

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Detekce monomolové a dimolové emise singletního kyslíku z chemického  
systému**

Vypracovala: Bc. Jesika Ucháčová

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při psaní diplomové práce a při měření na PMT a EPR, poskytnutí literatury a za trpělivý a ochotný přístup. Dále děkuji Doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D., za odborné rady a ochotný přístup.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Mgr.  
Marka Ráce, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne:  
Podpis:

## Souhrn

Fenomén známý jako ultra slabá emise fotonů (UPE) pochází ze všech živých organismů. Jedná se o slabou chemiluminiscenci, která je detekována od ultrafialové po blízkou infračervenou (IČ) oblast spektra. V této diplomové práci jsme se zaměřili na vyzařování excitační energie singletního kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ), která je detekována v červené a blízké IČ oblasti spektra.

Singletní kyslík vzniká buď prostřednictvím Russellova mechanismu, tedy rozpadem tetroxidu (ROOOOR), nebo přenosem excitační energie z excitované molekuly na molekulu kyslíku v základním stavu. Excitační energie  $^1\text{O}_2$  je vyzařována ve formě monomolové nebo dimolové emise. V blízké IČ oblasti spektra při vlnové délce 1270 nm je detekována monomolová emise. Dimolová emise pochází ze dvou molekul  $^1\text{O}_2$  a je detekována v červené oblasti spektra při vlnových délkách 634 nm a 703 nm.

V této diplomové práci jsme se zabývali tvorbou organických hydroperoxidů (ROOH) z chemického systému – hovězí sérum albumin. K albuminu byly přidány exogenní reaktivní formy kyslíku (ROS), které nastartovaly řetězovou reakci, která vedla až ke tvorbě  $^1\text{O}_2$ . Následně jsme detekovali monomolovou a dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$ . Pro detekci jsme použili dva fotonásobiče a elektronovou paramagnetickou rezonanci (EPR).

## Summary

The phenomenon known as ultra-weak photon emission (UPE) is common for all living organisms. It is a weak chemiluminescence that is detected in the range from the ultraviolet to the near infrared (NIR) region of the spectrum. In this diploma thesis we focused on the emission of excitation energy of singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), which is detected in the red and near NIR regions of the spectrum.

Singlet oxygen is formed either through the Russell Mechanism, i.e. the decay of tetroxide (ROOOOR), or by the transfer of excitation energy from the excited molecule to the oxygen ground state molecule. The excitation energy of  $^1\text{O}_2$  is radiated in the form of monomolar or dimolar emission. Monomolar emission is detected in the near NIR region of the spectrum at the wavelength of 1270 nm. Dimolar emission comes from two  $^1\text{O}_2$  molecules and it is detected in the red region of the spectrum at 634 nm and 703 nm.

In this diploma thesis we dealt with the formation of organic hydroperoxides (ROOH) from the chemical system – bovine serum albumin. Exogenous reactive oxygen species (ROS) were added to the albumin, which started a chain reaction that led to the formation of  $^1\text{O}_2$ . Subsequently, we detected the monomolar and dimolar emission from  $^1\text{O}_2$ . We used two photomultipliers and electron paramagnetic resonance (EPR) to detect the emission.

## Seznam zkratek

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
$^3(\text{R}=\text{O})^*$	tripletní excitovaný karbonyl
5 – HPMU	5 – (hydroperoxymethyl)uracil
BSA	bovine serum albumin
C	cystein
Ch*	excitovaný chromofor
CCD kamera	charge coupled device kamera
CL	kardiolipidy
cyt c	cytochrom c
D <sub>2</sub> O	deuterovaná voda
DABCO	1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
FeSO <sub>4</sub>	síran železnatý
H	histidin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HO·	hydroxylový radikál
HOCl	kyselina chlorná
IČ	infračervený
LAOOH	hydroperoxid kyseliny linolové
M	metionin
MoO <sub>3</sub>	oxid molybdenový
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	molybdenanový ion

Na <sub>2</sub> MoO <sub>8</sub>	molybdenan sodný
NADPH	nikotinadenindinukleotidfosfát
NaOCl	chloman sodný
NDPO <sub>2</sub>	3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate
NO•	oxid nitritu
O <sub>2</sub>	molekulární kyslík
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	superoxidový aniontový radikál
ONOO-	peroxynitrit
PMT	photomultiplier (fotonásobič)
R•	alkylový radikál
RO•	alkoxylový radikál
ROO•	peroxylový radikál
ROOH	hydroperoxid
ROOOOR	tetroxid
ROOR	dioxetan
ROS	reaktivní formy kyslíku
t-BOOH	t-butyl hydroperoxid
TEMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidin
UPE	ultra slabá emise fotonů
VIS	viditelný
W	tryptofan
Y	tyrosin

## Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
2.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU .....	12
2.2 ULTRA SLABÁ EMISE FOTONŮ .....	14
2.3 SINGLETNÍ KYSLÍK .....	16
2.4 MONOLOVÁ EMISE ZE $^1\text{O}_2$ .....	21
2.5 DIMOLOVÁ EMISE ZE $^1\text{O}_2$ .....	23
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>26</b>
4.1 ALBUMIN .....	26
4.2 MĚŘENÍ S PMT .....	26
4.2.1 PMT pro VIS .....	27
4.2.2 PMT pro IČ .....	27
4.3 MĚŘENÍ S EPR SPEKTROSKOPÍÍ .....	27
4.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	28
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>29</b>
5.1 MĚŘENÍ NA EPR .....	29
5.1.1 Měření TEMPONE EPR signálu indukovaného $^1\text{O}_2$ nebo $\text{HO}^\bullet$ .....	29
5.2 VLIV PH NA UPE .....	31
5.2.1 Měření na PMT pro VIS .....	31
5.2.2 Měření na PMT pro IČ .....	33
5.3 MĚŘENÍ NA PMT PRO VIS OBLAST SPEKTRA .....	35
5.3.1 Vliv koncentrace reaktantů na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$ .....	35
5.3.2 Vliv katalázy a NaOCl na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$ .....	37
5.3.3 Měření UPE indukovanou $\text{HO}^\bullet$ .....	38
5.3.4 Vliv katalázy a NaOCl na UPE indukovanou $\text{HO}^\bullet$ .....	40
5.4 MĚŘENÍ NA PMT PRO IČ OBLAST SPEKTRA .....	42
5.4.1 Vliv koncentrace reaktantů, katalázy a NaOCl na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$ .....	42
5.4.2 Měření UPE indukovanou $\text{HO}^\bullet$ .....	44



5.5 SHRNU TÍ MĚŘENÍ .....	45
5.5.1 Porovnání UPE ve VIS a IČ oblasti spektra .....	45
5.5.3 Porovnání všech měření.....	47
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>48</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>52</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>54</b>

# 1. Úvod

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou molekuly, které obsahují jeden nebo dva atomy kyslíku. Dělí se na dvě formy a to na radikály a neradikály. Radikály jsou tvořeny jedním nebo dvěma nepárovými elektrony na atomu kyslíku. Zatímco neradikály mají elektrony v páru. Reaktivní formy kyslíku se tvoří dvěma cestami. Jednou je přenos excitační energie a druhou je jednoelektronová, případně dvouelektronová redukce. Reaktivní formy kyslíku jsou vedlejším produktem při metabolických a oxidativních procesech. Mezi metabolické procesy patří např. buněčné dýchání a fotosyntéza, mezi oxidativní procesy se řadí stresové reakce, které jsou podmíněné abiotickými nebo biotickými stresovými faktory.

Reaktivní formy kyslíku mohou oxidovat biomolekuly, pokud je jich mnoho, v menší míře jsou kontrolovány antioxidanty. Právě oxidace biomolekul může vést k elektronové excitaci molekul, která vede k vyzařování světla. Tento jev se nazývá ultra slabá emise fotonů (UPE). Tento fenomén byl poprvé popsán v roce 1924 ruským vědcem Alexandrem Gurwitschem (Rác, 2010). Ovšem detekovat jej bylo možné až s rozvojem citlivých fotonásobičů v padesátých letech minulého století.

Jak již bylo výše uvedeno, ROS vznikají i přenosem excitační energie. Takto právě může vznikat singletní kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), jímž se budeme v této diplomové práci zabývat. Ultra slabá emise fotonů ze  $^1\text{O}_2$  je vyzařována v červené a infračervené (IČ) oblasti spektra. Jako monomolová emise se označuje emise v blízké IČ oblasti spektra. V červené oblasti spektra se emise nazývá dimolová.

Singletní kyslík reaguje s různými biologickými molekulami jako proteiny, lipidy, steroly, RNA a DNA. Reakce proteinů s radikály závisí na prostředí, ve kterém se vyskytují. Nejsilnější vliv na to má koncentrace proteinů, povaha, rozsah a umístění radikálu. Množství oxidativních produktů se zvyšuje s koncentrací proteinů, až do nasycení. Jinak řečeno, radikály reagují s proteiny ve větší míře než s jinými komponenty (Dean a kol. 1997). Oxidace proteinů vede k tvorbě modifikovaných forem, které způsobují změny v buněčné signalizaci (Klotz a kol., 2003).

V této diplomové práci byla studována monomolová a dimolová emise ze  $^1\text{O}_2$  tvořeném v chemickém systému. K albuminu z hovězího séra byly přidávány exogenní ROS, které způsobily jeho oxidaci. Následné řetězové reakce vedly k tvorbě  $^1\text{O}_2$  přes

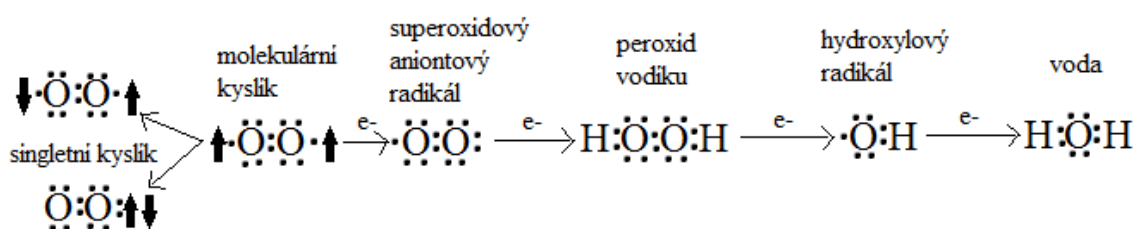
Russellův mechanismus. Cílem této diplomové práce bylo studovat korelaci mezi monomolovou a dimolovou emisí, a na jejím základě odhadnout, jestli je  $^1\text{O}_2$  jediná molekula zodpovědná za UPE v červené oblasti, jak se běžně uvádí v literatuře.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly, které jsou tvořeny jedním nebo dvěma atomy kyslíku a jsou reaktivnější než samotná molekula molekulárního kyslíku ( $O_2$ ). Formě, která má elektrony na atomu kyslíku v páru, se říká neradikály, mezi ně patří peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a  $^1O_2$ . Oproti tomu radikály mají jeden nebo dva nepárové elektrony na atomu kyslíku. Řadí se k nim superoxidový aniontový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) a hydroxylový radikál ( $HO^{\cdot}$ ).

Reaktivní formy kyslíku mohou vznikat dvěma různými způsoby. První z nich je přenos excitační energie, kde světlo vyvolá excitaci chromoforů a následný přenos energie na  $O_2$ . Konkrétně  $^1O_2$ , který je tvořen přenosem excitační energie z tripletného excitovaného karbonylu ( $^3(R=O)^*$ ). Další možnost je pomocí chemických reakcí, kdy má excitovaná molekula přebytečnou energii a přenesse ji na molekulu kyslíku v základním stavu. Jednoelektronovou redukcí  $O_2$  vzniká  $O_2^{\cdot-}$ , který je dále redukován na  $H_2O_2$ . Hydroxylový radikál se tvoří jednoelektronovou redukcí  $H_2O_2$ , kde kov katalyzuje tuto reakci. Tato reakce se nazývá Fentonova. Peroxid vodíku také vzniká dvouelektronovou redukcí  $O_2$  (Pospíšil a kol., 2014).

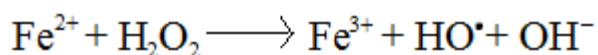


Obr. 1: Tvorba ROS

Jedním z nejrozšířenějších ROS v biologickém systému je  $O_2^{\cdot-}$ . Jeho zdrojem jsou elektronové transportní řetězce mitochondrií a chloroplastů. Na rozdíl od jiných ROS jako  $^1O_2$  a  $HO^{\cdot}$ , je  $O_2^{\cdot-}$  relativně nereaktivní (Dean a kol., 1997). Proces redukce  $O_2$  na  $O_2^{\cdot-}$  nastává během buněčného dýchání ve vnitřní mitochondriální membráně a také vyvoláním NADPH oxidázou při fagocytóze. Přeměna  $O_2^{\cdot-}$  na  $H_2O_2$  je spontánní proces, ale  $H_2O_2$  může vznikat i pomocí superoxid dismutázy v mitochondriích, která přeměňuje  $O_2^{\cdot-}$  a mění

ho na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dvouelektronová redukce O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je zapříčiněna oxidací specifických substrátů v mitochondriích a peroxisomech (Pospíšil a kol., 2014).

Fentonovy reakce se zúčastní přechodné kovy v biologickém systému, které jsou rovněž biologicky důležité metaloproteiny. Přechodné kovy se zúčastní oxidativních reakcí a reagují s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za vzniku HO<sup>•</sup>. Povaha produktů Fentonovy reakce závisí na chemickém prostředí jako je pH, které určuje poměr mezi Fe (II) a Fe (III), dále závisí na ligandech komplexu Fe (II) nebo přítomnosti či nepřítomnosti O<sub>2</sub>. Při přebytku Fe oproti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v roztoku vede k nižší Fentonově aktivitě. V tomto případě je třeba změnit pH a/nebo si pomoci chelatací Fe např. s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) (Freinbichler a kol., 2011).

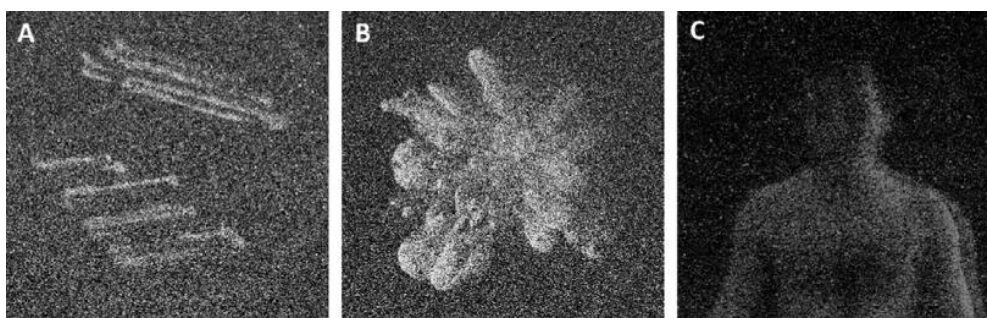


*Obr. 2: Fentonova reakce*

Reaktivní formy kyslíku mají pozitivní vlastnosti při nízkých koncentracích, protože slouží jako signální molekula (Burgos a kol., 2017) a jsou součástí imunitního systému u lidí a fyziologických procesů u rostlin. Biologický systém je za normální podmínky v rovnováze. Nerovnováha může nastat vysokou koncentrací ROS, což má za následek snížení schopnosti biologického systému detoxikovat reaktivní meziprodukty, případně opravit výsledné poškození (Freinbichler a kol., 2011). Reaktivní formy kyslíku způsobují při vysokých koncentracích oxidativní stres - oxidativní poškození buněk, který vede k poškození nukleových kyselin, proteinů i lipidů (Burgos a kol., 2017). Oxidativní stres vyvolaný ROS způsobuje např. poškození kůže ve formě předčasného stárnutí nebo rakoviny kůže (Prasad a Pospíšil, 2012), rakovinu, Alzheimerovu i kardiovaskulární onemocnění (Burgos a kol., 2017).

