledkům očekávali maximum fotonové emise, to bylo zjištěno při 470 nm. Na základě této hodnoty můžeme jako zdroj indukované UPE považovat $^3(R=O)^*$ s maximy fotonové emise v modro – zelenou oblastí (350 – 550 nm), (Cifra a Pospíšil 2014; Pospíšil a kol. 2014). Excitované tripletní karbonyly byly jako zdroj UPE popsány u mikroorganismů (u *Saccharomyces cerevisce* s maximy fotonové emise 450 – 550 nm (Nerudová a kol. 2015)), u rostlin (maxima fotonové emise u rostlinných děloh se nacházela v rozmezí 450 – 540 nm, (Kobayashi a kol. 2005)), u živočichů (pro mozek a játra potkanů je charakteristické maximum fotonové emise v oblasti 410 – 440 nm, (Kobayashi a kol. 2005) a u lidského těla (400 – 500 nm), (van Wijk a van Wijk 2005)).

Kvantová účinnost je jednou z důležitých charakteristik PMT, která představuje procentuální poměr počtu emitovaných elektronů k počtu dopadajících světelných fotonů. Tato vlastnost PMT je dána materiálem fotokatody a informuje nás o možnostech použití v dané spektrální oblasti. Postupný rozvoj fotokatod nám dnes umožňuje používat detektory s nižším temnostním proudem, větším spektrálním rozsahem, tedy s vyšší přesností než tomu bylo dříve. Problematikou korekce kvantové účinnosti se zabývala i tato práce, která pro měření použila Hamamatsu PMT typu R7518P. Vyhodnocená data, u kterých byla provedena pouze korekce kvantové účinnosti PMT, zcela změnila svou spektrální charakteristiku a zároveň došlo

ke zvýšení indukované UPE. Tyto výsledky nám ukazují, že počet dopadajících světelných fotonů na fotokatodu je mnohonásobně vyšší než počet následně emitovaných elektronů na dynodách uvnitř fotokatody. Na obr. 21 je graf závislosti kvantové účinnosti PMT na vlnové délce u bialkalické fotokatody a pod tímto obrázkem je uvedena také tabulka (tabulka 3.) s přepočítanými hodnotami kvantové účinnosti. Hodnoty kvantové účinnosti PMT uvedené v této tabulce dosahují maxima v oblasti 400 – 450 nm (24,40 %). To znamená, že fotokatoda v této oblasti je schopna zachytit pouze 24,40 % dopadajících světelných fotonů z celkového počtu. Proto pokud se podíváme na hodnoty kvantové účinnosti PMT v oblasti 600 – 700 nm vidíme, že tyto hodnoty se blíží k 0 % a tedy, že není vhodné používat bialkalické fotokatody pro měření v této oblasti, kde mají téměř nulovou účinnost. Jak jsme již zmínili, existuje několik typů fotokatod, které jsou charakterizovány různou spektrální citlivostí. Naše měření bylo provedeno detektorem, který používá bialkalickou fotokatodu, ta je složena z antimonu, rubidia a cesia nebo antimonu, draslíku a cesia, se spektrální citlivostí v rozsahu 185 – 730 nm.



Obr. 21: Typické spektrální rozložení kvantové účinnosti bialkalické fotokatody. (Hamamatsu Photonics K. K., 2010)