## 2.2 Ultra slabá emise fotonů

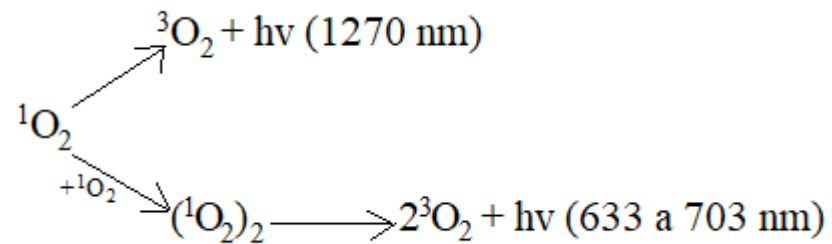
Ultra slabá emise fotonů je slabá chemiluminiscence, která se vyskytuje v biologických systémech. Vytváří se v živých organismech při oxidativních metabolických a stresových procesech. Ultra slabá emise fotonů je také popisována jako netepelné záření, které má elektromagnetické spektrum od ultrafialového po blízkou IČ oblast. Blíže se jedná o přechod z excitovaného do základního stavu elektronu (Burgos a kol., 2017). Detekce UPE je možná za použití nízko šumové a vysoce citlivé techniky. Při jednorozměrné detekci se používá nízko šumový fotonásobič (PMT), který s hodí spíše na kinetické a spektrální studie UPE. Dvourozměrná detekce je vhodná pro studium prostorových a časových vlastností UPE za použití vysoce citlivé charged coupled device (CCD) kamery. Oba typy detekce jsou vhodné pro mikroorganismy, rostliny, zvířata a lidi (Pospíšil a kol., 2014). Jedná se tedy o rychlou a hlavně neinvazivní detekci pro získání biologických informací. Proto se používá v mnoha oblastech jako např. pozorování rakoviny a dalších zdravotních problémů nebo detekce kvality potravin. Ovšem UPE souvisí s mnoha faktory jako teplota, exogenní toxiny, oxidativní stres atd. (Tian a kol., 2014).



Obr. 3: Dvoudimenzionální snímání UPE pomocí CCD kamery. Na obrázku A) mikroorganismy (*Saccharomyces sp.*), B) rostliny (*Arabidopsis sp.*) a C) lidské tělo (upraveno podle Pospíšil a kol., 2014).

Ultra slabá emise fotonů se dělí na spontánní a indukovanou. Spontánní UPE je zapříčiněna oxidativními metabolickými procesy jako např. buněčné dýchání nebo fotosyntéza. Indukovaná UPE vzniká při oxidativních stresových procesech. Stresové faktory se dělí na abiotické a biotické. Abiotické stresové faktory jsou buď chemické (přidání  $H_2O_2$ , cigaretový kouř), nebo fyzikální (mechanické poškození, UV záření). Mezi biotické stresové faktory patří viry, bakterie a houby (Pospíšil a kol., 2014).

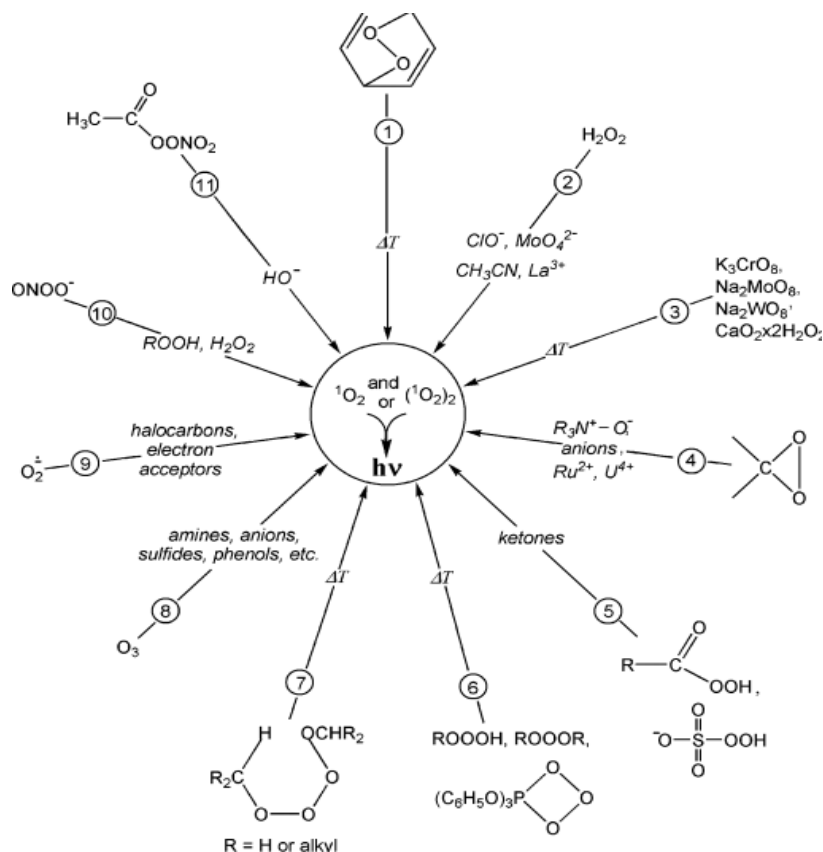
Ultra slabá emise fotonů pochází z různých molekul a její spektrální charakteristika nese informaci o jejím původu (Burgos a kol., 2017). Pro UPE z  ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$  je charakteristická blízká UV oblast a modro-zelená oblast spektra v rozmezí 350-550 nm. Ultra slabá emise fotonů pocházející z excitovaných chromoforů ( $\text{Ch}^*$ ) je detekovatelná v zeleno-červené oblasti při vlnových délkách 550-750 nm. Ultra slabá emise fotonů ze  ${}^1\text{O}_2$  je detekována v červené a IČ oblasti spektra při vlnových délkách 634 nm, 703 nm a 1270 nm (Pospíšil a kol., 2014).



Obr. 4: Tvorba dimolové a monomolové emise ze  ${}^1\text{O}_2$

## 2.3 Singletní kyslík

Singletní kyslík se tvoří dvěma různými mechanismy. Jedním z nich je přenosem excitační energie, buď z  $\text{Ch}^*$  nebo  ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$  v našem případě přenos energie z  ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$  na  $\text{O}_2$ . Další možnost vzniku je přímo chemickou reakcí.



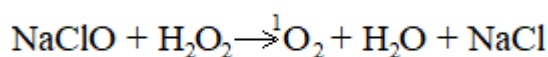
Obr. 5: Chemiluminiscenční systémy, které vytváří  ${}^1\text{O}_2$  (převzato z Adam a kol., 2005)

Chemiluminiscenční systémy, které vytváří  ${}^1\text{O}_2$  jsou ukázány na (Obr. 9). Pod číslem 1 je zaznačen tepelný rozklad endoperoxidů, kdy je excitovaný stav tvořen endotermickým procesem, tudíž potřebuje tepelnou aktivační energii, aby reakce nastala. Číslo 2 je již dobře známá reakce s  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Adam a kol., 2005), kdy např. vzniká  ${}^1\text{O}_2$  během fagocytózy a je zapříčiněn reakcí  $\text{H}_2\text{O}_2$  s  $\text{HOCl}$ , která je produkovaná myeloperoxidázou za účasti  $\text{H}_2\text{O}_2$  a chloridových iontů (Miyamoto a kol., 2014). Při termolýze je tvořen  ${}^1\text{O}_2$  v případě kovových peroxy komplexů (3). Dalším zdrojem je rozklad dioxiranů (4) a peroxylových kyselin (5). Přičemž dioxirany jsou selektivní oxidanty známé pro svou schopnost oxidativních transformací pro syntetické účely, které vedou i k uvolňování  ${}^1\text{O}_2$ . Zatímco u peroxylových kyselin, konkrétně kyselina monoperoxysulfurová se rozkládá na kyselinu sírovou a  $\text{O}_2$ , který je později vytvářen na  ${}^1\text{O}_2$ . Další je tepelný rozklad trioxidů a fosfitových ozonidů (6), s kterými se musí zacházet při nízkých teplotách. Pod (7) je  ${}^1\text{O}_2$

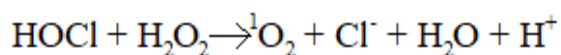


tvořen z tetroxidu. S různými organickými i anorganickými látkami reaguje ozon (8) nebo  $O_2^{\cdot-}$  (9) za tvorby  $^1O_2$ . V následujícím případě (10) reaguje peroxyinitrit s  $H_2O_2$  a hydroperoxy (ROOH). Poslední reakce (11) jsou bázi indukované rozklady peroxyacetylového nitritu (Adam a kol., 2005). Doba života  $^1O_2$  je závislá na druhu rozpouštědla, např. ve vodě to jsou jen 3,1  $\mu s$  při detekci v IČ oblasti spektra (Adam a kol., 2005).

Jak už bylo zmíněno, k tvorbě ROS a tedy i  $^1O_2$  je potřeba stresových faktorů. Nejčastější stresový faktor je  $H_2O_2$ . Při reakci  $H_2O_2$  s chlornanem sodným (NaClO) (Harada a kol., 2009) nebo kyselinou chlornou (HOCl) (Miyamoto a kol., 2006) vzniká  $^1O_2$  a další produkty.

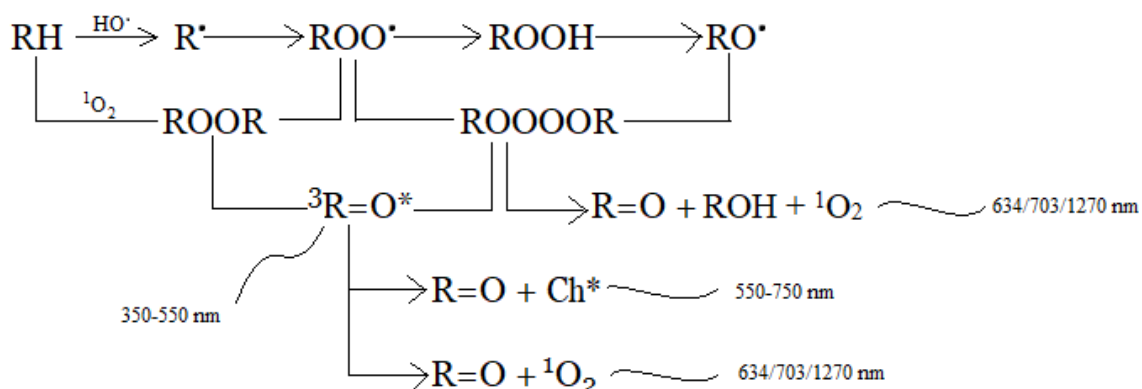


*Obr. 6: Reakce NaClO s  $H_2O_2$  za vzniku  $^1O_2$ ,  $H_2O$  a NaCl*



*Obr. 7: Reakcí HOCl s  $H_2O_2$  vzniká  $^1O_2$ ,  $Cl^-$ ,  $H_2O$  a  $H^+$*

Kyselina chlorná je vysoce reaktivní, napadá a modifikuje různé biomolekuly. Cílem HOCl jsou thiolové skupiny aminokyselin, volné aminokyseliny, peptidy a lipidy, u kterých vyvolává lipidovou peroxidaci, kdy reakce lipidových ROOH s HOCl tvoří volné radikály (Miyamoto a kol., 2006). Kyselina chlorná může reagovat i s  $O_2^{\cdot-}$ , což vede k tvorbě  $HO^{\cdot}$  (Freinbichler a kol., 2011).

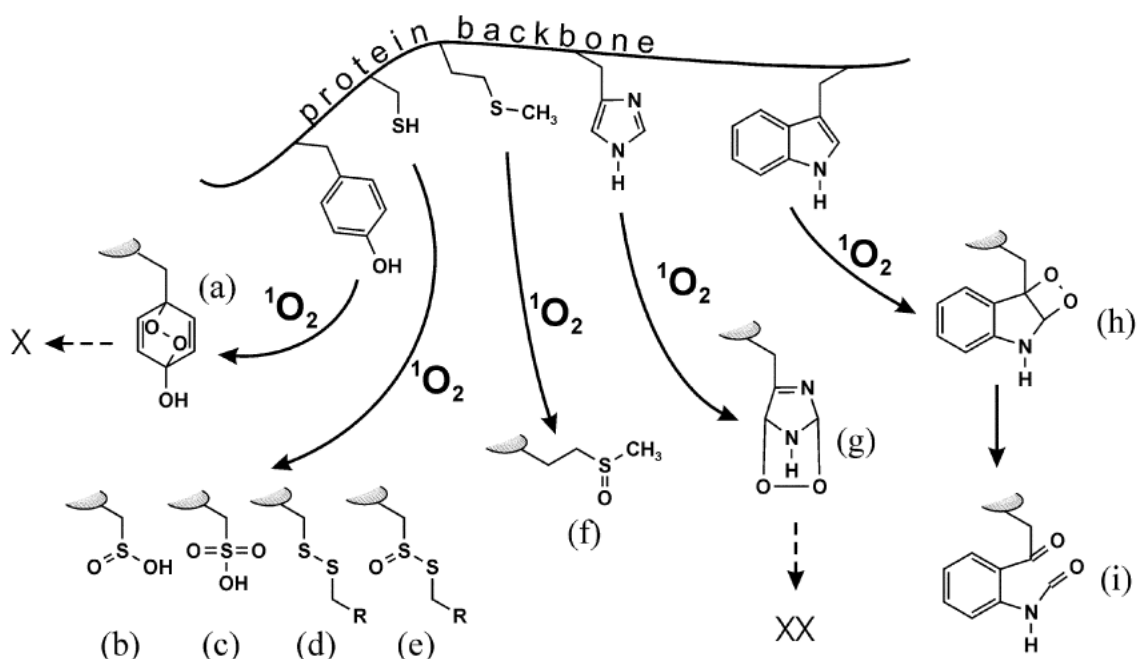


Obr. 8: Reaktivní formy kyslíku ve větší koncentraci oxidují biomolekuly, v menší míře jsou kontrolovány antioxidanty. Oxidace biomolekul může být řetězová reakce, kterou může v podstatě spustit jakýkoli radikál. Odtržením atomu vodíku z biomolekuly za pomoci  $\text{HO}^\bullet$ , vzniká alkylový radikál ( $\text{R}^\bullet$ ). Interakcí  $\text{R}^\bullet$  s  $\text{O}_2$  může vznikat peroxylový radikál ( $\text{ROO}^\bullet$ ), který reaguje s biomolekulou. Touto reakcí se tvoří  $\text{R}^\bullet$  a  $\text{ROOH}$ . Jednoelektronová redukce  $\text{ROOH}$  vede k tvorbě alkoxylového radikálu ( $\text{RO}^\bullet$ ). Rekombinací dvou  $\text{ROO}^\bullet$  vzniká tetroxid ( $\text{ROOOOR}$ ) a cyklizací  $\text{ROO}^\bullet$  vzniká dioxetan ( $\text{ROOR}$ ). Tripletní excitovaný karbonyl vzniká rozkladem  $\text{ROOR}$  a  $\text{ROOOOR}$ . Přenos excitační energie z ( ${}^3\text{R}=\text{O}^*$ ) na  $\text{O}_2$  způsobuje tvorbu  ${}^1\text{O}_2$ . Singletní kyslík se také tvoří rozpadem  $\text{ROOOOR}$  (Pospíšil a kol., 2014). Tomuto mechanismu se říká Russellův mechanismus.

Singletní kyslík reaguje se širokou škálou biologických molekul, jako jsou proteiny, lipidy, steroly, RNA a DNA (Davies, 2003). Interakce DNA s  ${}^1\text{O}_2$  je rozpoznána vhodnými proteiny, a to buď pro oprav DNA opravami, nebo pro regulaci poškození DNA. Oxidace lipidů  ${}^1\text{O}_2$  může vést k tvorbě produktů lipidové peroxidace, jako např. malondialdehyd nebo k rozkladu, např. cereamidy (Klotz a kol., 2003). Lipidové radikály mohou kromě samotné peroxidace lipidů také oxidovat proteiny. Singletním kyslíkem zprostředkovaná proteinová oxidace má za následek oxidaci postranních řetězců aminokyselin, dimerizaci, agregaci, rozvinutí nebo konformační změny proteinů. Ke změnám v hlavním i postranním řetězci v proteinech a peptidech dochází při jejich reakci s radikály za přítomnosti  $\text{O}_2$  (Wright a kol., 2002).

Alifatické boční řetězce aminokyselin se můžou oxidovat na  $\text{ROOH}$ , alkoholy a karbonylové sloučeniny. Hydroperoxydy se považují za nestabilní meziprodukty řetězových reakcí. Běžně dochází k jejich samovolnému rozpadu zpět na radikály. Jejich samovolný rozpad je dále urychlen v přítomnosti světla, tepla, kovových iontů nebo

redukčních činidel. Naopak alkoholy se řadí ke stabilním sloučeninám, které vznikají dvouelektronovou redukcí ROOH nebo přes ROO<sup>•</sup> a RO<sup>•</sup> (Davies a kol., 1999). Nejvíce citlivé aminokyseliny na oxidaci <sup>1</sup>O<sub>2</sub> jsou C, H, M, W a Y (Klotz a kol., 2003).



Obr. 9: Reakce aminokyselinových zbytků se <sup>1</sup>O<sub>2</sub> tvoří různé produkty jako a) 1-4 – endoperoxid, b) kyselina sulfinová, c) kyselina sulfonová, d) disulfid, e) disulfid S-oxid, f) methionin sulfoxid, g) endoperoxid, h) produkt reakce W zbytků, i) N-formylkynurenin (převzato z Klotz a kol., 2003).

Při štěpení peptidových vazeb, které obsahují Y, dochází ke zvýšení počtu volných aminových skupin a následně k jejich ztrátám (Criado a kol., 1998). To je důsledkem rozpadu peroxidů na volné radikály, které vytrhnou atom vodíku z  $\alpha$ -místa uhlíku a vznikají tzv.  $\alpha$ -uhlíkové místa (Davies, 2003). Interakcí <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se zbytkem Y vzniká 1,4 – endoperoxid, (a), který vede ke tvorbě různých peroxidů (Klotz a kol., 2003).

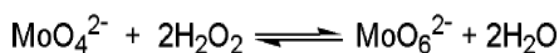
Aminokyseliny obsahující síru jsou C a M. Oxidací C vznikají disulfidy a oxykyseliny (Davies a kol., 1999). Oxidace C zbytků vede k inaktivaci enzymů, mimo jiné i tyrosin fosfatázy. Hlavní thiol obsažený v eukaryotických buňkách je glutathion, který je oxidován <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, což vede k tvorbě kyseliny sulfinové (b), kyseliny sulfonové (c), disulfidu (d) a disulfidu S-oxid (e) (Klotz a kol., 2003). Methionin sulfoxid (f) vzniká oxidací methioninu prostřednictvím <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Oxidací M dochází ke ztrátě regulační funkce buňky (Hoshi a Heinemann, 2000). Také při reakci zbytků C a M s ozonem vzniká <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Freinbichler a kol., 2011).

Z H zbytků vznikají přechodné endoperoxidy (g), ze kterých se tvoří další produkty. Sloučenina (h) se tvoří interakcí  $^1\text{O}_2$  se zbytkem W, který se potom přestavuje na N – formylkynurenin (i) (Klotz a kol., 2003). Tryptofan je snadno oxidován různým typem záření (Langlois a kol. 1986).

## 2.4 Monomolová emise ze $^1\text{O}_2$

Monomolová emise vzniká vyzářením fotonu z jedné molekuly  $^1\text{O}_2$  v IČ oblasti spektra. Má celkem tři emisní pásy – 1070, 1270 a 1580 nm, ale pouze jeden je silný a to o vlnové délce 1270 nm (Kanofsky, 1983).

(Aubry a Casin, 1988) potvrdili tvorbu  $^1\text{O}_2$  z chemického systému  $\text{MoO}_4^{2-}$  s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Böhme a Brauer, 1992) naměřili monomolovou emisi při 1270 nm při rozkladu  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí iontů molybdenu ve vodném médiu s pH 10,5. Ovšem více sloučenin molybdenu s  $\text{H}_2\text{O}_2$  tvoří  $^1\text{O}_2$ , jak je znázorněno na (Obr. 10). (Niu a Foote, 1992) dokázali, že  $^1\text{O}_2$  se dá získat i rozkladem  $\text{Na}_2\text{MoO}_8$ . První pozorování rozpadu peroxokomplexů bylo provedeno Pitts a spolupracovníky. Zjistili, že rozpadem perchornanu draselného ve vodném médiu vzniká monomolová emise při 1270 nm (Adam a kol., 2005).



*Obr. 10: Tvorba monomolové emise při 1270 nm při rozkladu  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí iontů molybdenu ve vodném médiu s pH 10,5 (převzato z Adam a kol., 2005).*

Singletní kyslík se vytváří v membráně obsahující kardiolipidy (CL), které se vážou s cytochromem c (cyt c) a tvoří cyt c – CL komplex. Ovšem v experimentu, který obsahoval jen CL, byl výtěžek nulový. Při přidání CL ROOH výtěžek lineárně vzrostl, jelikož jejich rozkladem se tvoří monomolová emise ze  $^1\text{O}_2$ . Další způsob tvorby je oxidace CL. Ukázalo se, že na tvorbu  $^1\text{O}_2$  má vliv i pH. Tedy monomolová emise ze  $^1\text{O}_2$  byla pozorována pouze u pH větší než 5,8 (Miyamoto a kol., 2012).

Organické ROOH, které obsahují  $\alpha$  – vodík můžou tvořit  $^1\text{O}_2$  pomocí Russellova mechanismu. Tetroxid se rozkládá na  $^3(\text{R}=\text{O})^*$ , alhokol a  $\text{O}_2$ . Touto reakcí vzniká buď  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  a molekulární kyslík, nebo  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  v základním stavu a právě  $^1\text{O}_2$ . (Prado a kol., 2009) studovali tvorbu  $^1\text{O}_2$  z thyminových ROOH, konkrétně 5 – (hydroperoxymethyl) uracil (5 – HPMU), protože je relativně stabilní oproti jiným DNA ROOH. V jejich práci

se zabývali reakcí 5 – HPMU s Cerem (Ce) a HOCl a následně měřili monomolovou emisí pocházející ze  $^1\text{O}_2$ . Monomolová emise po přidání Ce okamžitě vzrostla následkem Russellova mechanismu – čímž potvrdili tvorbu  $^1\text{O}_2$  v tomto chemickém systému. Stejný efekt mělo i přidání HOCl. Dále se potvrdilo, že intenzita monomolové emise byla závislá na koncentraci Ce nebo HOCl.

Mezi další známé reakce vedoucí k monomolové emisí ze  $^1\text{O}_2$  patří reakce peroxyinitritu (ONOO-), který je tvořen reakcí  $\text{O}_2^{\cdot-}$  s oxidem dusnatým, nebo NaOCl s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Těmito experimenty se zabývali Di Mascio a kol. V obou případech použili fosfátový pufr o pH 7,4, kde byl detekován silný nárůst emise a rychlý pokles, přičemž u reakce ONOO- s  $\text{H}_2\text{O}_2$  byl pokles nižší než v druhém případě (Di Mascio a kol., 1994). S NaOCl pracoval i (Harada a kol., 2009), kteří NaOCl a  $\text{H}_2\text{O}_2$  nemíchali s fosfátovým pufrům, ale s uhličitanovým pufrům o pH 10,8. Ve výsledcích se objevil jen vysoký peak, který má pravděpodobně za následek vytváření ekvimolárního množství  $^1\text{O}_2$  k reakci NaOCl s  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Jedna z hlavních mastných kyselin, která je přítomna v biologickém systému, je kyselina linolová, proto si ji Miyamoto a kol. vybrali pro studium tvorby  $^1\text{O}_2$ . Hydroperoxid odvozený od této kyseliny (LAOOH) byl použit v reakci s HOCl, se kterou tvoří  $^1\text{O}_2$  (Miyamoto a kol., 2006).

## 2.5 Dimolová emise ze $^1\text{O}_2$

Dimolová emise vzniká srážkou dvou molekul  $^1\text{O}_2$ . Má emisní pásy při 580, 634 a 703 nm, z toho jsou dva silné – 634 nm a 703 nm. (Kanofsky, 1983).

V roce 1960 byla poprvé pozorována dimolová emise při 634 nm jako důsledek reakce mezi  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{HOCl}$ , za vzniku  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Cl}^-$  (Seliger, 1960). O tři roky později v roce 1963 za použití stejného chemického systému byla pozorována dimolová emise ze  $^1\text{O}_2$  při vlnové délce 703 nm (Khan a Kasha, 1963).

Dimolová emise byla pozorována jak při samotné Fentonově reakci tak i v případech, kdy jsou organické molekuly oxidovány pomocí produktů Fentonovy reakce, například peroxidace kyseliny linolové. Chemický systém podobný Fentonovu je reakce  $\text{Eu}^{2+}$  s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tady vzniká emise při 580 nm a 630 nm. Dimolová emise také vzniká reakcí oxidu nitritu ( $\text{NO}^\cdot$ ) s  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Adam a kol., 2005).

Vliv  $\text{NaOCl}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na tvorbu  $^1\text{O}_2$  je známý. Zabývali se tím i (Lengfelder a kol., 1983), kteří k tomuto systému ještě přidávali 1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octan (DABCO). Tato sloučenina by měla působit jako zhasič  $^1\text{O}_2$  v plynné fázi, ale ve vodných roztocích po přidání DABCO nastává mírné zvýšení dimolové emise. Chemickým systémem s  $\text{NaOCl}/\text{H}_2\text{O}_2$  se zabývali i (Harada a kol., 2009) a (Di Mascio a kol. 1994) jak je zmíněno v předešlé kapitole. (Di Mascio a Sies, 1989) se taky věnovali stejnému chemickému systému, ale zajímali se i o jiný zdroj dimolové emise ze  $^1\text{O}_2$ . A tím je endoperoxid disodné soli 3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate ( $\text{NDPO}_2$ ). Kde se  $\text{NDPO}_2$  přidával buď do  $\text{H}_2\text{O}$  nebo do deuterované vody ( $\text{D}_2\text{O}$ ), která zvyšuje dobu života  $^1\text{O}_2$ . Experiment s  $\text{D}_2\text{O}$  měl vyšší emisi, než experiment s  $\text{H}_2\text{O}$ .

V předešlé kapitole jsme se zmínili o tvorbě  $^1\text{O}_2$  reakcí 5 – HPMU s  $\text{Ce}$  a  $\text{HOCl}$ . Tento chemický systém funguje i na tvorbu dimolové emise ze  $^1\text{O}_2$ . Tudiž po přidání  $\text{Ce}$  okamžitě vzrostla emise. Stejný efekt mělo i přidání  $\text{HOCl}$ . Čím vyšší koncentrace  $\text{Ce}$  nebo  $\text{HOCl}$  byla, tím vyšší emise byla (Prado a kol., 2009).

Cytochrom *c* s organickými  $\text{ROOH}$ , konkrétně *t*-butyl  $\text{ROOH}$  (*t*-BOOH) a cumene  $\text{ROOH}$ , vytváří slabou UPE, která vzniká rozkladem  $\text{ROOH}$  na  $^1\text{O}_2$  a jiné volné radikály (Cadenas a kol., 1980). Ten samý rok (Cadenas a kol., 1980) studovali působení *t*-BOOH a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na tvorbu  $^1\text{O}_2$ , konkrétně dimolové emise ze  $^1\text{O}_2$ , na plicích potkanů. Přidání *t*-BOOH do systému mělo lepší vliv na tvorbu emise než  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Peroxid vodíku

vyvolal rychlou emisi, zatímco t-BOOH ji držel konstantně vysokou a ještě vyšší než H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pravděpodobně to můžeme přisoudit tomu, že přidáním H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se tvoří spíše <sup>3</sup>(R=O)\* a přidáním t-BOOH se tvoří <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Russellovým mechanismem.



### 3. Cíl práce

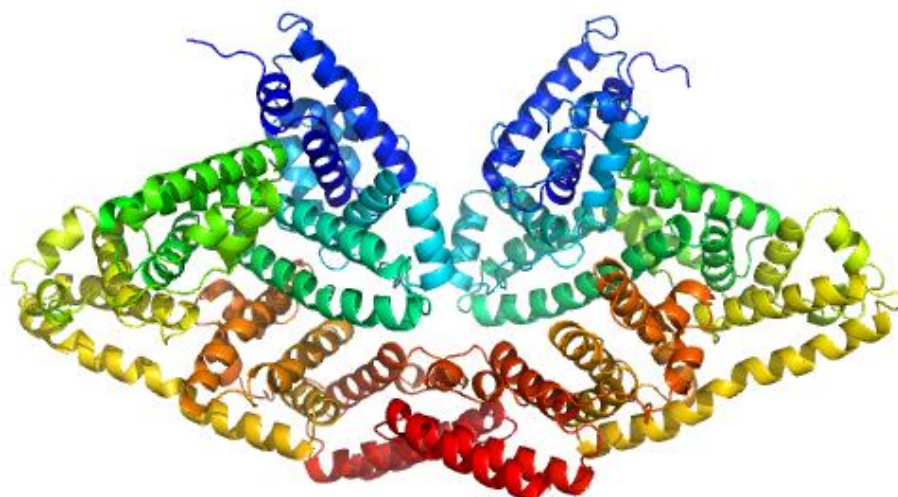
Cílem diplomové práce je vypracování rešerše na téma tvorba  $^1\text{O}_2$  přenosem excitační energie a přes Russellův mechanismus při oxidaci proteinů. V praktické části je cílem vytvoření organických ROOH a porovnání monomolové a dimolové emise ze  $^1\text{O}_2$  vzniklého Russellových mechanismem. Dále měření koncentrace  $^1\text{O}_2$  pomocí EPR. Cílem práce je dále srovnání mezi monomolovou emisí, dimolovou emisí a koncentrací  $^1\text{O}_2$ , a na základě tohoto porovnání potvrdit, nebo vyvrátit teorii, že dimolová emise ze  $^1\text{O}_2$  je jediný zdroj UPE v červené oblasti spektra.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Albumin

V této práci pracujeme s albuminem z hovězího séra (bovine serum albumin BSA), jedná se o protein krevního séra o molekulové hmotnosti 66 kDa. Řetězec je složený z 583 aminokyselin. Sekundární struktura BSA obsahuje 67% šroubovic, 10% zákrutů a 23% prodloužených řetězců.

BSA je jeden z nejdůležitějších antioxidantů v plazmě, který chrání regulační i klíčové buněčné proteiny (Guedes a kol., 2009).