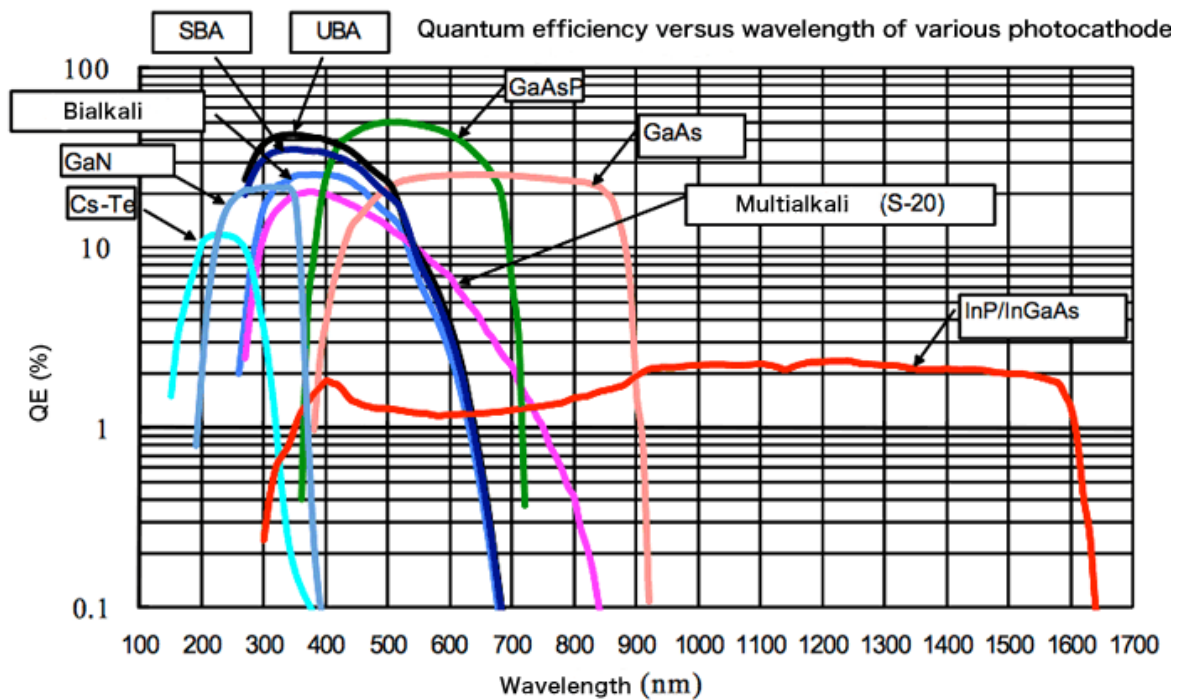
λ [nm]	400-450	450-500	500-550	550-600	600-650	650-700
η [%]	24,40	19,55	13,83	8,23	3,16	0,58

Tabulka 3: Vypočítané hodnoty kvantové účinnosti bialkalické fotokatody při použití hranových filtrů.

Téměř nulová kvantová účinnost PMT v rozmezí 600 – 700 nm, nám neumožňuje přesnější studium červené oblasti. Řešením může být použití PMT s fotokatodou s vyšší spektrální citlivostí v této oblasti, což znamená, že její kvantová účinnost zde bude nabývat vyšších hodnot než v případě bialkalické fotokatody. Jedna z prací Cadenase a jeho spolupracovníků (Cadenas a kol. 1980), nás přivádí k řešení tohoto problému. Měření, která prováděl tým Cadenase, se zaměřila na studium zhášečů (β – karoten, DABCO) dimolové emise $^1\text{O}_2$ (634 nm a 703 nm), což odpovídá námi řešené červené oblasti. Pro měření v této oblasti používali fotokatodu s požadovanými vlastnostmi, konkrétně EMI PMT s multialkalickou fotokatodou, známou také jako S – 20. Multialkalická fotokatoda se od bialkalické liší nejen složením (sodík, draslík, antimon a cesium), ale také spektrální citlivostí (od ultrafialové do blízké infračervené oblasti). Porovnání kvantové účinnosti fotokatod vyrobených z různých materiálů umožňuje graf na obr. 22. Vidíme, že multialkalická fotokatoda má větší kvantovou účinnost v červené oblasti než fotokatoda bialkalická a tedy je vhodnější pro měření v této oblasti spektra. Pokud se tedy rozhodneme měřit spektrální charakteristiku u vzorku, u něž můžeme očekávat dimolovou emisi $^1\text{O}_2$ jako zdroj UPE (634 a 703 nm), je pro tato měření vhodné použít multialkalickou fotokatodu.