Obr. 11: Struktura BSA (převzato z Copyright © SASDB 2014-2020)

### 4.2 Měření s PMT

Měření jsme prováděli na dvou fotonásobičích. Pro viditelnou oblast spektra (VIS) byl použit fotonásobič firmy (Hamamatsu Photonics K.K: Iwata city, Japan) s rozsahem od 185 nm do 730 nm. Pro detekci červeného spektra jsme použili hranový filtr s dlouhou hranou propustnosti od 600 nm. Pro měření v IČ oblasti spektra byl použit fotonásobič od firmy (Hamamatsu Photonics K.K: Iwata city, Japan) s rozsahem od 940 nm do 1400 nm a pásový filtr s propustností od 1240 nm. Měření jsme prováděli v černě vymalované místnosti, včetně podlahy, aby byly vytvořené ideální podmínky pro měření. Ve vedlejší místnosti je umístěn počítač pro zpracování dat. Vzorky měly pokojovou teplotu.

### 4.2.1 PMT pro VIS

Pro měření jsme použili fotonásobič jak bez filtru, tak s hranovým filtrem s dlouhou hranou s propustností od 600 nm. Fotonásobič jsme nastavili na napětí -960 V a chladili na -30°C termoelektrickým chladičem C9143. Vzorek jsme dávali do Petriho misky o průměru 5,5 cm. K albuminu o koncentraci 10 mg/1 ml jsme přidávali 250 µl MoO<sub>3</sub> (80 mM, 40 mM, 20 mM) nebo FeSO<sub>4</sub> (80 mM, 40 mM, 20 mM) s EDTA (20 mM), dále 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 mM, 200 mM, 100 mM), ve vybraných experimentech 166 µl katalázy (2mg/ml) nebo 166 µl NaOCl (100 mM), tak aby finální objem vzorku byl pokaždé 5 ml. Vzdálenost mezi PMT a vzorky byla 4 cm.

### 4.2.2 PMT pro IČ

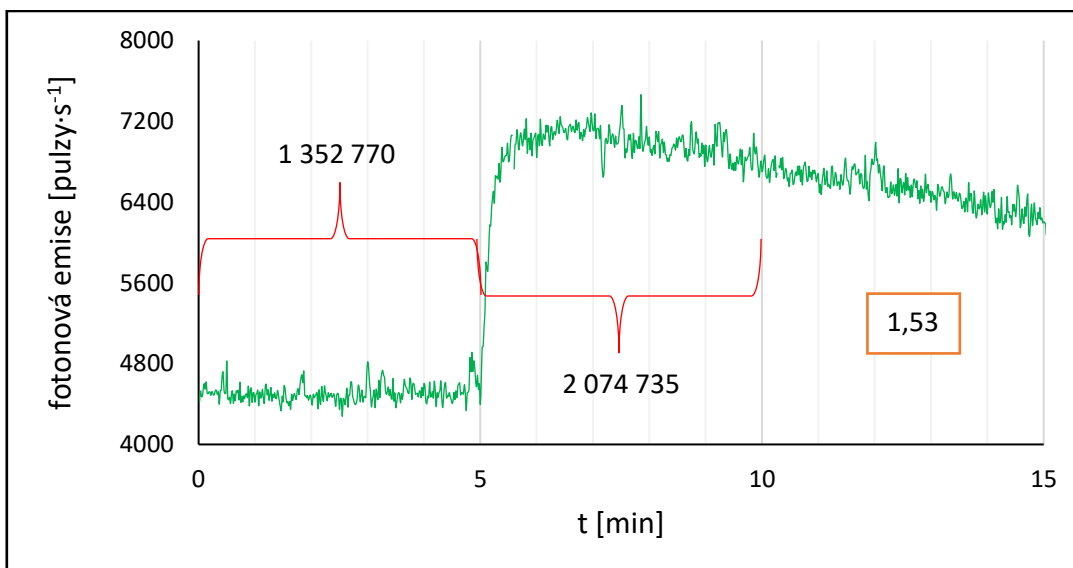
Použili jsme fotonásobič s pásovým filtrem a bez filtru. Nastavili jsme napětí na -800 mV. Pro měření jsme použili kyvety o objemu 3 ml a o velikosti 1x1x4 cm. K albuminu (10 mg/1 ml) jsme přidávali 150 µl MoO<sub>3</sub> (80 mM, 40 mM, 20 mM) nebo FeSO<sub>4</sub> (80 mM, 40 mM, 20 mM) s EDTA (20 mM), dále 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 mM, 200 mM, 100 mM), ve vybraných experimentech 100 µl katalázy (2mg/ml) nebo 100 µl NaOCl (100 mM), tak aby finální objem vzorku byl pokaždé 3 ml. Kyvetu se vzorkem jsme dali do stojánku 1 cm před fotonásobič.

## 4.3 Měření s EPR spektroskopii

Měřili jsme na spektrometru EPR MiniScope MS400 (Magnettech GmbH, Berlin, Germany). Ke vzorku jsme přidávali TEMPDP (2,2,6,6-tetramethylpiperidin), který reaguje se <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a tvoří se stabilní TEMPONE. Výsledný objem vzorku byl 33 µl. Kapiláru určenou pro měření na EPR jsme naplnili roztokem a uzavřeli „uzavírací hmotou“. Kapiláru jsme vložili do EPR spektrometru a nastavili požadované hodnoty. Parametry spektra: střed spektra (B<sub>0</sub>-field): 335,7815 mT, šířka spektra (sweep): 8,9506 mT, doba měření spektra (sweep time): 60s. Parametry detekce spektra: modulace (modulation) 0,1 mT, výkon mikrovlnného záření (MW atten): 10 dB, zesílení (gain): 5. Parametry zápisu spektra: vyhlazení (smooth): 0s, počet opakování (number of passes): 3, počet naměřených hodnot (NOPs): 4096.

#### 4.4 Statistické vyhodnocení

Pro měření jsme používali dva rozdílné PMT, které mají rozdílný background a kvantovou účinnost. Pro srovnání těchto PMT jsme museli normovat. Normovali jsme pulzy za 300 s z indukované UPE (2 074 735) na počet pulzů za 300 s spontánní UPE (1 352 770). Měření jsme vždy prováděli 3x a z konečných hodnot jsme udělali průměr, který nám tvoří sloupcové grafy. U sloupcových grafů máme zavedenou i směrodatnou odchylku.



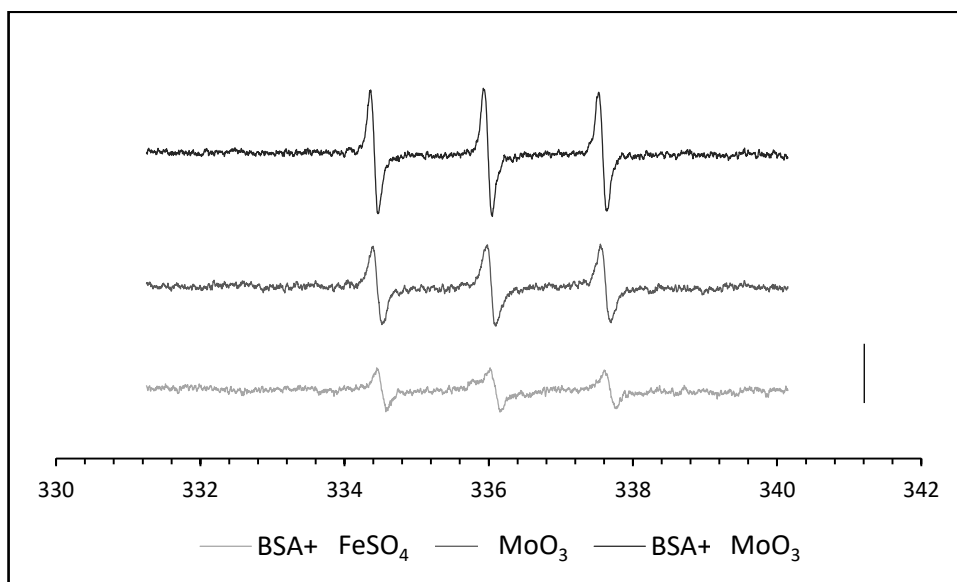
Obr. 12: Ukázkový graf pro normování.

## 5. Výsledky

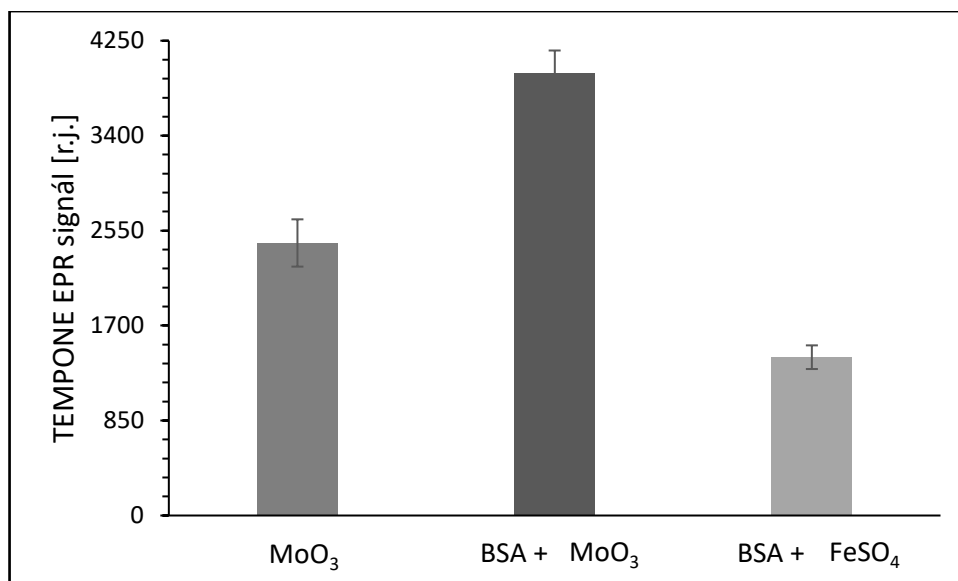
### 5.1 Měření na EPR

#### 5.1.1 Měření TEMPONE EPR signálu indukovaného $^1\text{O}_2$ nebo $\text{HO}\cdot$

Měřili jsme tvorbu  $^1\text{O}_2$  pomocí TEMPONE EPR signálu ze třech chemických systémů:  $\text{MoO}_3$ , BSA s  $\text{MoO}_3$  a BSA,  $\text{FeSO}_4$  a EDTA. Ke všem byl přidán  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hodnoty z TEMPONE EPR signálu (Obr 13) jsme normovali (Obr. 14) a můžeme porovnat tři zmíněné chemické systémy. Koncentrace TEMPONE ve vzorku obsahující BSA a  $\text{MoO}_3$  měla 1,6x vyšší nárůst než koncentrace TEMPONE ve vzorku obsahující  $\text{MoO}_3$  a 2,8x vyšší nárůst než koncentrace TEMPONE ve vzorku obsahující BSA a  $\text{FeSO}_4$ .



Obr. 13: TEMPONE EPR signál tří chemických systémů:  $\text{MoO}_3$ , BSA s  $\text{MoO}_3$  a BSA,  $\text{FeSO}_4$  a EDTA. Měřítka ukazuje 2000 relativních jednotek.

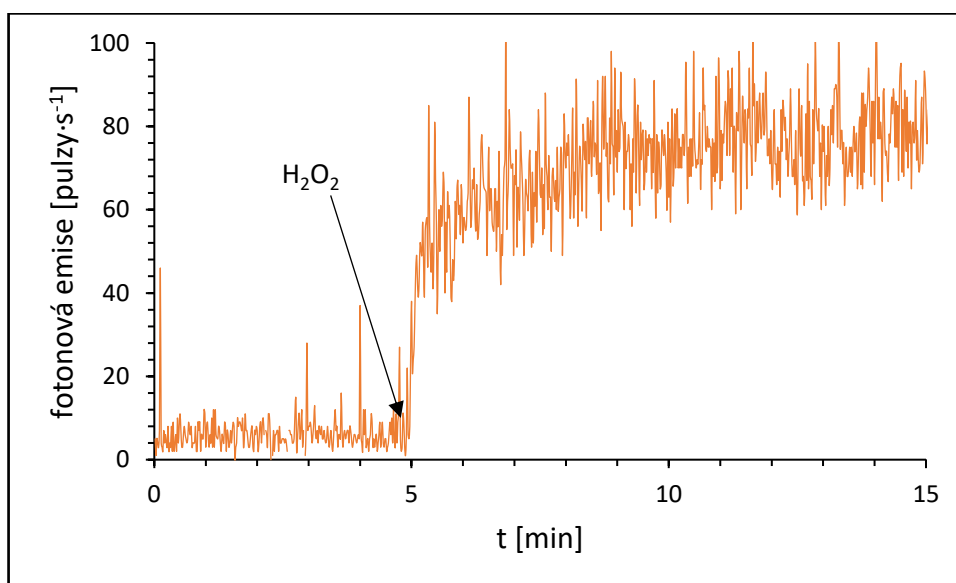


Obr. 14: TEMPONE EPR signál ze třech chemických systémů: MoO<sub>3</sub>, BSA s MoO<sub>3</sub> a BSA, FeSO<sub>4</sub> a EDTA. Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

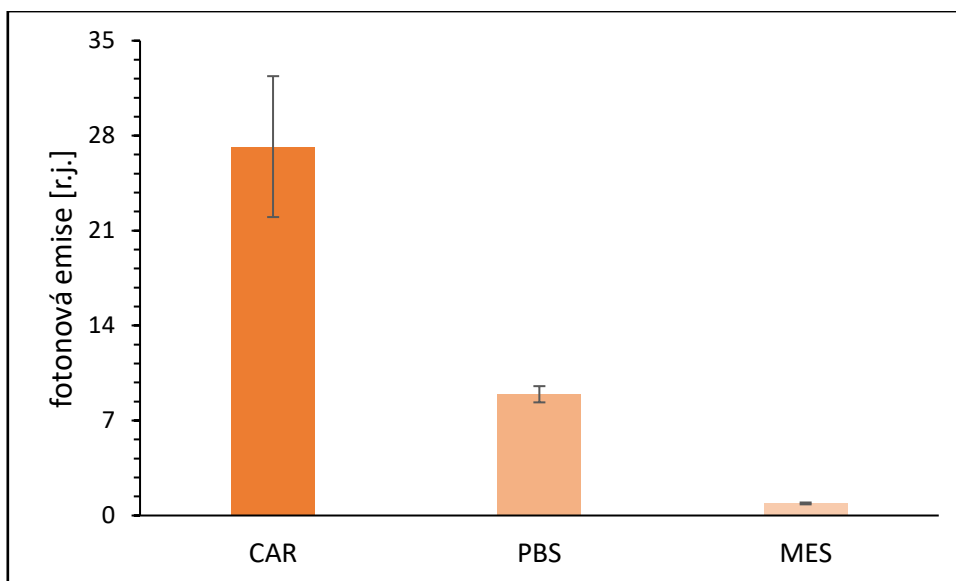
## 5.2 Vliv pH na UPE

### 5.2.1 Měření na PMT pro VIS

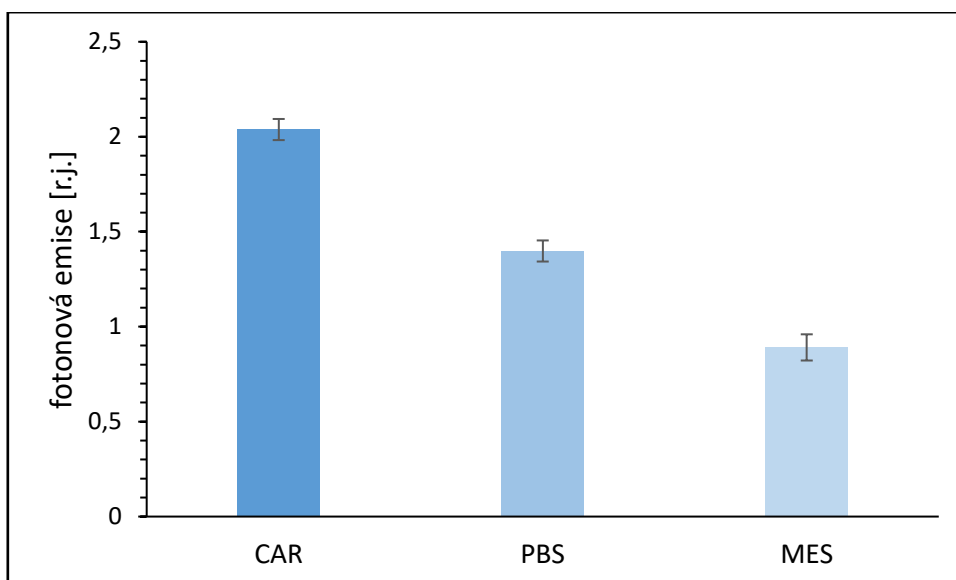
Zjišťovali jsme vliv pH na UPE z BSA. Porovnávali jsme (MES) o pH 5,0, fosfátový pufr (PBS) o pH 7,5 a uhličitanový pufr (CAR) o pH 10,8. Pro lepší představu ukazujeme záznam z měření na PMT (Obr. 15). Měřili jsme celkovou UPE ze vzorku (PMT bez filtru, Obr. 16), tak i UPE v červené oblasti (PMT s hranovým filtrem, Obr. 17). Přidání  $\text{MoO}_3$  ke zvýšení UPE nevedl, ale následné přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mělo za následek zvýšení UPE. Čím vyšší pH, tím vyšší UPE byla. Oproti měření s PBS byla UPE u měření s CAR 3x vyšší (Obr. 16). Na základě tohoto měření byl CAR vybrán pro další experimenty.



Obr. 15: Vliv pH 10,8 (CAR) UPE ve VIS oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Obr. 16: Vliv pH 10,8 (CAR), 7,5 (PBS) a 5,0 (MES) na UPE ve VIS oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

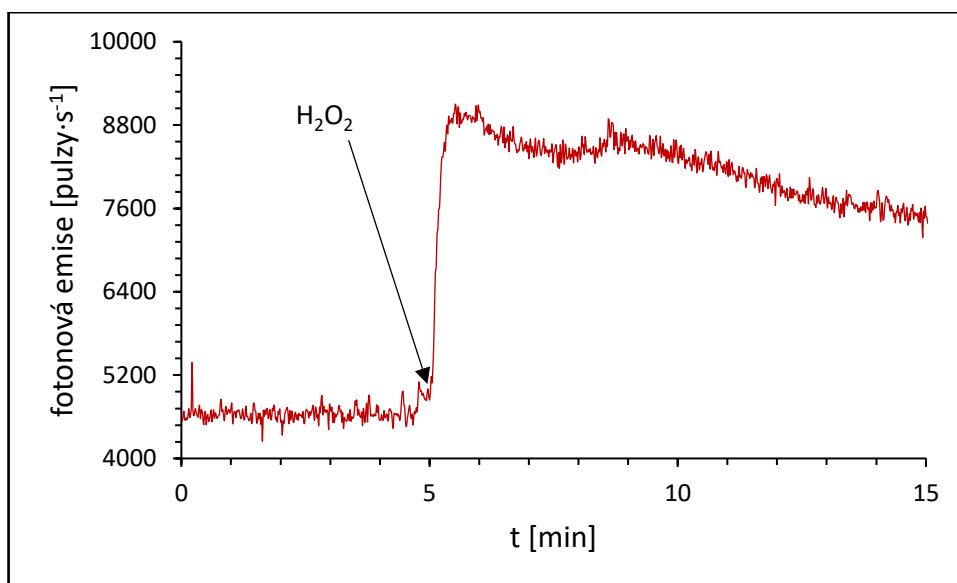


Obr. 17: Vliv pH 10,8 (CAR), 7,5 (PBS) a 5,0 (MES) na UPE v červené oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

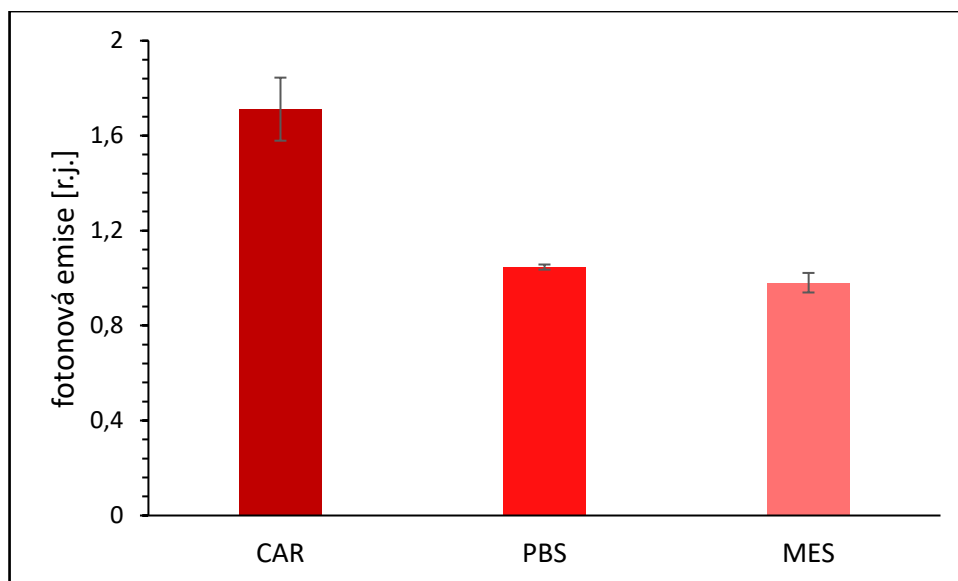


### 5.2.2 Měření na PMT pro IČ

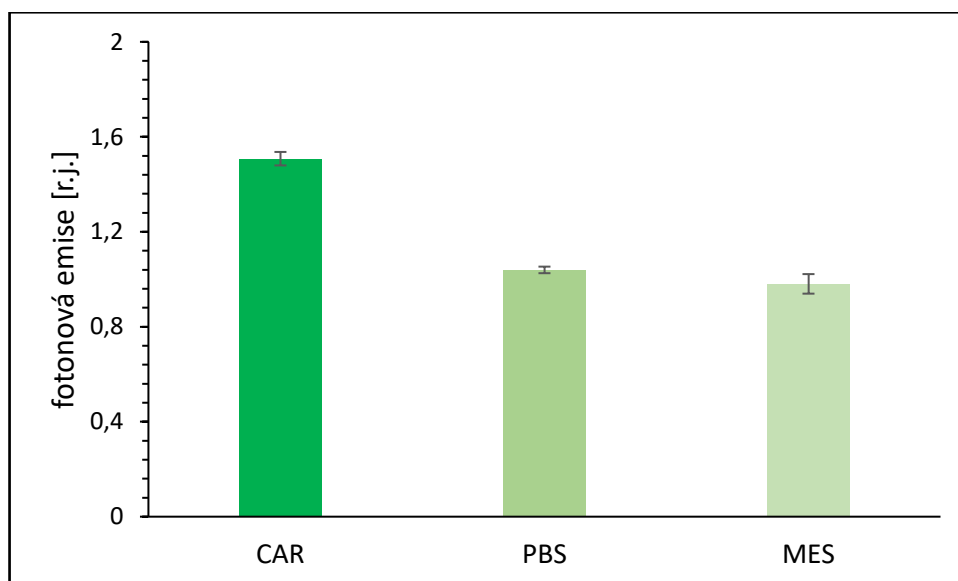
Studovali jsme vliv pH na UPE za použití pufrů MES o pH 5,0, PBS o pH 7,5 a CAR o pH 10,8. Pro lepší představu ukazujeme ilustrační obrázek (Obr. 18) z měření na PMT. Měřili jsme UPE pro blízkou IČ oblast spektra (PMT bez filtru, Obr. 19) a při 1270 nm (PMT s pásovým filtrem, Obr. 20). Přidání  $\text{MoO}_3$  nemělo na UPE žádný vliv, ale přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  mělo za následek zvýšení UPE. Nárůst UPE byl za použití pufru CAR 1,6x vyšší než nárůst za použití pufru PBS. Z tohoto důvodu jsme si pro další měření vybrali pufr CAR.



Obr. 18: Vliv pH 10,8 (CAR) UPE v blízké IČ oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Obr. 19: Vliv pH 10,8 (CAR), 7,5 (PBS) a 5,0 (MES) na UPE v blízké IČ oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

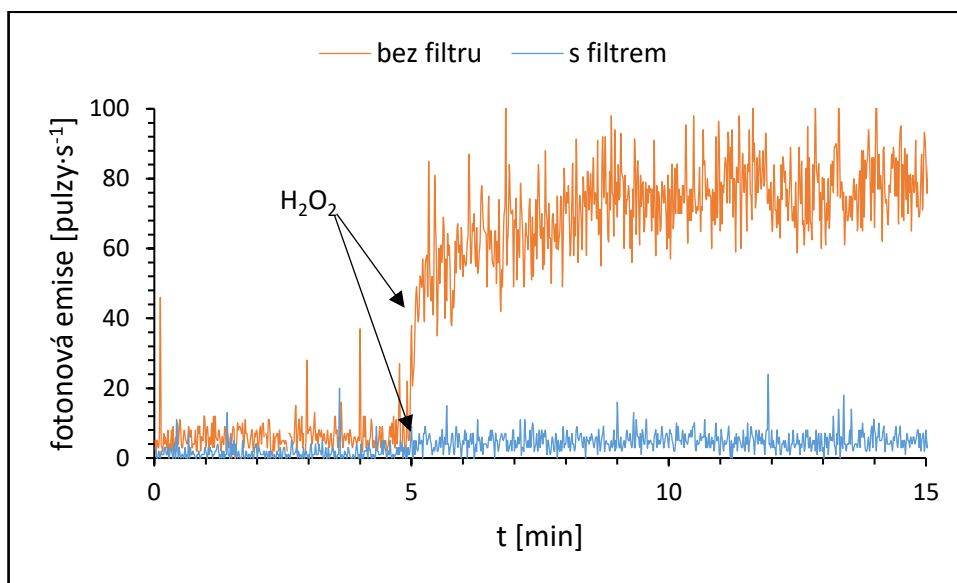


Obr. 20: Vliv pH 10,8 (CAR), 7,5 (PBS) a 5,0 (MES) na UPE při 1270 nm. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a v 5. minutě 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

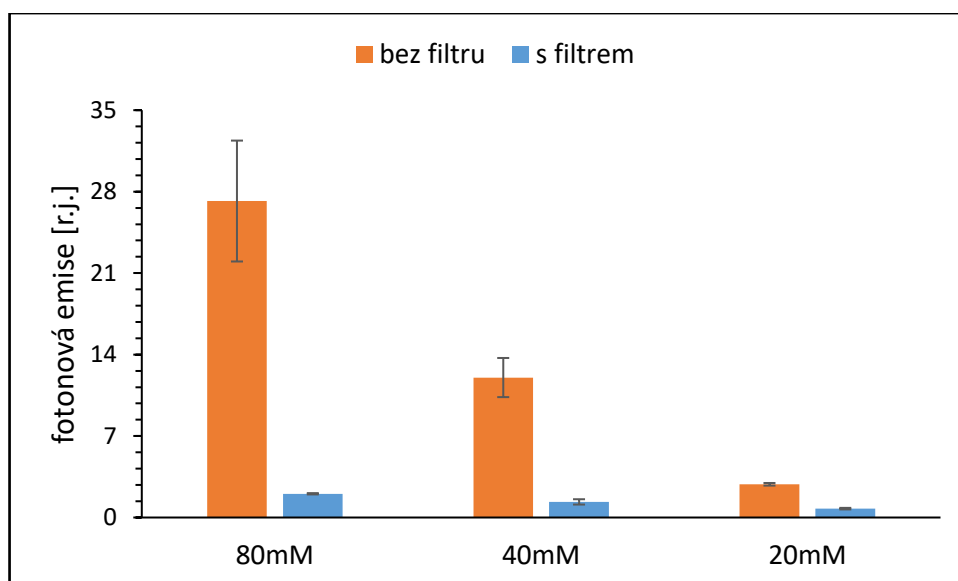
### 5.3 Měření na PMT pro VIS oblast spektra

#### 5.3.1 Vliv koncentrace reaktantů na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$

Studovali jsme nárůst UPE ve VIS a červené oblasti spektra při koncentraci 80 mM  $\text{MoO}_3$  a 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Obr. 21). Srovnávali jsme UPE při různých koncentracích (Obr. 22) 80 mM, 40 mM a 20 mM  $\text{MoO}_3$  a 400 mM, 200 mM a 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Po přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  UPE ve VIS oblasti spektra vzrostla 13,4x oproti UPE v červené oblasti spektra.



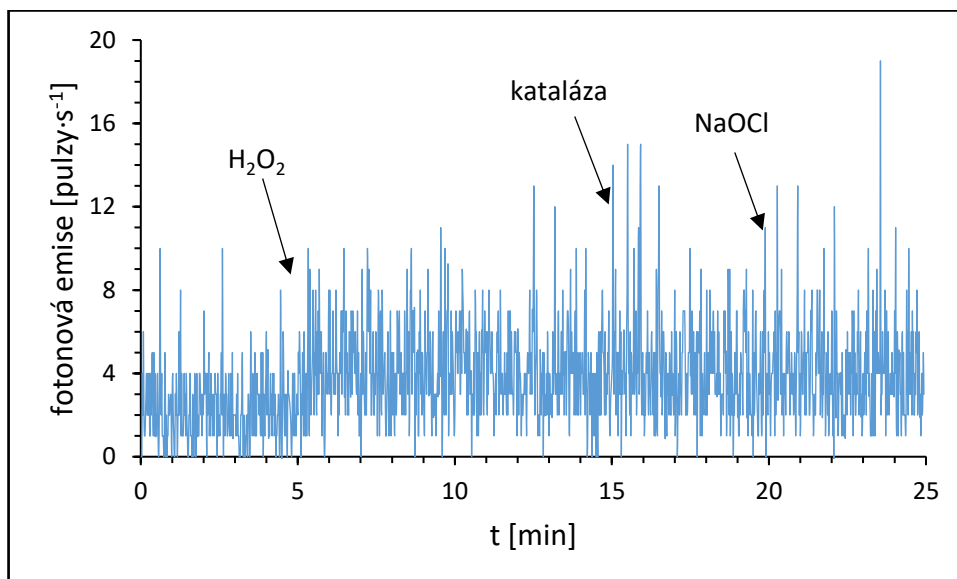
Obr. 21: Vliv  $\text{H}_2\text{O}_2$  na UPE pro VIS (bez filtru) a červenou (s filtrem) oblast spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a měřili 5 minut. Poté jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Obr. 22: Vliv  $H_2O_2$  na UPE pro VIS (bez filtru) a červenou (s filtrem) oblast spektra. Na začátku měření byl k BSA přidán 80 mM, 40 mM nebo 20 mM  $MoO_3$  a v 5. minutě 400 mM, 200 mM nebo 100 mM  $H_2O_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

### 5.3.2 Vliv katalázy a NaOCl na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$

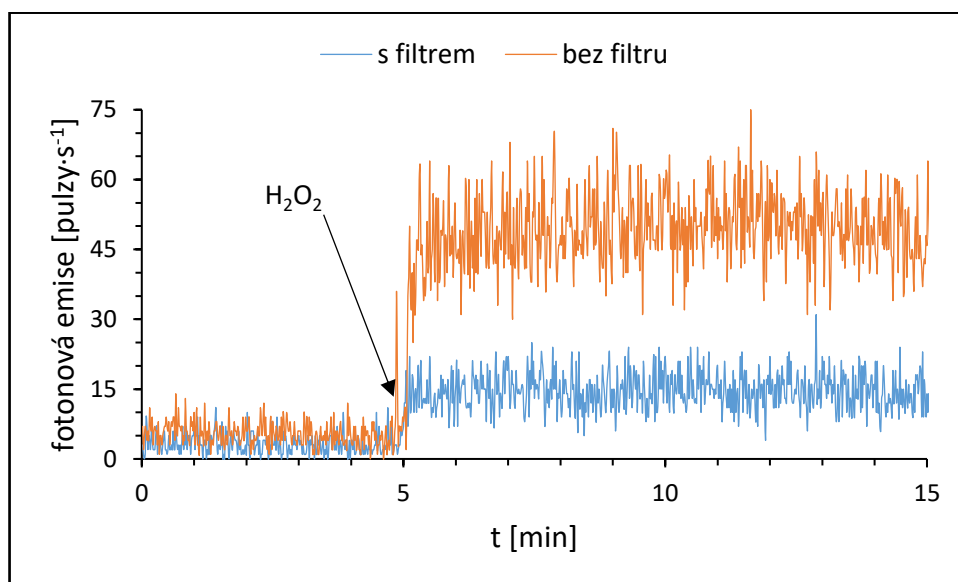
Zjišťovali jsme vliv antioxidantů a NaOCl na UPE v červené oblasti spektra v chemickém systému s  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V 15. minutě měření jsme přidali katalázu a v 20. minutě NaOCl (Obr. 23). Přidání katalázy ani NaOCl nemělo prokazatelný efekt na UPE.