Pokud budeme porovnávat výsledky, u kterých byly postupně provedeny jednotlivé korekce (pouze korekce kvantové účinnosti PMT nebo propustnosti filtrů), zjistíme, že v obou případech dochází k nárůstu indukované UPE při srovnání s daty bez korekcí. Významnější rozdíl (hodnoty indukované UPE bez korekcí u hranových filtrů se nacházely v rozmezí $4,69 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1} - 33,81 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$ a u dat s korekcí kvantové účinnosti PMT $25,53 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1} - 822,81 \text{ pulzů} \cdot \text{s}^{-1}$) mezi výsledky s korekcemi a bez nich jsme zaznamenali u korekce kvantové účinnosti PMT, avšak ani korekce propustnosti filtrů není vhodné zanedbávat. Autoři některých již zmíněných prací se snažili o korekci dat, ale ve většině případů do těchto úprav nezahrnuli všechny

jmenované korekce. Je nutné si uvědomit, že nejen temnostní proud, kvantová účinnost PMT, ale také propustnost filtrů významně ovlivňují výslednou podobu naměřených výsledků. Pokud tedy provedené úpravy nezahrnují všechny zmíněné korekce, získaná data jsou nepřesná.



Obr. 22: Graf závislosti kvantové účinnosti fotokatod z různých materiálů na vlnové délce. (www.hamamatsu.com)

7. ZÁVĚR

Diplomová práce se věnovala problematice spektrální charakteristiky indukované UPE u buněčné kultury U266. Prvním z hlavních cílů bylo získat spektrální charakteristiku této kultury, na jejímž základě by bylo možné vyhodnotit zdroj UPE. Naměřená data nám přinesla informace, z nichž vyplývá, že UPE je u této buněčné kultury způsobena $^3(\text{R}=\text{O})^*$, s maximy fotonové emise v oblasti spektra o vlnové délce 470 nm.

Další část této práce upřela svou pozornost na možné korekce spektrální charakteristiky indukované UPE. Bylo nutné si uvědomit, jak podstatnou roli při vyhodnocování výsledků hrají vlastnosti jednotlivých prvků použitých při měření. Práce se zaměřila na řešení problémů vzniklých použitím hranových a pásových filtrů a s nimi související propustností a dále pak na kvantovou účinnost PMT. Po zhodnocení těchto faktorů, které ovlivňují celkovou podobu výsledné spektrální charakteristiky UPE, můžeme říci, že při současném započítání obou vlastností pozorujeme kvantitativní rozdíly v porovnání s daty bez korekcí a proto je důležité tyto úpravy neopomíjet při podobných experimentech. V neposlední řadě výsledky této práce ukazují, jak důležitý je výběr vhodného PMT, tak aby jeho kvantová účinnost nabývala dostatečných hodnot v celém rozmezí měřeného spektra.

8. SEZNAM LITERATURY

Bajpai R. P., Biophoton emission in a squeezed state from a sample of *Parmelia tinctorum*, *Physics Letters*, 322, 131 – 136, 2004

Bertogna E., Bezerra J., Conforti E., Gallep C.M., Acute stress in seedlings detected by ultra – weak photon emission, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 188, 74 – 76, 2013

Bischof M., Biophotons – the light in our cells, *Journal of Optometric Phototherapy*, 2005

Bischof M., A tribute to Fritz – Albert Popp on the occasion of his 70th birthday, *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 267 – 272, 2008

Cadenas E., Arad I. D., Boveris A., Fisher A. B., Chance, B. Partial spectral-analysis of the hydroperoxide – induced chemi – luminescence of the perfused lung, *FEBS Letters* 111, 413 – 418, 1980

Cadenas E., Boveris A., Chance B., Spectral analysis of the low level chemiluminescence of H₂O₂ – supplemented ferricytochrome c, *FEBS Letters* 112, 285 – 289, 1980

Cadenas E., Boveris A., Chance B., Low – level chemiluminiscence of bovine heart submitochondrial particles, *Biochemical Journal*, 186, 659-667, 1980

Cadenas E., Boveris A., Chance B., Low – level chemiluminiscence of hydroperoxide – supplemented cytochrom c, *Biochemical Journal*, 187, 131 – 140, 1980

Cifra M., van Wijk E., van Wijk R., Endogenous electromagnetic field in biological systems: measurement of spontaneous photon emission in visible range from the human body, 2007

Cifra M., van Wijk E., Koch H., Bosman S., van Wijk R., Spontaneous Ultra – Weak Photon Emission from Human Hands Is Time Dependent, *Radioengineering*, 16, 2, 2007

Cifra M., van Wijk E., van Wijk R., Temperature Induced Changes of Spontaneous Photon Emission from Human Hands, *Progress In Electromagnetics Research Symposium*, Cambridge, USA, July 2 – 6, 2008