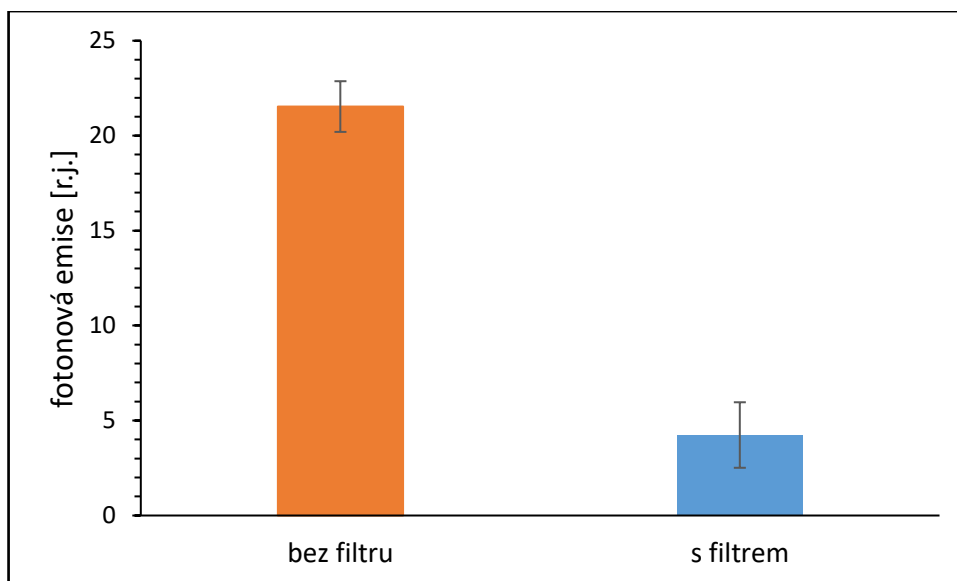
Obr. 23: Vliv antioxidantů a NaOCl na UPE v červené oblasti spektra. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$ . V 5. minutě měření jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V 10. minutě katalázu, se kterou jsme měřili 5 minut a v 15. minutě jsme přidali 100 mM NaOCl.

### 5.3.3 Měření UPE indukovanou HO<sup>•</sup>

Studovali jsme vliv FeSO<sub>4</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na UPE ve VIS a červené oblasti spektra. Přidání FeSO<sub>4</sub> smíchaném s EDTA nemělo na UPE žádný vliv, ale po přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> UPE vzrostla (Obr. 24). Porovnávali jsme UPE ve VIS a červené oblasti spektra (Obr. 25), kde lze vidět, že UPE ve VIS oblasti spektra je 5x vyšší než UPE v červené oblasti spektra.



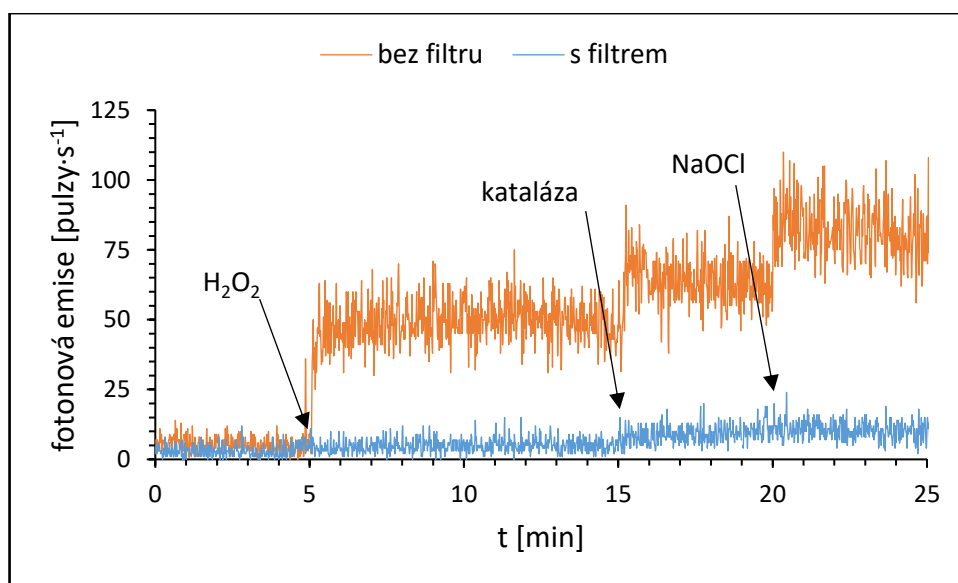
Obr. 24: Porovnání UPE pro VIS (bez filtru) a červenou (s filtrem) oblast spektra. K BSA jsme přidali FeSO<sub>4</sub> a EDTA. V 5. minutě jsme přidali 400 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Obr. 25: Porovnání UPE pro VIS (bez filtru) a červenou (s filtrem) oblast spektra. Na začátku měření jsme k BSA přidali  $\text{FeSO}_4$  a EDTA. V 5. minutě jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

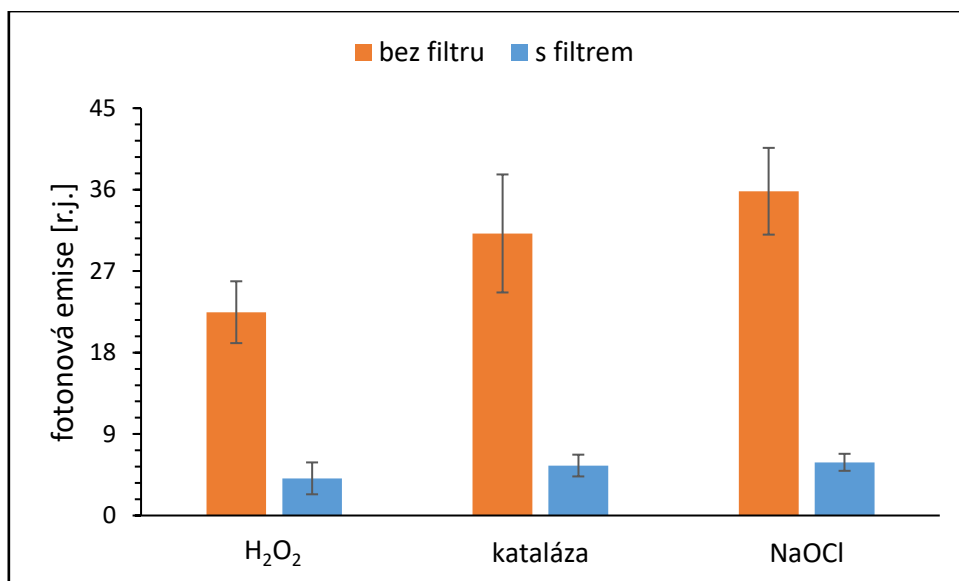
### 5.3.4 Vliv katalázy a NaOCl na UPE indukovanou HO<sup>•</sup>

Zkoumali jsme vliv antioxidantů a NaOCl na UPE ve VIS a červené oblasti spektra za použití chemického systému s FeSO<sub>4</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Přidání katalázy a NaOCl mělo vliv na UPE ve VIS oblasti i v červené oblasti spektra (Obr. 26). Porovnávali jsme UPE po přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalázy a NaOCl (Obr. 28). Zjistili jsme, že po přidání katalázy UPE ve VIS oblasti spektra vzrostla 5,6x oproti UPE v červené oblasti spektra. Přidání NaOCl mělo stejný efekt, ale nárůst byl 6,1x vyšší než v červené oblasti spektra.



Obrázek 26: Měření UPE ve VIS (bez filtru) a červené (s filtrem) oblasti spektra. K BSA jsme přidali FeSO<sub>4</sub> a EDTA. V 5. minutě měření jsme přidali 400 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V 15. minutě katalázu, se kterou jsme měřili 5 minut a v 20. minutě jsme přidali 100 mM NaOCl.



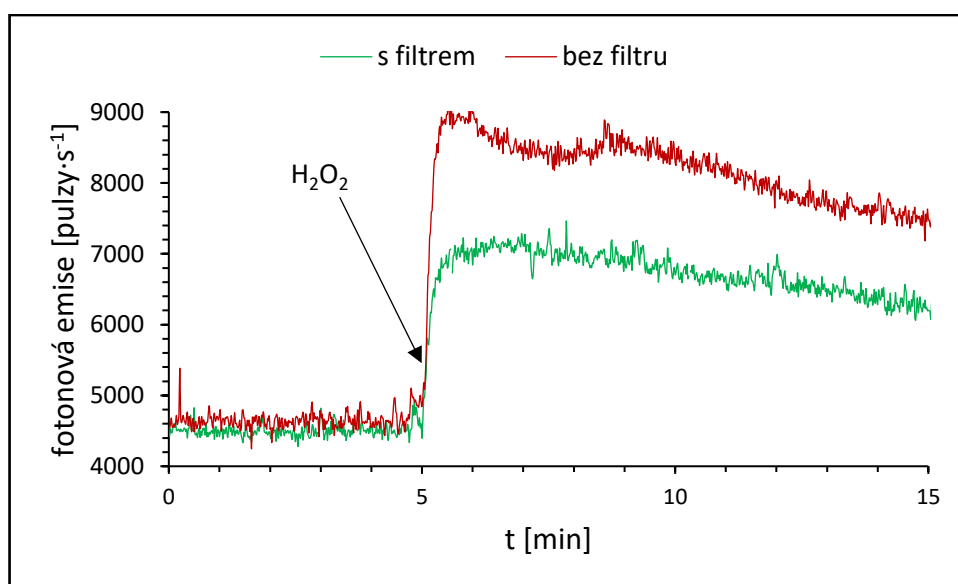


Obr. 27: Porovnání nárůstu UPE ve VIS (bez filtru) a červené (s filtrem) oblasti spektra. K BSA jsme přidali FeSO<sub>4</sub> a EDTA. V 5. minutě jsme přidali 400 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V 10. minutě katalázu a v 15. minutě NaOCl. Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

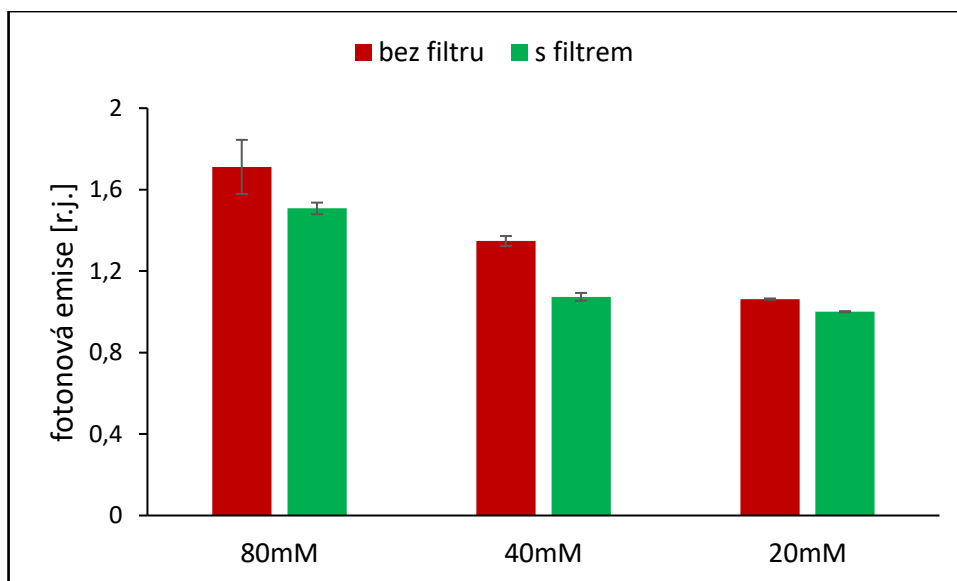
## 5.4 Měření na PMT pro IČ oblast spektra

### 5.4.1 Vliv koncentrace reaktantů, katalázy a NaOCl na UPE indukovanou $^1\text{O}_2$

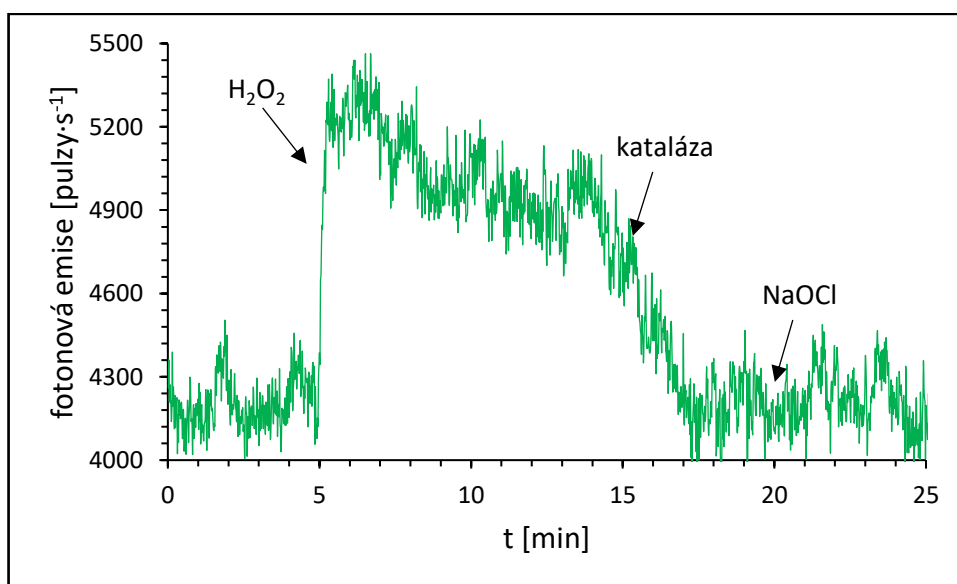
Porovnávali jsme vliv  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na UPE v blízké IČ oblasti spektra a při 1270 nm a studovali jsme vliv antioxidantů a NaOCl na UPE při 1270 nm. Porovnávali jsme UPE pro blízkou IČ oblast spektra a při 1270 nm (Obr. 28), kde jsme přidávali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Přidání  $\text{MoO}_3$  nemělo na UPE žádný efekt, ale přidání  $\text{H}_2\text{O}_2$  mělo za následek zvýšení UPE. Prováděli jsme měření o různých koncentracích  $\text{MoO}_3$  (80 mM, 40 mM a 20 mM) a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (400 mM, 200 mM a 100 mM), které jsme následně porovnali (Obr. 29). Nejvyšší použitá koncentrace měla 1,55x vyšší nárůst UPE než koncentrace nejnižší. Přidání katalázy mělo za následek snížení UPE, ale NaOCl nemělo na UPE žádný vliv (Obr. 30).