Cifra M., Pospíšil P., Ultra – weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 139, 2 – 10, 2014

Cohen S., Popp F. A., Biophoton emission of the human body, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 40, 187 – 189, 1997

Colli L., Facchini U., Light emission by germinating plants, *Nuovo Cimento*, 12, 150 – 155, 1954

Creath K., Schwartz E. G., What biophoton images of plants can tell us about biofields and healing, *Journal of Scientific Exploration*, 4, 531 – 550, 2005

Červinková K., Nerudová M., Hašek J., Cifra M., Chemical modulation of the ultra-weak photon emission from *Saccharomyces cerevisiae* and differentiated HL – 60 cells, *Photonics, Devices and Systems Vi*, 9450, 2015

da Nóbrega C. A. M., Biophoton – the language of the cells. What can living systems tell us about interaction?, *Technoetic Arts: A journal of Speculative Research*, 4, 3, 2007

Gallep C. M., Conforti E., Braghini M. T., Maluf M. P., Yan Y., Popp F. A., Ultra-weak delayed luminescence in coffee seeds (*Coffea arabica* and *C. canephora*) and their germination potential: some indications for a photonic approach in seed viability, *Proceeding of 11th Brazilian Symposium of Microwave and Optoelectronics*, 2004

Hagens R., Khabiri F., Schreiner V., Wenck H., Wittern K. P., Duchstein H. J., Mei W., Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission measurement, *Skin Research and Technology*, 14, 112 – 120, 2008

Hideg. E., Kobayashi, M., & Inaba, H., Ultraweak photoemission from dark – adapter leaves and isolated chloroplasts, *Biomedical Division*, 275, 121 – 124, 1990

Hideg, E., Kobayashi, M., & Inaba, H., Spontaneous ultraweak light emission from respiring spinach leaf mitochondria, *Biochemica and Biophysica Acta*, 1089, 27 – 31, 1991

Hideg, E., On the spontaneous ultraweak light emission of plants, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 18, 239 – 244, 1993

Hossu M., Ma L., Chen W., Nonlinear enhancement of spontaneous biophoton emission of sweet potato by silver nanoparticles, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010

Choi C., Woo W. M., Lee M. B., Yang J. S., Soh K. – S., Yang J. S, Yoon G., Kim M., Zaslowsky C., Chang J. J., Biophoton emission from the hands, *Journal of the Korean Physical Society*, 41, 2, 275 – 278, 2002

Khabiri F., Hagens R., Smuda C., Soltan A., Schreiner V., Wenck H., Wittern K. – P., Duchstein H. – J., Mei W., Non invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission (UPE) – measurement. I: Mechanisms of UPE of biological materials. *Skin research and technology*, 14, 103 – 111, 2007.

Kim L. J., Choi Ch., Lim J., You H., Sim S. B., Yom Y. K., Kim E. H., Soh K. S., Measurements of spontaneous ultraweak photon emission and delayed luminescence from human cancer tissues, *The journal of alternative and complementary medicine*, 11, 879 – 884, 2005

Kim J., Lim J., Lee B., Kim Y., Lee S. K., Cheun B. S., Soh K., Spontaneous Ultra-Weak Photon Emission and Delayed Luminescence during Carbon tetrachloride-induced liver injury and repair in mouse, *Journal of Health Science*, 51, 155 – 160, 2005

Kim J., Kim Y., Lee Y., Kobayashi M., Tsutsumi Y., Kondo R., Lee S. K., Soh K., Spontaneous ultraweak photon emission during the growth of the cell population of cultured HeLa cell line, *Journal of Health and Science*, 53, 481 – 485, 2007

Kobayashi M., Takeda M., Sato T., Yamazaki Y., Kaneko K., Ito K. – I., Kato H., Inaba H., In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress, *Neuroscience Research* 34, 103 – 113, 1999

Kobayashi M., Takeda M., Ito K. – I., Kato H., Inaba H., Two – dimensional photon counting imaging and spatiotemporal characterization of ultraweak photon emission from a rat's brain in vivo, *Journal of neuroscience method* 93, 163 – 168, 1999

Kobayashi M., Two – dimensional imaging and spatiotemporal analysis of biophoton, *Biophotonics*, 155 – 171, 2005

Kobayashi M., Sasaki K., Enomoto M., Ehara Y., Highly sensitive determinativ of transient generation of biophoton during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea, *Journal of Experimental Botany*, 58, 3, 465 – 472, 2007

Laager F., Park S. H., Yang J. M., Song W., Soh K. S., Effects of exercises on biophoton emission of the wrist, *European Journal of Applied Physiology*, 102, 463 – 469, 2008

Makino T., Kato K., Iyozumi H., Aoshima Y., Biophoton emission and defense systems in plants, *Biophotonics*, 205 – 218, 2005

Mathew B. G., Roy D., Weak luminiscence from the frozen – thawed root tips of *Cicer Arietinum*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 12, 141 – 150, 1992

Musumeci F., Guiseppe P., Scordino A., Tudisco S., Lo Presti C., Applegate L. A., Niggli H. J., Discrimination between normal and cancer cells by using spectral analysis of delayed luminescence. *Applied Physics*, 86, 153 – 902, 2005

Matsubishi M., Pankrushina A. N., Endoh K., Watanabe H., Mano Y., Hyodo M., Fujita T., Kunugita K., Kaneko T., Otani S., Studies on carbon material requirements for bacterial proliferation and spore germination under stress conditions: a new mechanism involving transmission of physical signals. *Journal of Bacteriology*, 177, 688 – 693, 1995

Nerudová M., Červinková K., Hašek J., Cifra M., Optical spectral analysis of ultra-weak photon emission from tissue culture and yeast cells, *Photonics, Devices and Systems Vi*, 9450, 2015

Ozawa N. T., Understanding the process of aging, Marcel Dekker, 265 – 292, 1999

Pospíšil P., Prasad A., Rác M., Role of reactive oxygen species in ultra – weak photon emission in biological systems, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 139, 11 – 23, 2014

Prasad A., Pospíšil P., Two – dimensional imaging of spontaneous ultra – weak photon emission from the human skin: role of reactive oxygen species, *Journal of Biophotonics* 4, 840-849, 2011

Prasad A., Pospíšil P., Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: *in vivo* charge coupled device imaging, *Journal of Biomedical Optics*, 17, 085004, 2012

Prasad A., Pospíšil P., The photon source within the cell, *Fields of the Cell*, 6, 113 – 129, 2015

Rastogi A., Pospíšil P., Ultra-weak photon emission as a non-invasive tool for monitoring of oxidative processes in the epidermal cells of human skin: comparative study on the dorsal and the palm side of the hand, *Skin Research and Technology*, 16, 365-370, 2010

Rastogi A., Pospíšil P., Spontaneous ultraweak photon emission imaging of oxidative metabolit processes in human skin: effect of molecular oxygen and antioxidant defense systém, *Journal of Biomedical Optics* 16, 096005, 2011

Roth J. A., Kaeberle M.L., Chemiluminescence by *Listeria monocytogenes*, *Journal of Bacteriology*, 144, 752 – 757, 1980

Siqueira N. A., Santos S.R., Pereira C.A., Batista D.C., Gallep C.M., Biophotons and ecotoxicology: applications, Congresso, 2007

Slawinski J., Ezzahir A., Godlewski M., Kwiecinska T., Rajfur Z., Sitko D., Wierzuchowska D., Stress – induces photon emission from perturbed organisms, *Experientia*, 48, 1992

Trushin M. V., Distant non – chemical communication in various biological systems, *Rivista di Biologia*, 97, 409 – 442, 2003

Van Wijk E., van Wijk R., Multi-site recording and spectral analysis of spontaneous photon emission from human body, *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 12, 96 – 106, 2005

Van Wijk, R., Kobayashi M., van WIJK, E., Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a move-able photomultiplier and CCD imaging, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 83(1), 69 – 76, 2006

Van Wijk E., van Wijk R., Cifra M., Spontaneous ultra-weak photon emission from human hands varies diurnally, *Biophotonics*, 6633, 2007

Vogel R., Süßmuth R., Weak light emission patterns from lactic acid bacteria, *Luminiscence* 14, 99-105, 1999

Yan Y., Popp F. – A., Rothe G. M., Correlation between germination capacity and biophoton emission of barley seeds (*Hordeum vulgare L.*), *Seed Science and Technology*, 31, 249 – 258, 2003