Obr. 28: Vliv  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na UPE pro blízkou IČ oblast spektra (bez filtru) a při 1270 nm (s filtrem). K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$  a měřili 5 minut. Poté jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



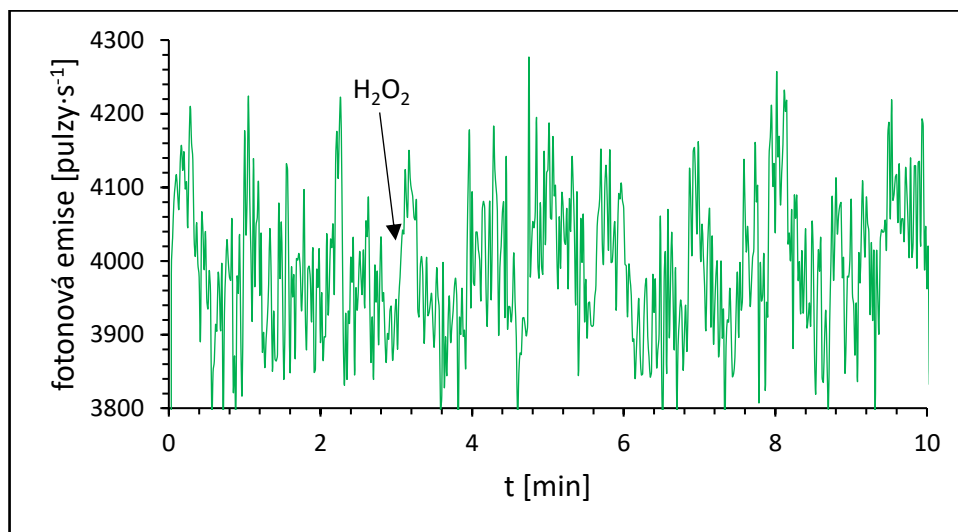
Obr. 29: Vliv  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na UPE pro blízkou IČ oblast spektra (bez filtru) a při 1270 nm (s filtrem). Smíchali jsme BSA s 80 mM, 40 mM nebo 20 mM  $\text{MoO}_3$  a nechali měřit 5 minut. V 5. minutě jsme přidali 400 mM, 200 mM nebo 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  a měřili 10 minut. Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.



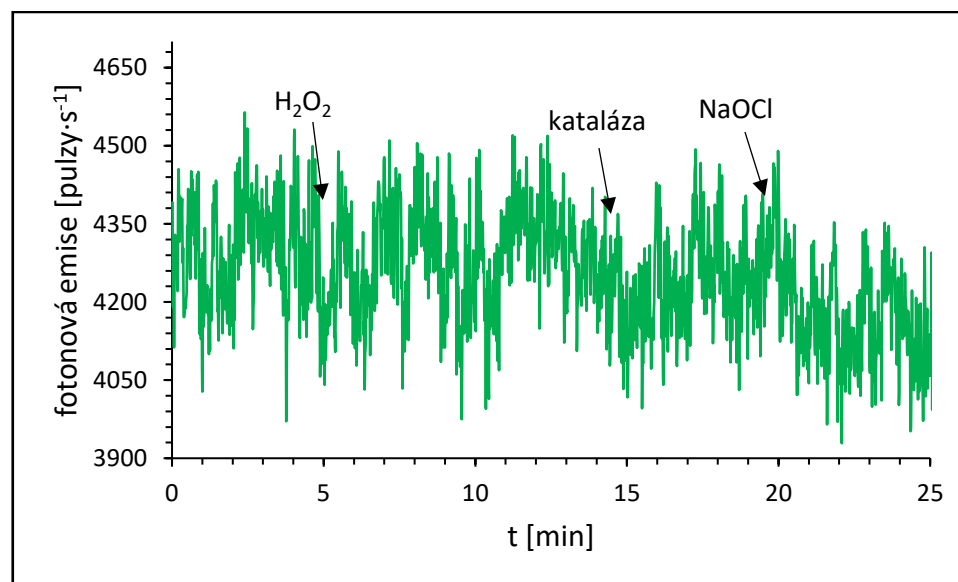
Obr. 30: Vliv antioxidantů a NaOCl na UPE při 1270 nm. K BSA jsme přidali 80 mM  $\text{MoO}_3$ . V 5. minutě měření jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V 10. minutě katalázu, se kterou jsme měřili 5 minut. V 15. minutě jsme přidali 100 mM NaOCl.

#### 5.4.2 Měření UPE indukovanou HO<sup>•</sup>

Studovali jsme vliv  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalázy a  $\text{NaOCl}$  na UPE při 1270 nm. Síran železnatý smíchaný s EDTA, ani  $\text{H}_2\text{O}_2$  neměli na UPE žádný vliv (Obr. 31). Přidáním katalázy a  $\text{NaOCl}$  nevníklo žádné snížení ani zvýšení UPE (Obr. 32).



Obr. 31: Vliv  $\text{FeSO}_4$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na UPE při 1270 nm. K BSA jsme přidali  $\text{FeSO}_4$  a EDTA a měřili jsme 2,5 minuty. V 2,5 minutě jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

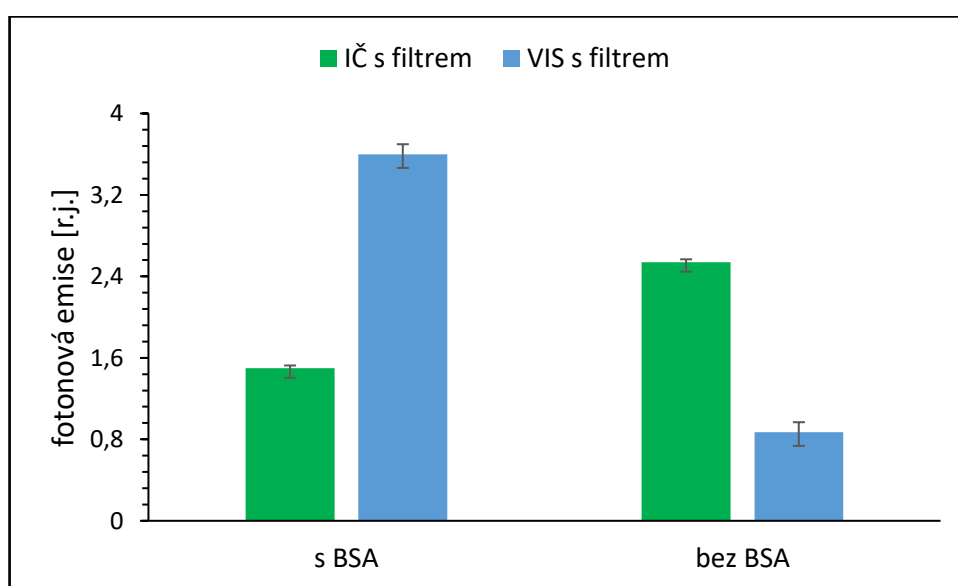


Obr. 32: Vliv antioxidantů a  $\text{NaOCl}$  na UPE při 1270 nm. K BSA jsme přidali  $\text{FeSO}_4$  a EDTA. V 5 minutě měření jsme přidali 400 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V 15. minutě katalázu, se kterou jsme měřili 5 minut. V 20. minutě jsme přidali 100 mM  $\text{NaOCl}$ .

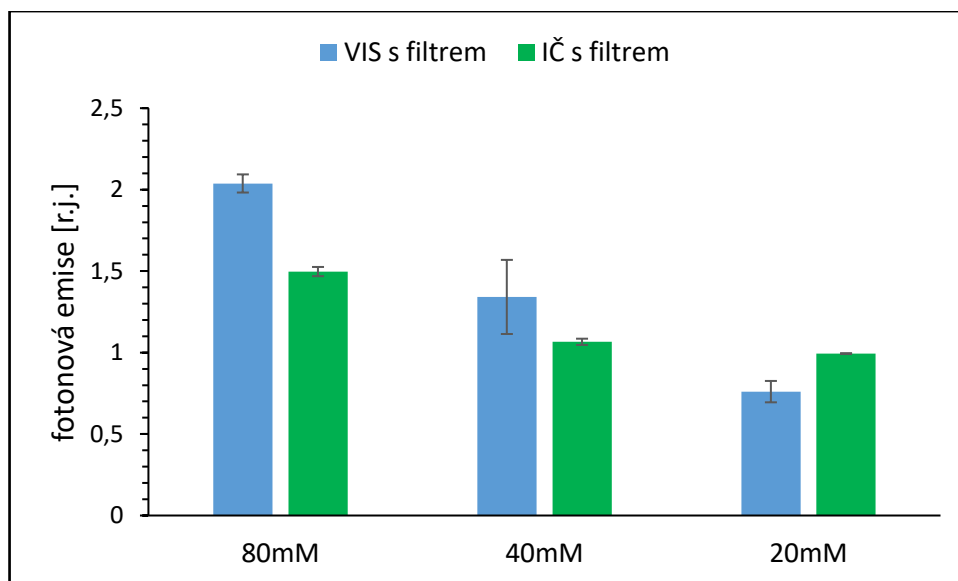
## 5.5 Shrnutí měření

### 5.5.1 Porovnání UPE ve VIS a IČ oblasti spektra

Porovnávali jsme nárůst UPE v červené oblasti spektra a při 1270 nm. Srovnávali jsme nárůst UPE za použití a bez použití BSA (Obr. 33). Přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mělo za následek zvýšení UPE. V měření s BSA měla UPE v červené oblasti spektra 2,4x vyšší nárůst než UPE při 1270 nm. Zatímco bez BSA to bylo naopak. Ultra slabá emise fotonů při 1270 nm měla 2,9x vyšší nárůst než UPE v červené oblasti spektra. Porovnávali jsme různé koncentrace MoO<sub>3</sub> (80 mM, 40 mM a 20 mM) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 mM, 200 mM a 100 mM) (Obr 34), kde jsme zároveň srovnávali UPE v červené oblasti a při 1270 nm.



Obr. 33: Porovnání nárůstu UPE indukované <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ve vzorku s a bez BSA měřené v přítomnosti filtrů. Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.



Obr. 34: Porovnání nárůstu UPE v červené oblasti s při 1270 nm. K BSA jsme přidali 80 mM, 40 mM nebo 20 mM MoO<sub>3</sub> a v 5. minutě jsme přidali 400 mM, 200 mM nebo 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Indukovaná UPE byla normována na spontánní UPE z chemického systému.

### 5.5.3 Porovnání všech měření

Tabulka č. 1: Srovnání výsledků indukované UPE, kde NE znamená, že chemický systém neměl na UPE vliv a ANO znamená navýšení UPE, případně kolikrát byla UPE vyšší oproti jinému vzorku.

	IČ S F	IČ BEZ F	VIS S F	VIS BEZ F
CAR: BSA s MoO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ANO	ANO	ANO	ANO
PBS: BSA s MoO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NE	NE	NE	ANO
MES: BSA s MoO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NE	NE	NE	ANO
CAR: BSA s MoO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a kataláza	ANO	-	NE	-
+ NaOCl	NE	-	NE	-
CAR s MoO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (bez BSA)	ANO 1,6x vyšší než s BSA	-	NE	-
CAR: BSA s (FeSO <sub>4</sub> + EDTA) a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NE	-	ANO	ANO
CAR: BSA s (FeSO <sub>4</sub> + EDTA) a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a kataláza	NE	-	vyšší 1,3x než H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vyšší 1,4x než H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
+ NaOCl	NE	-	vyšší 1,1x než kataláza	vyšší 1,1x než kataláza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> s NaOCl	NE	NE	NE	NE

## 6. Diskuse

V literatuře se UPE z červené oblasti přisuzuje buď Ch\* nebo dimolové emisi ze  $^1\text{O}_2$  (Tab. č. 2). (Cadenas a kol., 1980, Di Mascio a kol., 1994) měřili indukovanou UPE a používali PBS pufr a filtr pro červenou oblast spektra. Jiný pufr, konkrétně CAR zkusili (Harada a kol., 2009) a také použili filtr pro červenou oblast spektra. Je známo, že doba života  $^1\text{O}_2$  je delší v  $\text{D}_2\text{O}$  než v  $\text{H}_2\text{O}$  (Ogilby a Foote, 1983). S  $\text{D}_2\text{O}$  měřili (Di Mascio a Sies, 1989 a Prado a kol., 2009) a používali také filtr pro červenou oblast spektra, ale (Di Mascio a Sies, 1989) měřili i s  $\text{H}_2\text{O}$ , kdy byla indukovaná UPE nižší než za použití  $\text{D}_2\text{O}$ . Na základě jejich zjištění se  $\text{D}_2\text{O}$  začala používat jako standartní test pro  $^1\text{O}_2$  a nezkoumali, jestli to je  $^1\text{O}_2$ .

*Tabulka č. 2: Přehled literatury, ve které se zabývali monomolovou a dimolovou emisí ze  $^1\text{O}_2$ . Jaké rozpouštědla, chemikálie a filtry při měření použili.*

	rozpuštědlo	chemikálie	rozsah	emise
Cadenas a kol., 1980	PBS	t-BOOH, $\text{H}_2\text{O}_2$	300 - 900 nm červený filtr	dimolová
Lengfelder a kol., 1983	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaOCl}$ , DABCO, $\text{H}_2\text{O}_2$	600 - 750 nm	dimolová
Di Mascio a Sies, 1989	$\text{D}_2\text{O}$ , $\text{H}_2\text{O}$	$\text{NDPO}_2$	červený filtr	dimolová
Di Mascio a kol., 1994	PBS	$\text{NaOCl}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$	od 610 nm	dimolová
Miyamoto a kol., 2006	PBS, $\text{D}_2\text{O}$	$\text{LAOOH}$ , $\text{HOCl}$	od 1270 nm	monomolová
Harada a kol., 2009	CAR	$\text{NaOCl}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$	od 600 nm	dimolová
			950 - 1400 nm	monomolová
Prado a kol., 2009	$\text{D}_2\text{O}$	5-HPMU a Ce, $\text{HOCl}$ , $\text{NaN}_3$	od 570 nm	dimolová
			800 - 1400 nm	monomolová

Cílem mé diplomové práce bylo mimo jiné ověřit fakt, zda se opravdu jedná o dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$ . Pro zjednodušení jsme si vybrali chemický systém, který neobsahuje žádné \*Ch, a zároveň je v literatuře popsáno, že podobné chemické systémy vedou k tvorbě  $^1\text{O}_2$  – jako například (Cadenas a kol., 1980, Miyamoto a kol., 2006, Miyamoto a kol., 2012, Prado a kol., 2009). Také vycházíme z předpokladu, že jestli je přítomná dimolová emise ze  $^1\text{O}_2$ , musí být přítomna i monomolová emise ze  $^1\text{O}_2$ . Po



vybrání chemického systému jsme vytvořili organické ROOH a porovnali jsme indukovanou UPE v červené a IČ oblasti spektra za použití EPR a dvou PMT. Na základě tohoto srovnání se chceme rozhodnout, zda se jedná o dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$  nebo ne.

S experimenty na EPR jsme si chtěli potvrdit tvorbu  $^1\text{O}_2$ . Měřili jsme vliv  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  s BSA,  $\text{MoO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  bez BSA a  $\text{FeSO}_4$  smíchaný s EDTA a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Obr. 13). Měření s  $\text{FeSO}_4$ , EDTA a  $\text{H}_2\text{O}_2$  mělo nejmenší nárůst (Obr. 14), ale i přesto, jsme si potvrdili tvorbu  $^1\text{O}_2$  v našich chemických systémech. V dalších kapitolách jsme se už věnovali měření na PMT.

Použití různých pufrů odhalilo, že pH má výrazný vliv na intenzitu UPE (Obr. 16). S rostoucím pH roste i UPE, jak jsme si ověřili porovnáním pufrů MES o pH 5,0, PBS o pH 7,5 a CAR o pH 10,8. Měřili jsme UPE ve VIS oblasti spektra (Obr. 16), kde můžeme pozorovat vysoký rozdíl mezi pufrů. U UPE pro červenou oblast spektra (Obr. 17) jsou rozdíly v nárůstu, ale ne tak markantní. U UPE v blízké IČ oblasti spektra (Obr. 19) a při 1270 nm (Obr. 20) jsou rozdíly mezi pufrů velké, proto jsme se rozhodli pro další měření používat už jen pufr CAR o pH 10,8. Tento pufr používali i (Harada a kol., 2009), kterými jsme se inspirovali.

Srovnáním UPE ve VIS a červené oblasti jsme zjistili, že emise indukovaná  $^1\text{O}_2$  ve VIS oblasti je přibližně 13x vyšší než v červené oblasti, zatímco při UPE indukované  $\text{HO}^\bullet$  je UPE vyšší pouze cca 5x. Porovnávali jsme nárůst UPE indukovanou  $^1\text{O}_2$  (Obr. 21), kde jsme po přidání očekávali tvorbu proteinových ROOH. V případě bez filtru bylo navýšení veliké, protože jsme měřili celou VIS oblast. V této oblasti můžou vyzařovat  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  i  $^1\text{O}_2$ . S filtrem bychom měli měřit dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$ , ale žádný rapidní nárůst jsme nezpozorovali. Přidání  $^1\text{O}_2$  vedlo k tvorbě ROOH. (Di Mascio a kol., 1994) ukázali, že redukce  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocí  $\text{NaOCl}$  vede k tvorbě  $^1\text{O}_2$  spojené s monomolovou i dimolovou emisí. Abychom zabránili této reakci, a tím se vyhnuli falešně pozitivnímu signálu, přidávali jsme k našim vzorkům katalázu před  $\text{NaOCl}$ . Následně jsme redukovali ROOH na  $\text{ROO}^\bullet$  a očekávali jsme nárůst UPE v důsledku tvorby  $^1\text{O}_2$  přes Russellův mechanismus. Redukce ROOH neměla na UPE v červené oblasti žádný efekt (Obr. 23). Ultra slabou emisí fotonů jsme také indukovali  $\text{HO}^\bullet$ . Přidávali jsme  $\text{FeSO}_4$ , které jsme smíchali s chelatačním činidlem EDTA, které vytváří sloučeniny s ionty kovů. Síran železnatý jsme museli smíchat s destilovanou vodou, protože po smíchání s pufrům se nám srazil, ale EDTA jsme smíchali s pufrům. Detekovali jsme navýšení UPE ve VIS i červené

oblasti spektra (Obr. 24 a Obr. 25). U UPE ve VIS oblasti je navýšení vyšší, protože HO<sup>•</sup> se účastní řetězových reakcí, které vedou k tvorbě <sup>3</sup>(R=O)\* i <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Převážně tedy <sup>3</sup>(R=O)\*, která vyzařuje nejvíce v modré oblasti spektra. K tomuto chemickému systému jsme přidali katalázu a NaOCl (Obr. 26). Přidáním katalázy by měla emise klesnout, nám ale vzrostla (Obr. 27). Přisuzujeme to tomu, že tam už nezbyl žádný H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a místo toho kataláza sloužila jako substrát v již probíhajících řetězových reakcích proteinových radikálů, což vedlo k navýšení UPE. Navýšení nastalo taky přidáním NaOCl, ale zdaleka ne tak prudké, jak u (Harada a kol., 2009).

Srovnání UPE v blízké IČ oblasti a při 1270 nm odhalilo, že nárůst UPE je přibližně stejný. V obou případech bychom měli detekovat monomolovou emisi ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. V případě měření UPE indukovanou <sup>1</sup>O<sub>2</sub> byl nárůst velmi vysoký jak při detekci UPE při 1270 nm, tak při UPE v blízké IČ oblasti (Obr. 28). Po přidání katalázy UPE klesala, ale velmi pomalu a NaOCl nemělo vliv žádný (Obr. 29). Chemický systém obsahující Mo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> používali (Aubry a Casin, 1988) a o čtyři roky později (Böhme a Brauer, 1992) a naměřili monomolovou emisi ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Porovnávali jsme nárůst UPE indukovanou HO<sup>•</sup> (Obr. 31). Bohužel v tomto případě jsme nezpozorovali žádnou změnu v UPE, ani nárůst ani snížení. To se ovšem nemůže říct o (Prado a kol., 2009), kteří studovali thymidové ROOH a reagují s kovovými ionty za tvorby <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pomocí Russellova mechanismu.

Srovnali jsme UPE v červené oblasti a při 1270 nm (Obr. 34), vyšší UPE je zaznamenána v červené oblasti spektra. Rozdíl v emisi může být způsoben různými faktory, počínaje kvantovou účinností PMT, kde s rostoucí vlnovou délkou klesá kvantová účinnost. Další důvod může být velikost fotokatody nebo velikost snímané plochy vzorku. U PMT pro IČ oblast jsme použili kyvety o velikosti 1x1x4 cm a u PMT pro VIS oblast Petriho misky o průměru 5,5 cm. Kromě PMT jsme porovnávali i UPE za použití a bez použití BSA (Obr. 33). Nejvyšší UPE IČ oblasti ze všech testovaných vzorků jsme měli, když jsme generovali <sup>1</sup>O<sub>2</sub> chemickou cestou, což potvrzuje měření UPE při 1270 nm bez BSA, ale nedetekovali jsme žádnou dimolovou emisi ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Přidání BSA do systému mělo za následek pokles UPE při 1270 nm, což jsme očekávali, protože většina <sup>1</sup>O<sub>2</sub> oxiduje protein a jenom část molekul oxidovaného proteinu jde přes Russellův mechanismus zpátky na <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. V případě dimolové emise ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, tedy detekci UPE v červené oblasti spektra, je tomu naopak. Ultra slabá emise fotonů v červené oblasti spektra po přidání BSA narostla, dokonce 1,4x než monomolová emise ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub> bez BSA. Pravděpodobně je tomu tak, protože při snímání UPE v červené oblasti spektra nevyzařuje dimolová emise ze <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Vyzařuje tedy něco jiného než u monomolové emise ze  $^1\text{O}_2$ . Autoři, kteří měřili na podobném chemickém systému, nemají důkaz, že se jedná o dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$ . Měřili pomocí filtru pro červenou oblast spektra nebo s  $\text{D}_2\text{O}$  a monomolovou emisí ze  $^1\text{O}_2$  neměřili.

## 7. Závěr

V této diplomové práci jsme měli vytvořit organické ROOH z BSA a následně porovnat indukovanou UPE v červené a blízké IČ oblasti spektra. Ultra slabá emise fotonů byla indukovaná různými ROS chemickou cestou. Měřili jsme na EPR a dvou PMT. Měření na EPR jsme si potvrdili tvorbu  $^1\text{O}_2$  z našich vybraných chemických systémů, se kterými jsme dále pracovali na PMT.

Srovnávali jsme indukovanou UPE při použití tří druhů pufrů o rozdílném pH. Použití pufru o pH 5,0 a 7,5 mělo jen slabý efekt na indukovanou UPE. Zatímco použití pufru o pH 10,8 mělo za následek prokazatelně vyšší nárůst indukované UPE v červené i v blízké IČ oblasti spektra, které nás zajímají a proto jsme se ho rozhodli použít v dalších měřeních.

Porovnávali jsme UPE indukovanou  $^1\text{O}_2$  ve VIS a červené oblasti spektra, přičemž indukovaná UPE byla ve VIS oblasti vyšší než v červené oblasti spektra. Je tomu tak, protože ve VIS oblasti spektra vyzařuje  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  i  $^1\text{O}_2$ . Zatímco v červené oblasti jsme očekávali pouze dimolovou emisi ze  $^1\text{O}_2$ . Přidáním katalázy, jakožto antioxidantu, jsme zastavili tvorbu ROS a následně jsme nahromaděné ROOH redukovali přidáním NaOCl, ale redukce ROOH neměla na navýšení UPE vliv. Stejně tak UPE indukovaná  $\text{HO}^\bullet$  byla vyšší ve VIS oblasti spektra, protože se tvoří  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  i  $^1\text{O}_2$ . Přidání katalázy vedlo k navýšení UPE, protože kataláza sloužila jako substrát v probíhajících reakcích proteinových radikálů. Přidáním NaOCl se UPE také zvýšila.

Měření UPE indukovanou  $^1\text{O}_2$  v blízké IČ oblasti a při 1270 nm, ukázalo v obou případech vysoký nárůst UPE. Po přidání katalázy UPE velmi pomalu klesala a přidání NaOCl nemělo na UPE žádný efekt. Překvapivě, přidání exogenního  $\text{HO}^\bullet$  nemělo žádný vliv na UPE v blízké IČ oblasti a při 1270 nm.

Kontrolní měření jsme prováděli i na čistém chemickém systému generujícím  $^1\text{O}_2$  (bez přítomnosti BSA). Dle očekávání jsme v tomto měření měli nejvyšší nárůst UPE při 1270 nm, což odpovídá monomolové emisi ze  $^1\text{O}_2$ . Ten samý experiment byl proveden v červené oblasti spektra, ale žádné navýšení UPE nenastalo, navzdory našemu předpokladu, že pokud v systému vygenerujeme vysokou koncentraci  $^1\text{O}_2$ , dojde k dimolové emisi ze  $^1\text{O}_2$ . V tomto případě to neplatí. Měření s BSA vedlo ke snížení UPE při 1270 nm, protože část molekul  $^1\text{O}_2$  oxiduje BSA na ROOH a jen část molekul ROOH

zpětně tvoří  $^1\text{O}_2$  přes Russellův mechanismus. Po přidání BSA se UPE se při 1270 nm dle očekávání snížila, zatímco UPE v červené oblasti spektra narostla, což by znamenalo, že nám klesá monomolová emise ze  $^1\text{O}_2$ , zatímco roste dimolová emise ze  $^1\text{O}_2$ . Tento rozpor v chování monomolové emise ze  $^1\text{O}_2$  a UPE detekované v červené oblasti spektra, společně s několika dalšími popsanými nesrovnalostmi v jejich chování, nás vede k závěru, že kromě  $^*Ch$  a dimolové emise ze  $^1\text{O}_2$  existuje ještě další zdroj UPE v červené oblasti, který zatím nebyl popsán.

## 8. Seznam literatury

Adam W., Kazakov D. V., Kazakov V, P. (2005) Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions. *Chem. Rev* 105, 3371-3387

Aubry J. M., Cazin B. (1988) Chemical sources of singlet oxygen. 2.1,2 Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* 27, 2013-2014

Böhme K., Brauer H. D. (1992) Generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* 31, 3468-3471

Burgos R. C. R., Schoeman J. C., Winden L. J., Červinková K., Ramautar R., Van Wijk E. P. A., Cifra M., Berger R., Hankemeier T., Greef J. (2017) Ultra-weak photon emission as a dynamic tool for monitoring oxidative stress metabolism.

Cadenas E., Arad I. D., Boveris A., Fisher A. B., Chance B. (1980) Partial spectral analysis of the hydroperoxide – induced chemiluminescence of the perfused lung. *Febs. Lett.* 111, 413 – 418

Cadenas E., Boveris A., Chance B. (1980) Low-level chemiluminescence of hydroperoxide-supplemented cytochrome c. *Biochem. J.* 187, 131-140

Criado S., Soltermann A. T., Marioli J. M., García N. A. (1998) Sensitized photooxidation of di- and tripeptides of tyrosine. *Photochem. Photobiol.* 68(4), 453-458

Davies M. J., Fu S., Wang H., Dean R. T. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biol. Med.* 27, 1151-1163

Davies M. J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761-770

Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J. (1997) Biochemistry and pathology of radical – mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18

Di Mascio P., Sies H. (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2909-2914

Di Mascio P., Bechara E. J. H., Medeiros M. H. G., Briviba K., Sies H. (1994) Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 355, 287-289

Freinbichler W., Colivicchi M. A., Stefanini C., Bianchi L., Ballini C., Misini B., Weinberger P., Linert W., Varešlija D., Tipton K. F., Corte L. D. (2011) Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2067-2079

Guedes S., Vitorino R., Domingues R., Amado F., Domingues P. (2009) Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 2307-2315

Harada Y., Suzuki K., Hashimoto M., Tsukagoshi K., Kimoto H. (2009) Chemiluminescence from singlet oxygen that was detected at two wavelengths and effects of biomolecules on it. *Talanta* 77, 1223-1227

Hoshi T., Heinemann S. H. (2000) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* 531.1, 1-11

Kanofsky J. R. (1983) Singlet oxygen production by lactoperoxidase. *J. Biol. Chem.* 258, 5991-5993

Khan A. U., Kasha M. (1963) Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 39, 2105 – &

Klotz L. O., Kröncke K. D., Sies H. (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem, Photobiol. Sci.* 2, 88-94

Langlois R., Ali H., Brasseur N., Wagner J. R., Lier J. E. (1986) Biological activities of phthalocyanines IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 44, 117-123

Lengfelder E., Cadenas E., Sies H. (1983) Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octane) on singlet oxygen monomol (1270 nm) and dimol (634 and 703 nm) emission. *FEBS Lett.* 164, 366-370

Miyamoto S., Martinez G. R., Rettori D., Augusto O., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2006) Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 293-298

Miyamoto S., Nantes I. L., Faria P. A., Cunha D., Ronsein G. E., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2012) Cytochrome c-promoted cardiolipin oxidation generates singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1536-1546

Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2014) Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 139, 24 – 33

Niu Q. J., Foote Ch. S. (1992) Singlet molecular oxygen generation from the decomposition of sodium peroxotungstate and sodium peroxomolybdate. *Inorg. Chem.* 31, 3472-3476

Ogilby P. R., Foote Ch. S. (1983) Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g$ ). *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3423-3430

Pospíšil P., Prasad A., Rác M. (2014) Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 139, 11-23

Prado F. M., Oliveira M. C. B., Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H. G., Ronsein G. E., Di Mascio P. (2009) Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. *Free Radical Biol. Med.* 47, 401-409

Prasad A., Pospíšil P. (2012) Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: in vivo charge coupled device imaging. *J. Biomed. Opt.* 17(8), 085004-1-085004-8

Rác M. (2010) Ultra-weak photon emission from U937 cell culture. Diplomová práce, UP Olomouc

Rác M., Sedlářová M., Pospíšil P. (2015) The formation of electronically excited species in the human multiple myeloma cell suspension. *Sci. Rep.* 5, 1-8

SASDB – Small angle scattering biological data bank [online]. Copyright © SASDB 2014-2020, dostupné z <https://www.sasbdb.org/data/SASDBK3/>



Seliger H. H. (1960) A photoelectric method for the measurement of spectra of light sources of rapidly varying intensities. *Anal. Biochem* 1, 60 – 65

Tian Y., Yang Ch., Xu H. (2014) Insect spontaneous ultraweak photon emission as an indicator of insecticidal compounds. *J. Photochem. Photobiol., B* 140, 79-84

Wright A., Bubb W. A., Hawkins C. L., Davies M. J. (2002) Singlet oxygen-mediated protein oxidation: Evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem. Photobiol.* 76(1), 35-46